

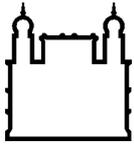
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**INFECÇÃO NATURAL POR *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885)  
EM MAMÍFEROS DE RIO BRANCO/ AC**

**ALESSANDRA FILGUEIRAS GONZALEZ ARAUJO SANTOS**

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Alessandra Filgueiras Gonzalez Araujo Santos**

Infecção natural por *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) em mamíferos de Rio Branco/AC

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Ecologia e Epidemiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2017

Santos, Alessandra Filgueiras Gonzalez Araujo .

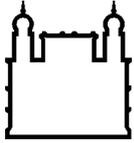
Infecção natural por Trypanosoma (Trypanozoon) evansi (Steel, 1885) em mamíferos de Rio Branco/AC / Alessandra Filgueiras Gonzalez Araujo Santos. - Rio de Janeiro, 2017.  
95 f.; il.

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

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 62-67

1. Trypanosoma evansi. 2. Cães. 3. Morcegos. 4. Capivaras. 5. Acre. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: ALESSANDRA FILGUEIRAS GONZALEZ ARAUJO SANTOS**

**Infecção natural por *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) em mamíferos de Rio Branco/AC**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez - Presidente (UFF)**

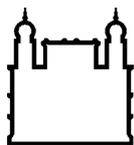
**Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC- FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera (UCDB)**

**Prof. Dr. Paulo Sérgio D' Andrea (IOC- FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Maria Ogrzewalska (IOC- FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 16 de março de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

**Dedicado aos meus pais: Marco  
Antônio Filgueiras A. Santos e Leila  
G. A. Santos.**

## AGRADECIMENTOS

Nesses 2 anos de mestrado, foi possível adquirir alguns aprendizados. Não apenas sobre tripanosomatídeos e *Trypanosoma evansi*, mas também sobre persistência, resiliência, amizade, cooperação e até sobre mim mesma. E eu sou muito grata a todos esses aprendizados. Muito obrigada a todos que fizeram parte de alguma forma!

Gostaria de agradecer aos meus pais Leila e Marco, por sempre ser meu porto seguro, pelo apoio e incentivo nas minhas decisões. Muito obrigada por tudo, para sempre!

A Dra. Ana Maria Jansen, pela oportunidade de estudar no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP) e por todos os ensinamentos durante esse período.

Ao meu orientador, Dr. André Luiz Rodrigues Roque, por ter aceitado me orientar e pela boa orientação. Muito obrigada pelos ensinamentos, incentivo nos momentos de desânimo e paciência ao longo dessa dissertação.

A Dra. Juliana Helena Silva Barros, pelo carinho e paciência nos ensinamentos com biologia molecular.

A Dra. Samanta Xavier, por toda a atenção e colaboração não apenas com a parte da sorologia, mas em muitas etapas do projeto, sempre torcendo para dar tudo certo.

Aos técnicos do laboratório Marcos e Carlos pela ajuda em vários momentos no desenvolvimento desse projeto.

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CAPES pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de mestrado.

As professoras Soraia Souza, Luciana Medeiros e Vânia Ribeiro da UFAC pela colaboração no projeto e por toda atenção e ajuda durante o trabalho de campo. Gostaria de agradecer também a Joelma Faria, Rodrigo Gomes, Mayara Marques, Carolina Barquete, Adriane Belfort, Itacir Olivio Farikosky e Adriana Rossi por toda a preciosa ajuda durante as coletas no Acre.

Aos amigos da turma do mestrado.

Aos amigos do LABTRIP: Marina Rodrigues, Fabíola Roman, Karina Palhares, Viviane Xavier, Felipe Oliveira, Diego Basílio, Cristiane Varella e Bruno

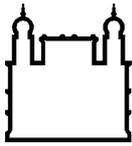
Alves. Muito obrigada por toda a ajuda nos momentos que precisei e por deixarem os dias mais leves. Obrigada também ao Francisco Charles pela colaboração com os morcegos e pela ajuda durante o campo em Rio Branco.

Às meninas Renata Pires, Elida Brandão, Maria Augusta Dario e Camila Lopes, pela amizade, conversas, conselhos e risadas. Nossa amizade é um dos mais importantes legados do mestrado. Obrigada!

A Diana Rangel, pela amizade e parceria desde o início do mestrado. Foi muito importante ter alguém para compartilhar e entender as ansiedades e alegrias desse período. Não foi fácil, mas saber que podia contar com você, animava. Obrigada por tudo!

Às amigas: Lívia Collares, Juliana Romanholi, Julia Garcia, Débora Moraes, Gabriela Lasmar e Renata Borges

**“Aponta pra fé e rema.” Marcelo  
Camelo**  
viii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Infecção natural por *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) em mamíferos de Rio Branco/AC

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Alessandra Filgueiras Gonzalez Araujo Santos

*Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* foi o primeiro tripanossoma patogênico de mamífero a ser descrito. É a espécie de *Trypanosoma* mais dispersa e a que infecta a maior variedade de hospedeiros no mundo. *T. evansi* é um parasito de grande importância médico-veterinária, exclusivo de sangue de mamíferos e sua transmissão se dá através de vetores mecânicos. No ano de 2014, um cão de Rio Branco/AC recebeu um diagnóstico sugestivo da infecção por *T. evansi*, dada a sintomatologia apresentada e a presença de parasitos flagelados, sem cinetoplasto evidente, em esfregaço sanguíneo. O objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de *T. evansi* em cães, morcegos e capivaras provenientes de Rio Branco/AC através de abordagens parasitológicas, sorológicas e moleculares. Nossa hipótese é que há neste local uma ocorrência ainda não reportada deste parasito. Foi coletado sangue de 78 cães de áreas próximas ao Parque Zoobotânico (PZ), pertencente ao campus da Universidade Federal do Acre (UFAC). O diagnóstico parasitológico dos cães foi realizado por hemocultivo (buscando detectar infecção por *T. cruzi* como diagnóstico diferencial), exame à fresco de capa leucocitária e análise de esfregaço sanguíneo e todos foram negativos. O diagnóstico sorológico por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) detectou a presença de anticorpos anti-*T.evansi* e anti-*T.cruzi* em 20,5% e 26,0% dos animais avaliados, respectivamente. Também foi possível detectar a presença de DNA de *T. evansi* em um cão através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando um alvo específico de DNA nuclear satélite de *Trypanosoma (Trypanozoon) sp.* Para os morcegos foi realizado diagnóstico molecular utilizando o mesmo alvo em 182 amostras de baço coletadas em quatro expedições realizadas durante os anos de 2014 e 2015 no PZ, sendo detectado um

morcego (*Carollia perspicillata*) positivo. As sequências de DNA obtidas nas reações de PCR do cão e do morcego *C. perspicillata* mostraram similaridade com DNA satélite de *T. brucei* (K00392.1), com cobertura de 90% e identidade de 89%. Esfregaços sanguíneos e/ou RIFI anti-*T. evansi* foram realizadas em 51 capivaras de áreas rurais e urbanas da região coletadas em 2015. Todos os esfregaços sanguíneos (n=43) foram negativos, mas a infecção por *T. evansi* foi sorologicamente confirmada em 17,4% dos 46 roedores avaliados utilizando-se um conjugado anti-*Cavia* sp. Com os resultados obtidos no presente estudo foi possível confirmar a hipótese de transmissão silenciosa de *T. evansi* em Rio Branco/AC e a participação de ao menos três espécies de mamíferos (cães, morcegos e capivaras) neste ciclo. Essa é a primeira descrição de *T. evansi* na região norte do Brasil a obter confirmação da infecção através de diagnóstico molecular e análise de sequências dos produtos amplificados.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma evansi*, cães, morcegos, capivaras, Acre, Bioma Amazônico.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Natural *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) infection among mammals from Rio Branco/AC

## ABSTRACT

### MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Alessandra Figueiras Gonzalez Araujo Santos

*Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* was the first pathogenic mammalian trypanosome ever described. It is the most dispersed *Trypanosoma* species and the one that infects the highest variety of hosts worldwide. *T. evansi* is a parasite of great medical-veterinary importance, exclusive of mammalian blood and its transmission occurs through mechanical vectors. In 2014, a dog from Rio Branco/AC was suspected of *T. evansi* infection, due to its symptoms and the observation of flagellated parasites, without evident kinetoplast, in dog's blood smear. The aim of this work was to investigate the occurrence of *T. evansi* in dogs, bats and capybaras from Rio Branco/AC through parasitological, serological and molecular approaches. Our hypothesis was the existence of an unreported occurrence of the parasite in the area. Blood was collected from 78 dogs from areas near the Zoobotanical Park (PZ), which belongs to the Federal University of Acre (UFAC). The parasitological diagnosis made in dogs consisted in blood cultures (searching for *T. cruzi* infection as differential diagnosis), fresh buffy coat examination and blood smear analysis, and all of them were negative. The serological diagnosis by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) detected the presence of anti-*T. evansi* and anti-*T. cruzi* antibodies in 20.5% and 26% of the evaluated animals, respectively. It was also possible to detect the presence of *T. evansi* DNA in one dog's blood through Polymerase Chain Reaction (PCR) using a specific nuclear DNA target of *Trypanosoma (Trypanozoon)* sp. The molecular diagnosis in bats was performed using the same above-mentioned molecular target in 182 spleen samples collected in four expeditions during 2014 and 2015 in PZ. One bat (one *Carollia persipicillata*) was positive. The DNA sequences obtained in the PCR reactions from the dog and the *C. persipicillata* bat showed

similarity with *T. brucei* satellite DNA (K00392.1), with 90% of coverage and 89% of identity. Blood smears and/or anti-*T.evansi* IFAT were carried out in 51 capybaras collected in 2015 in rural and urban areas of the region. All blood smears (n=43) were negative, but *T. evansi* infection was serologically confirmed in 17.4% of the 46 evaluated rodents using anti-*Cavia* sp. conjugate. We herein confirmed the hypothesis of silent transmission of *T. evansi* in Rio Branco/AC, which includes at least three mammal species (dogs, bats and capybaras) in its transmission cycle. This is the first description of *T. evansi* in the Northern Region of Brazil that confirmed the infection using molecular diagnosis and analysis of the sequenced amplified products.

**Key-words:** *Trypanosoma evansi*, dogs, bats, capybaras, Acre, Amazon Biome.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Kinetoplastea, Tripanosomatidae e gênero <i>Trypanosoma</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Trypanosoma evansi</i></b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Morfologia.....	7
1.2.2 Características genéticas.....	8
1.2.3 "Surra" ou Mal-de-cadeiras.....	9
1.2.4 Transmissão e ciclo.....	12
1.2.5 Métodos de diagnóstico.....	14
1.2.6 <i>T.evansi</i> na América Latina.....	16
1.2.7 O Bioma Amazônico e o Estado do Acre.....	17
<b>1.3 Justificativa</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Obtenção de parasitos para Reação de Imunofluorescência indireta e controle positivo para diagnóstico molecular</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Área de Estudo</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 Mamíferos</b> .....	<b>22</b>
3.3.1 Cães.....	22
3.3.1.1 Coleta de sangue e separação do material.....	22
3.3.1.2 Diagnóstico parasitológico.....	24
3.3.1.3 Avaliação do volume globular.....	24
3.3.1.4 PCR e Eletroforese do DNA nuclear satélite do subgênero <i>Trypanozoon</i> .....	25
3.3.1.5 PCR e Eletroforese do gene ribossomal 18S.....	26
3.3.1.6 Diagnóstico sorológico.....	27

3.3.2	Morcegos.....	28
3.3.2.1	Coleta de fragmento de baço.....	29
3.3.2.2	PCR do DNA nuclear satélite do subgênero <i>Trypanozoon</i> .....	30
3.3.3	Capivaras.....	30
3.3.3.1	Coleta de sangue, confecção de esfregaço e obtenção de soro.....	31
3.3.3.2	Obtenção de IgG total de <i>Thrichomys sp.</i> para realização de diagnóstico sorológico.....	32
3.3.3.2.1	Imunização de coelhos.....	32
3.3.3.2.2	Obtenção de IgG total de <i>Thrichomys sp.</i> .....	33
3.3.2.4	Diagnóstico sorológico.....	34
<b>3.4</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Mamíferos .....</b>	<b>36</b>
4.1.1	Cães.....	36
4.1.1.1	Diagnóstico.....	36
4.1.1.1.1	Diagnóstico parasitológico.....	37
4.1.1.1.2	Volume globular.....	37
4.1.1.1.3	Diagnóstico sorológico.....	37
4.1.1.1.4	Diagnóstico molecular.....	43
4.1.2	Morcegos.....	46
4.1.2.1	Diagnóstico molecular.....	46
4.1.3	Capivaras.....	47
4.1.3.1	Diagnóstico parasitológico e sorológico.....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1 -</b>	<b>QUESTIONÁRIO DOS CÃES .....</b>	<b>69</b>

**ANEXO 2 - CHAVE SIMPLIFICADA DE IDENTIFICAÇÃO DAS  
FAMÍLIAS DE MORCEGOS**

**70**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** - Distribuição de *Trypanosoma evansi* no mundo. Reproduzido de Desquesnes *et al*, 2013a.

**Figura 2** - *Trypanosoma evansi* em sangue humano. Reproduzido de Van Vinh Chau *et al.*, 2016.

**Figura 3** – Mapa das imediações do Parque Zoobotânico, mostrando a localização das coletas com os mamíferos realizadas no presente trabalho.

**Figuras 4** – Coleta de sangue de cão realizada no mês de agosto de 2015 no Condomínio Conjunto Universitário.

**Figura 5** – Gráfico da riqueza de espécies de morcegos coletadas no Parque Zoobotânico nos anos de 2014 e 2015.

**Figura 6**- Representação de coluna para precipitação de proteínas plasmáticas.

**Figura 7** - Fotografia de gel de agarose 2% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon* com amostra positiva de cão (LBT 6593).

**Figura 8** – Fotografia de gel de poliacrilamida 8% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*.

**Figura 9** -Fotografia de gel de agarose 2% de PCR de gene ribossomal 18S com amostras positivas de cão e morcegos.

**Figura 10** - Fotografia de gel de agarose 2% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon* com amostra positiva de morcego (LBT 4989).

**Figura 11** - Fotografia de gel de agarose 2% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon* com amostra positiva de morcego (LBT5366).

**Figura 12**- Mapa da localização de capturas das capivaras.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Informações coletadas sobre os cães e seus hábitos em questionário (ANEXO 1).

**Tabela 2** - Características e hábitos dos cães analisados de acordo com a localização de suas moradias.

**Tabela 3** – Resultados das análises de volume globular, diagnóstico sorológico e molecular dos cães estudados.

**Tabela 4** – Origem e número de amostras de capivaras analisadas por exame de esfregaço sanguíneo e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) frente a infecções por *T. cruzi* e *T. evansi*.

**Tabela 5** – Origem, sexo e resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando conjugado anti-*Cavia sp.* frente à infecção por *T. evansi* em amostras de capivaras.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTUs- Unidades discretas de tipagem

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz

F- Forward

HAT – Doença – do- sono

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IgG- Imunoglobulina de classe G

IgM- Imunoglobulina de classe M

kDNA – DNA de cinetoplasto

LABTRIP – Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos

LIT – Liver Infusion Triptose

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

NNN – Nicolle, Novy e Mc Neal

pb – Pares de bases nitrogenadas

PBS – Tampão solução fosfato salina

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

pMOL – picomol

PS- Solução tampão de salina fosfatada

PSG- Solução Tampão de salina fosfatada com glicose

R- Reverse

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – Ácido Ribonucleico

rpm- Rotações por minuto

SISBIO- Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSU – *Small subunit*

TBE – Tris – Ácido Bórico – EDTA

UFAC – Universidade Federal do Acre

UV- Luz Ultravioleta

## VSG- Glicoproteínas Variáveis de Superfície

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Kinetoplastea, Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*

A classe Kinetoplastea é composta por protozoários que possuem uma organela em comum, denominada Cinetoplasto. Essa organela é uma porção especializada integrante de uma mitocôndria única e ramificada da célula e contém DNA mitocondrial (KDNA) formada por maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos apresentam-se similares e em número reduzido com a função de codificar genes mitocondriais, já os minicírculos estão presentes em maior quantidade e apresentam-se interconectados entre si (Stevens *et al.*, 2008; Simpson; Lukes; Roger 2002).

Atualmente, a classe Kinetoplastea é dividida em duas subclasses: Prokinetoplastina (com a ordem Prokinetoplastida) e a subclasse Metakinetoplastina, composta por três ordens de bodonídeos (Eubodonidae, Parabodonidae e Neobodonida) e a ordem Trypanosomatida, com uma única família, denominada Trypanosomatidae (Stevens *et al.*, 2008; Deschamps, 2011).

A família Trypanosomatidae compõe-se de vinte gêneros, dos quais dezesseis são parasitas monoxênicos (possuindo apenas um hospedeiro definitivo, geralmente um inseto das ordens Diptera ou Hemiptera), um de parasita heteroxênico de plantas (*Phytomonas*) e três gêneros de parasitas heteroxênicos que alternam seu ciclo de vida entre insetos hematófagos e hospedeiros vertebrados (*Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*) (Wallace *et al.*, 1983; Camargo, 1999; Maslov, Podlipaev e Lukes, 2001; Merzlyak *et al.*, 2001;; Svobodova *et al.*, 2007; Borghesan *et al.*, 2013; Votýpka *et al.*, 2013; Yurchenko *et al.*, 2016).

O gênero *Trypanosoma* possui como características morfológicas um flagelo único saindo de sua região anterior e presença de estruturas típicas, tais como bolsa flagelar, múltiplos lisossomos, corpos basais, citossoma, paraxonema (ou estrutura paraflagelar), acidocalcissomos e reservossomos (Acosta *et al.*, 2013; Mathews, 2005). Em 1972, Hoare propôs a divisão do gênero em duas seções, baseadas na forma de transmissão do parasito: Seções Stercoraria e Salivaria.

Na Seção Stercoraria, estão alocados os parasitos que possuem desenvolvimento no intestino posterior de seus vetores, insetos hematófagos

(triatomíneos, entre outros) e são transmitidos pela forma contaminativa. Essa seção é composta por três subgêneros: *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schyzotrypanum*. O subgênero *Schyzotrypanum* possui grande importância epidemiológica, pois é onde classifica-se o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Tripanossomíase americana (Hoare 1972; Haag; O'h Uigin; Overath 1998). Atualmente são reconhecidas 6 subpopulações do parasito (Unidades Discretas de Tipagem, do inglês *Discrete Typing Units* – DTU), as DTUs TcI a TcVI, além de uma sétima DTU normalmente associada a infecções por morcegos, Tcbat (Zingales et al., 2012).

Na Seção Salivaria, estão inseridos os tripanossomas originários da África e transmitidos de forma inoculativa pela saliva, principalmente pelo díptero *Glossina* sp. (mosca tsé-tsé), além do *Trypanosoma rangeli*. Essa seção é composta por cinco subgêneros: *Tejeraia*, *Trypanozoon*, *Nannomonas*, *Duttonella* e *Pycomonas*. O subgênero *Tejeraia* foi o último a integrar essa seção e é composto apenas pelo *Trypanosoma rangeli*. O subgênero *Duttonella* é composto por *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma uniforme*, o subgênero *Nannomonas* por *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma godfreyi* e *Trypanosoma simiae*, enquanto o subgênero *Pycomonas* têm como integrante o *Trypanosoma suis*. No subgênero *Trypanozoon* estão alocados tripanossomas conhecidos e de importância médica e veterinária, como o *Trypanosoma brucei*, agente infeccioso da doença-do-sono em humanos no continente Africano e *Trypanosoma evansi*, responsável por doenças em animais de produção na África e nas Américas (Añez 1982; Desquesnes et al., 2013a; Rotureau e Van Den Abbeele, 2013).

Duas subespécies de *T. brucei* são agentes etiológicos da doença-do-sono (HAT): *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense*. O primeiro apresenta uma forma mais virulenta e aguda da parasitose. Essa forma ocorre na África Oriental e Austral, acredita-se que seja zoonótica (sendo os hospedeiros gado e animais silvestres) e a infecção de humanos é ocasional, com a morte dos pacientes podendo acontecer em poucas semanas. Na África Ocidental e Central essa doença está relacionada com *T. brucei gambiense* e representa 98% dos casos de HAT. Apresenta-se de forma latente e curso crônico e também pode ser fatal se não diagnosticada e tratada. Nela, os seres humanos são o principal reservatório da infecção e apresentam papel chave na transmissão do agente. A evolução da doença-do-sono apresenta dois estágios e seu curso na infecção por *T. brucei rhodesiense* é mais rápido. Esses estágios são: Estágio Hemolinfático ou Estágio I,

onde os parasitas penetram no sistema linfático e na corrente sanguínea e Estágio Meningo-encefálico ou Estágio II, onde os flagelados atravessam a barreira hematoencefálica e invadem o Sistema Nervoso Central, provocando dano neurológico progressivo. Infelizmente, não há droga ou vacina para prevenir nenhum tipo de HAT (Franco *et al.*, 2014; Ponte-sucre, 2016).

Outra importante doença cujos agentes etiológicos são tripanossomas salivários é a Nagana, uma infecção que ocorre em rebanhos africanos, causada principalmente por *T. vivax* (subgênero *Duttonella*), *T. congolense* (subgênero *Nannomonas*) e *T. brucei brucei* (subgênero *Trypanozoon*). Esta doença ocasiona grandes perdas econômicas, não apenas pela sintomatologia dos animais infectados, como também pelos custos para a prevenção da infecção. Muitas vezes a administração de drogas tripanocidas, como Aceturato de Diminazeno e Cloreto de Isometamidium é a principal medida de controle do rebanho. A diversidade de espécies dos tripanossomas envolvidos é um dos fatores responsáveis pela variação de sinais clínicos, que incluem: abortos, nascimentos prematuros, diminuição na produção de leite e infertilidade. Em relação a hospedeiros susceptíveis, *T. vivax* infecta principalmente gado e em menor extensão cavalos. O principal hospedeiro de *T. congolense* também é o gado, enquanto *T. brucei brucei* infecta gado e animais silvestres, porém sua prevalência de infecção é menor em relação as outras duas espécies (Desquesnes *et al.*, 2013a; Auty *et al.*, 2015; Mamoudou *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2016).

Os tripanossomas salivários não possuem a capacidade de invadir células, como os tripanosomas da seção Stercoraria, e duas importantes características definem este grupo: (i) sua localização apenas em fluidos extracelulares; e (ii) a habilidade de evadir o sistema imune do hospedeiro através da variação antigênica das glicoproteínas de superfície (VSGs). Com o sequenciamento do genoma de *T. brucei* foi possível identificar a existência de mais de 1000 genes de VSGs, a grande maioria incapaz de produzir uma proteína viável, mas capazes de gerar uma proporção ainda maior de coberturas de VSGs através de conversão segmentar de genes. Essa variação antigênica mostra-se importante para esses organismos de reprodução clonal, pois favorece as linhagens que apresentam uma gama mais ampla de variantes antigênicas distintas. Outro fato importante é que normalmente a variação antigênica ocorre em altas taxas, acima da taxa regular de mutação, sendo um processo estocástico, e previne o reconhecimento imune do antígeno expresso.

Esse fato acarreta em uma exaustão imunológica por parte do hospedeiro, pois leva-o a montar sucessivas respostas humorais em resposta às VSGs emergentes, enquanto uma nova variante está sendo já produzida, antes da efetivação da resposta humoral. A resultante disso são altas e recorrentes parasitemias e recidivas, favorecendo sua transmissão (Desquesnes *et al.*, 2013a; Morrison *et al.*, 2014; Ponte-sucré, 2016).

Integrante do subgênero *Trypanozoon*, *T. brucei* tem sua transmissão cíclica dependente do hospedeiro invertebrado *Glossina sp.* (mosca tsé-tsé) e esse processo é dependente de genes contidos no DNA mitocondrial do parasito (KDNA). O KDNA divide-se em maxicírculos e minicírculos, sendo os maxicírculos responsáveis por codificar o RNA ribossomal (rRNA) e algumas proteínas, que são em sua maioria subunidades de complexos respiratórios. Já os minicírculos têm a função de codificar moléculas essenciais de RNA, sendo sua preservação muito importante para a viabilidade dos tripanossomas. Porém, pode ocorrer uma mutação espontânea, podendo ser uma mutação pontual em um gene essencial ou deleção de um ou mais genes que leve a uma deleção do DNA maxicircular, nesse caso, o parasito permanece apenas em sua forma sanguínea, não podendo mais efetuar seu ciclo no vetor e podendo ser transmitido mecanicamente. Essa situação ocorreu em duas espécies de tripanossomas originários de *T. brucei*: *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi*, possibilitando a dispersão desses parasitos para fora da área onde o vetor é restrito (Jensen *et al.*, 2009).

Alguns autores, inclusive sugerem que essas espécies são pequenos mutantes de *T. brucei*, devendo ser chamadas de *T. brucei equiperdum* e *T. brucei evansi* (Lai *et al.*, 2008). Isso porque não há diferença significativa entre eles, a não ser pela ausência total ou parcial de partes do KDNA. Acredita-se que essas espécies evoluíram de *T. brucei* após terem perdido a capacidade de replicar fielmente esse KDNA. Em *T. equiperdum* há ainda uma parte dos maxicírculos, enquanto *T. evansi* perdeu-os por completo. A edição de RNA é essencial em *T. brucei* para as formas procíclicas (dependentes do inseto vetor) e formas sanguíneas. No entanto, a pressão seletiva para manter o arranjo completo dos minicírculos, um pré-requisito para um mecanismo de edição totalmente funcional, não existe com ausência do estágio infectivo do vetor. A falta desses genes impede o parasito de diferenciar-se em forma procíclica, sendo assim, o parasito mantém-se apenas na forma tripomastigota, e a transmissão passa a ocorrer apenas de forma

direta entre os hospedeiros: mecanicamente, no caso de *T. evansi*, ou sexualmente durante o coito, no caso de *T. equiperdum*. As cepas discinetoplásticas se caracterizam pela homogeneidade dos minicírculos, seguido por alguma deleção dos maxicírculos. A ausência de recombinação genética no inseto vetor fez com que a manutenção e replicação de um KDNA não produtivo em algumas cepas tenha se tornado um processo custoso e evolutivamente desfavorável em relação àquelas cepas que já haviam perdido por completo esta organela. Assim, acredita-se que o processo evolutivo favorecerá ao longo do tempo a seleção apenas de cepas acinetoplásticas. Sugere-se que a ação humana, através do transporte de animais infectados para fora da área do vetor e a mutação em cepas discinetoplásticas ou acinetoplásticas, tenha facilitado a dispersão destes parasitos para outras áreas além daqueles onde encontra-se presentes as moscas tsé-tsé (Lai *et al.*, 2008).

A possibilidade de ser transmitido mecanicamente permitiu a dispersão dos parasitos para fora da área do vetor, incluindo outros continentes. A transmissão cíclica consiste em diversos passos de proliferação, migração e diferenciação com o objetivo final de se diferenciar em tripomastigotas metacíclicas, revestidas por uma camada superficial glicoproteica (VSGs), e prontas para a transmissão a um novo hospedeiro vertebrado. No caso de *T. brucei*, esse processo demora aproximadamente 3 semanas e ocorre até a porção anterior do intestino do vetor, enquanto em *T. vivax* leva apenas alguns dias e é restrito apenas à probóscide e cibário da mosca tsé-tsé. No entanto, em seu ciclo dentro do vetor ambos apresentam as formas de tripomastigota e epimastigota. A diferença entre essas duas formas está na posição do cinetoplasto: enquanto na primeira o cinetoplasto localiza-se entre o núcleo e a extremidade posterior da célula, na segunda ocorre o oposto. Porém, o papel da forma epimastigota entre os tripanossomas salivários ainda não está bem elucidado na literatura, mas é possível que essa forma seja mais adaptada à fixação celular e essa seja uma maneira eficiente de manter a célula progenitora produzindo continuamente as formas infectivas sem ser eliminada com a saliva durante a alimentação do vetor (Rotureau e Van Den Abeele, 2013).

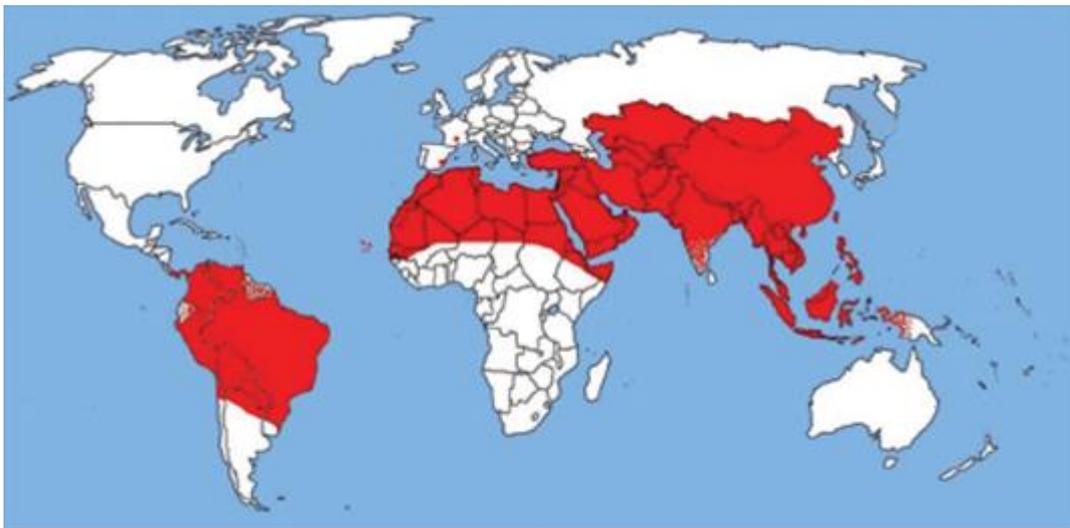
O grau de dependência do vetor varia entre os tripanossomas salivários, desde espécies que são totalmente dependentes das *Glossina* sp. e realizam apenas transmissão cíclica como *T. brucei*, (e portanto têm sua distribuição limitada às áreas de distribuição das moscas), passando pelo *T. vivax* que possui um grau de dependência menor das glossinas e, assim, são transmitidos tanto ciclicamente

pelas glossinas, quanto mecanicamente por outros vetores em áreas fora da África sub-Sahaariana, até espécies que tornaram-se totalmente independentes das glossinas e assim são transmitidos apenas mecanicamente, tanto pelas glossinas quanto por outros vetores, como é o caso do *T. evansi* (Rotureau e Van Den Abeele, 2013).

## 1.2 *Trypanosoma evansi*

*Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* foi primeiramente descrito por Steel, em 1885, sendo o primeiro tripanossoma patogênico de mamífero a ser descrito no mundo. Antigamente, algumas cepas que não possuíam cinetoplasto evidente foram consideradas uma espécie diferente e receberam a denominação de *Trypanosoma hippicum*, *Trypanosoma equinum* e *Trypanosoma venezuelense* (Hoare, 1972). Todos estes foram posteriormente reconhecidos como sinônimo de *T. evansi*.

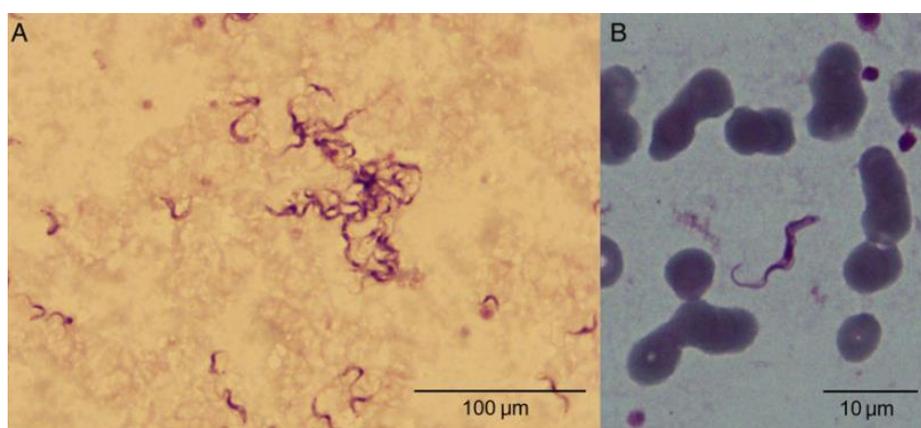
As mutações que resultaram na sua independência da transmissão cíclica, resultaram em que este parasito tenha conseguido dispersar-se para fora do continente Africano e atualmente é reconhecido como a espécie de *Trypanosoma* mais dispersa e que possui a maior gama de hospedeiros no mundo. Atualmente, o parasito encontra-se presente no Oriente Médio, Ásia, Europa, América Latina e África. (Desquesnes *et al.*, 2013a).



**Figura 1-** Distribuição geográfica de *Trypanosoma evansi* no mundo. Fonte: Desquesnes *et al.*, 2013a.

### 1.2.1 Morfologia

Sua morfologia em amostras de sangue fresco pode apresentar formas delgadas com tamanho pequeno, extremidade posterior fina e flagelo livre com movimentos ativos, mas produzindo deslocamentos limitados no campo microscópico. Possui ainda uma membrana ondulante bem visível e cinetoplasto terminal. Também apresentam formas intermediárias, com um flagelo livre mais curto e cinetoplasto quase terminal. Ambas as formas são características do subgênero *Trypanozoon*. (Desquesnes *et al.*, 2013a)



**Figura 2:** Amostra de sangue humana corado com Giemsa. Fonte: Van Vin Chau *et al.*, 2016.

Em esfregaços corados com Giemsa, o parasito caracteriza-se por possuir uma forma de tripomastigota monomórfica fina. Em comparação com *T. brucei*, apresenta-se com formas mais finas, possuindo um longo flagelo livre e extremidade posterior fina, com cinetoplasto quase terminal. Na Figura 2, é possível ver *T. evansi* em uma amostra de sangue corada com coloração de Giemsa. Nela, os parasitos possuem o aspecto característico do subgênero *Trypanozoon*, com flagelo livre, núcleo central, longa membrana ondulante, cinetoplasto subterminal pequeno e extremidade posterior fina. O tamanho médio do parasito varia entre 24 e 4 µM (mínimo de 15 µM e máximo de 33 µM), independente de sua cepa, área de origem, ou hospedeiro (Hoare, 1972; Desquesnes *et al.*, 2013a; Chau *et al.* 2016)

A multiplicação dos flagelados do subgênero *Trypanozoon* ocorre por divisão binária. Esse processo se dá pela bipartição do cinetoplasto, seguido pela formação de um novo flagelo próximo à porção posterior do cinetoplasto. O novo flagelo cresce paralelamente ao flagelo já existente, enquanto o núcleo se divide. Quando

os dois flagelos apresentam-se com tamanhos iguais, inicia-se a divisão do citoplasma pela extremidade anterior do corpo (Hoare, 1972).

### 1.2.2 Características genéticas

Em relação ao seu genoma, *T. evansi* é discinetoplástico, já que uma parte de seu DNA é ausente, pois não possui maxicírculos. Os minicírculos apresentam-se homogêneos, porém em algumas cepas eles podem estar ausentes (cepas acinetoplásticas). Sendo assim, baseado no perfil de seus minicírculos, essa espécie divide-se em *T. evansi* tipo A e *T. evansi* tipo B:

*Trypanosoma evansi* tipo A é mais abundante e encontrado na África, América do Sul e Ásia. Caracteriza-se pela presença na maioria das cepas do gene de VSG RoTat 1.2. O gene se expressa no início das infecções, fazendo com que seja possível detectar a presença do parasito em animais infectados por *T. evansi* tipo A por ferramentas sorológicas (CATT/*T. evansi*) ou moleculares com esse alvo. (Njiru 2006; Birhanu *et al.*, 2016)

*Trypanosoma evansi* tipo B é bem mais raro, foi descrito pela primeira vez em 1983, sendo até então só encontrado na África. Esse genótipo não possui o gene RoTat 1.2, sendo assim, as ferramentas com esse alvo diagnóstico não funcionam. A raridade desse genótipo sugere que ele esteja restrito a um nicho bem menor que o tipo A ou tenha emergido mais recentemente, o que justificaria sua restrição geográfica. Além disso, apenas camelídeos foram encontrados como hospedeiros dessa cepa, o que sugere que apenas essa espécie seja susceptível ou esse parasito tenha coevoluído com esse hospedeiro (Njiru 2006; Birhanu *et al.*, 2016).

As cepas de *T. evansi* encontradas no Brasil possuem na maioria das vezes, um DNA cinetoplástico totalmente ausente, tanto nos isolados obtidos de animais domésticos quanto dos silvestres. Acredita-se que essa seja uma característica do parasito nesse país (Ventura *et al.*, 2000). As cepas acinetoplásticas do parasito retêm a parte membranosa de sua estrutura mitocondrial, ainda que a massa central fibrosa que contém o DNA esteja ausente. Já que essa parte é visível na microscopia de luz o nome cinetoplasto pode ser mantido para esse disco fibroso (Hoare, 1972). Porém existem cepas de capivaras que não são totalmente acinetoplásticas, e esse fato corrobora a idéia das múltiplas origens do parasito na América do Sul (Stevens *et al.*, 1989). As cepas brasileiras quando vistas por microscopia eletrônica possuem o KDNA composto por uma massa amorfa

eletrondensa e circundada por membrana dupla, localizado no local ocupado normalmente pela mitocôndria. Essa conformação é semelhante à apresentada pelo parasito após sucessivas passagens em animais de laboratório ou induzido por drogas (Ventura *et al.*, 2000).

### 1.2.3 “Surra” ou Mal-de-cadeiras

A doença desencadeada por *T.evansi* em equinos é conhecida como “Surra” ou “Mal de cadeiras”, dependendo da região onde ocorre. A palavra “Surra” vem do *Indi* e significa podre, esse nome é principalmente relacionado ao estado em que os animais susceptíveis apresentam uma forma crônica da parasitose. Já o nome “Mal de caderas” é decorrente da sintomatologia neurológica apresentada principalmente por equinos caracterizada por paresia de membros posteriores (Desquesnes *et al.*, 2013a).

Alguns dos sintomas apresentados pelos hospedeiros acometidos são comuns da maioria das tripanossomíases: febre, imunossupressão, anemia, perda de apetite e peso, perda de produtividade e aborto. Porém, os sintomas podem variar entre diferentes hospedeiros, ou até indivíduos de uma mesma espécie, e dentro de uma área geográfica, desde infecções totalmente assintomáticas até a casos graves e muitas vezes fatais (Desquesnes *et al.*, 2013a).

Entre os hospedeiros já descritos de *T. evansi* no mundo estão animais domésticos e silvestres, tais como cães (Aref *et al.*, 2013), cavalos, capivaras, quatis, morcegos, bovinos, bubalinos (Franke *et al.*, 1994; Muñoz e Chávez., 2001; Dávila *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2004; Iturriza *et al.*, 2013), roedores, marsupiais e porcos (Herrera *et al.*, 2005; Milocco *et al.*, 2013).

Nos bovinos, *T. evansi* normalmente apresenta-se de forma sub-clínica, crônica ou assintomática. Ainda que possam apresentar alguns sinais clínicos, seu impacto econômico nessa espécie é inexpressivo. No entanto, por esses animais poderem apresentar-se como portadores assintomáticos, os mesmos possuem um importante papel como reservatórios peridomésticos da infecção. Isso é importante em períodos entre surtos, onde a infecção entre os cavalos é diminuída, porém se mantém no gado, permitindo que novos surtos equinos possa emergir de acordo com a disponibilidade dos vetores (Hoare, 1972; Desquesnes *et al.*, 2013a).

Em cavalos, o período de incubação varia de uma a quatro semanas, podendo chegar a oito e os sintomas apresentados são febre alta (41,5°C – 44°C),

anemia, fraqueza, letargia, severa perda de peso, edema local ou generalizado, hemorragias petequiais, abortamentos e alterações de locomoção de origem neurológica que podem levar à paresia de membros posteriores. A parasitose é preocupante em regiões como o Pantanal Mato-grossense, sendo responsável por grandes perdas econômicas, pois essa região de grande planície de inundação sazonal com aproximadamente 140.000 km<sup>2</sup>, possui como uma de suas principais atividades econômicas a criação extensiva de gado, e o uso de cavalos para o manejo desses animais é imprescindível (Queiroz *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2004; Desquesnes *et al.*, 2013a). Um importante fator que pode ainda favorecer a infecção nessa localidade são os períodos de enchentes durante o verão, devido ao alagamento das pastagens. Essa condição leva os animais a ficarem mais restritos em uma determinada área, além de haver escassez de alimento, levando os animais a uma situação de estresse que pode favorecer a infecção parasitária. Também foi encontrada uma maior incidência da infecção em animais jovens nessa época, já que estão desde cedo expostos ao vetor mecânico (tabanídeos). Além disso, no verão há grande disponibilidade de moscas e, uma vez que os animais estão concentrados em áreas mais restritas e não alagadas, a transmissão da parasitose é favorecida (Parreira *et al.*, 2016).

Os cães também são altamente susceptíveis ao parasito e costumam exibir sinais clínicos e morte em pouco tempo, de uma semana a um mês, quando não ocorre o tratamento. O período pré-patente médio é de 11 dias com picos de parasitemia ocorrendo em períodos intercalados e com duração de 1 a 3 dias. Os sintomas apresentados são febre (39-41°C), coincidindo com parasitemia flutuante devido às ondas de variação antigênica, anemia, edemas de cabeça, parede abdominal e patas traseiras, perda de apetite, e ocasionalmente, paresia de membros posteriores. (Aquino *et al.*, 1999; Defontis *et al.*, 2013)

Capivaras são importantes reservatórios silvestres de *T. evansi* na região do Pantanal e estão inseridas na transmissão do parasito devido à uma associação de fatores como: (i) grande densidade populacional na região; (ii) parasitemias patentes duradouras; e (iii) ausência de sinais clínicos. Ao contrário do que ocorre com *T. evansi*, as capivaras não parecem ter um papel muito significativo em infecções por *T. cruzi*, provavelmente devido a sua dieta herbívora e pelagem densa (Franke *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 2004; 2011).

Outro animal silvestre importante na região do Pantanal é o quati no qual o curso da infecção possui dois estágios: o primeiro relacionado a altos níveis de parasitemia em conjunto com o rápido desenvolvimento de anemia; e o segundo estágio, quando a infecção torna-se crônica e os animais desenvolvem uma anemia severa e persistente, com poucos parasitos sendo encontrados no sangue e possibilidade de ocorrência de deposição de imunocomplexos em órgãos como: coração, fígado, cérebro e rins, provocando lesões. Além disso, também pode ocorrer miocardite e encefalite. Sendo assim, apesar de também apresentar-se como um importante reservatório na região do Pantanal, demonstrou-se que esse animal pode desenvolver a doença, ao contrário do que ocorre com as capivaras que se mantêm assintomáticas (Herrera *et al.*, 2002).

Os morcegos são importantes hospedeiros de *T. evansi*, atuando como reservatórios e podendo também exercer o papel de vetor biológico da infecção, como ocorre com o morcego hematófago *Desmodus rotundus* na América Latina. Nesse caso, o quiróptero se alimenta em hospedeiro vertebrado infectado (capivaras, cavalos ou gado, por exemplo), contraindo a infecção. Esse fato é possível, pois a mucosa oral do morcego hematófago não apresenta barreiras aos parasitos. Sendo assim, os flagelados adquiridos do hospedeiro infectado têm acesso à corrente sanguínea do morcego, através da mucosa oral, e usam a mesma rota para voltar ao mesmo local e poderem ser transmitidos em uma nova alimentação do quiróptero (Hoare, 1972). Nessa situação os morcegos se apresentam como os vetores ideais, pois os parasitos são capazes de se multiplicar nesse mamífero e aumentar suas chances de transmissão para novos hospedeiros. Além disso, devido ao hábito comum entre esses mamíferos de morder e lambe outros da mesma colônia, o parasito pode ser transmitido mesmo entre espécies não hematófagas, como também pode permanecer nessa localidade mesmo sem outros hospedeiros disponíveis (Desquesnes *et al.*, 2013b).

#### 1.2.4 Transmissão e ciclo

A transmissão de *T. evansi* se dá por forma mecânica, através de moscas hematófagas. Para isso, o díptero deve realizar seu repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, ter esse repasto interrompido (por movimentos de defesa do hospedeiro que acarretem em sua expulsão, por exemplo), levando-o a voar desse hospedeiro e continuar sua alimentação em outro animal. Nesse processo, o

aparelho bucal do invertebrado contém um resíduo do sangue infectado que será inoculado, junto à saliva (necessária devido às propriedades anti-coagulantes), em um novo hospedeiro susceptível na próxima refeição do vetor (Hoare, 1972 ). Porém, a sobrevivência dos tripanossomas no aparelho bucal do inseto vetor é limitada. Já foi demonstrado que a permanência de tripanossoma viável, dentro ou sobre a probóscide do díptero era de 5 a 7 minutos após o repasto sanguíneo. O mesmo resultado é observado quando se considera um material contaminado, como uma agulha de seringa, por exemplo (Sumba, Mihok e Oyieke, 1998).

Na América Latina, local onde não há a presença da mosca tsé-tsé, os vetores mecânicos da parasitose são os dípteros *Tabanus sp.* (principalmente) e *Stomoxys sp.* Nesses invertebrados, o sucesso da transmissão está diretamente ligado à parasitemia do hospedeiro infectado, o número de insetos ao redor do hospedeiro e a presença de hospedeiros susceptíveis. A transmissão da infecção relaciona-se a subparâmetros, como: tamanho e morfologia do díptero (volume de sangue que pode ser transferido de um hospedeiro a outro) e a densidade do inseto. Logo, uma grande população de “pequenas” *Stomoxys spp.* pode ser tão efetiva na transmissão quanto uma pequena população de “grandes” *Tabanus spp.* (Desquesnes *et al.*, 2013b).

Tabanídeos podem atuar de duas formas na epidemiologia da tripanossomose: diretamente, através de depleção sanguínea e estresse, ocasionando imunossupressão dos rebanhos e indiretamente, transmitindo os parasitos mecanicamente. Além disso, acredita-se que a presença dos insetos poderia desencadear as manifestações clínicas da infecção em animais portadores, ajudando também na transmissão, afinal a abundância desses dípteros é concomitante nas áreas com infecção por *T. evansi* da América Latina e África. No Brasil, acredita-se que a adoção de estratégias de controles desses vetores reduziriam as perdas econômicas causadas pela infecção em cavalos em 27 a 91% (Desquesnes, 2004). Um fato interessante a respeito desse inseto é que apenas as fêmeas são hematófagas, já em *Stomoxys sp.* tanto machos, quanto fêmeas realizam hematofagia. Sendo assim, os machos de *Tabanus sp.* não estão inseridos no ciclo de transmissão desse parasito (Hoare, 1972).

Outra mosca hematófaga envolvida na transmissão de *T. evansi* é a mosca dos estábulos (*Stomoxys spp.*). Esse díptero inclusive, já foi responsável pela transmissão do parasito ficar mais restrita a camelos nas Ilhas Canárias, Espanha.

Isso ocorreu devido ao fato de o inseto ser mais atraído por dióxido de carbono do que os tabanídeos da região, então como os camelos produzem mais gás do que os equinos e ruminantes, a transmissão se restringia a esse rebanho (Rodriguez *et al.*; 2014) Essas moscas não possuem preferência por hospedeiros, podendo se alimentar em gado, cavalos, porcos, aves e humanos, provocando uma picada dolorosa, que pode acarretar em alterações de comportamento e perdas na produção. (Dominghetti *et al.*, 2015)

Outra forma de transmissão se dá através de instrumentos contaminados. Essa forma de contaminação iatrogênica ocorre através de fômites no manejo dos animais, como instrumentos cirúrgicos e agulhas (Desquesnes *et al.*, 2013b). *T. evansi* não é considerado uma zoonose, isso porque humanos apresentam uma apolipoproteína 1 (APOL1). Essa lipoproteína de alta densidade promove a fagocitose dos tripanossomas através dos lisossomos, possuindo então importante atividade tripanocida. Até recentemente, o único caso de infecção humana reconhecido era de um fazendeiro indiano, que não apresentava a lipoproteína em seu soro, devido a mutações nos alelos responsáveis pela codificação dessa proteína. No ano de 2015, no Vietnã, uma mulher de 38 anos infectou-se com o parasito e, ainda que não tenha tido nenhum contato com animais ou insetos, relatou ter cortado o dedo com uma faca enquanto cortava carne crua, sendo essa a possível forma de infecção. No entanto, surpreendentemente, nesse relato mais recente da infecção, a paciente não apresentava nenhuma mutação de APOL1, fator associado previamente a susceptibilidade por *T. evansi* no paciente indiano. Ainda nesse mesmo estudo de 2016, a cepa de *T. evansi* tipo A responsável pela infecção da paciente apresentou alto grau de homologia com os parasitos encontrados nos bovinos da região, reforçando a evidência de serem esses animais a provável fonte da infecção (Joshi *et al.*, 2005; Vanhollebeke *et al.*, 2006; Van Vinh Chau *et al.*, 2016).

A transmissão por via oral também é uma importante via de disseminação do parasito, como demonstrado na região do Pantanal, principalmente entre cães, capivaras e quatis, os quais podem se infectar por predação ou como consequência de encontros agonísticos frequentes. Além disso, quatis e capivaras são espécies gregárias e apresentam um comportamento agressivo, podendo transmitir o parasito em sua própria comunidade por via oral através de brigas e contato de sangue de um animal infectado com mucosa oral de outro. Já os cães estão inseridos tanto no

meio silvestre, quanto próximos de outros hospedeiros domésticos, como cavalos e o gado, e tendo essa ligação com os dois ambientes têm um importante papel na epizootiologia da infecção nessas localidades (Herrera *et al.*, 2004). Outro importante tópico sobre a via oral de infecção foi a realização de infecção experimental em cães por Bazzoli e colaboradores (2002) levando à conclusão de que por essa via, o período pré-patente é semelhante à via parenteral encontrado em cães e outras espécies animais infectadas natural ou experimentalmente (Hoare, 1972).

#### 1.2.5 Métodos de diagnóstico

Entre os métodos utilizados para diagnóstico da infecção por *T. evansi* estão a presença do parasito no exame à fresco (de sangue ou de papa de leucócitos – o chamado *buffy coat*), esfregaços corados e inoculação em animais de laboratório. Os dois primeiros, apesar de bastante específicos possuem como ponto negativo a baixa sensibilidade, em especial nos casos de baixas parasitemias. Já a inoculação de animais de laboratório não é um método diagnóstico viável de ser realizado no campo.

Recentemente foi demonstrado que *T. evansi* tipo B (mas não o tipo A) era capaz de ser cultivado em meio de cultura HMI-9 (Hirumi's modified Iscove's medium 9), suplementado com 15% de soro fetal bovino inativado por calor e 5% de soro de cavalo inativado pelo calor (Birhanu *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que a infecção por tipo B é bastante restrita geograficamente e encontrada apenas em camelídeos.

Uma ferramenta sensível e específica a ser considerada como forma de diagnóstico é a Reação em cadeia de polimerase (PCR). Com a utilização dessa abordagem diagnóstica é possível detectar parasitemias de até 1 tripanossoma/mL de sangue (Herrera *et al.*, 2005). Para a realização desse diagnóstico molecular, muitos alvos são propostos, como gene ribossomal (Desquesnes *et al.*, 2001), DNA nuclear satélite específico do subgênero *Trypanozoon* (Masiga *et al.*, 1992), o antígeno de VSG RoTat 1.2, presente na maior parte das cepas de *T. evansi* tipo A (Claes *et al.*, 2004) e minicírculos integrantes do kDNA do parasito, para a identificação de *T. evansi* tipo B (Njiru *et al.*, 2006). Dentre os alvos mais utilizados, o DNA nuclear satélite específico para o subgênero *Trypanozoon* é considerado por muitos autores como padrão ouro para a detecção de DNA desse subgênero, fato corroborado em estudo de 2010 no qual foi feita a comparação com outros alvos e

teve sua sensibilidade comprovada, sendo inclusive indicado para estudos epidemiológicos (Pruvot *et al.*, 2010; Milocco *et al.*, 2013).

Outra importante ferramenta diagnóstica são os testes sorológicos. Esses testes têm como objetivo avaliar a presença de anticorpos contra o parasito, ou um antígeno específico dele, e assim determinar se o animal já foi exposto ao agente infeccioso. Os tipos de testes sorológicos mais conhecidos são: o CATT/*T.evansi*, um teste rápido de aglutinação que detecta anticorpos em resposta ao antígeno de VSG RoTaT 1.2 (Bajyana, Songa e Hammers, 1988; Milocco *et al.*, 2013); Elisa e RIFI. Os dois últimos testes apresentam boa sensibilidade e são muito utilizados, porém possuem como ponto negativo a baixa especificidade e a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomas patogênicos (Aquino *et al.*, 2009).

#### 1.2.6. *Trypanosoma evansi* na América Latina

A entrada de *T. evansi* na América Latina têm uma origem controversa. Enquanto alguns pesquisadores acreditam ter ocorrido no século XV, através de cavalos árabes pertencentes a conquistadores espanhóis, já que até então não havia cavalos nas Américas (Desquesnes *et al.*, 2013a), outros acreditam que essa introdução têm sua origem muito anterior, ocorrido há aproximadamente 37 milhões de anos através de ancestrais infectados de roedores caviomorfos na América do Sul vindos da África, onde possuíam um passado de coevolução com o parasito. A justificativa para esta segunda hipótese é que a viagem de navio feita pelos colonizadores espanhóis era muito longa e os equinos são hospedeiros muito susceptíveis ao parasito, o que nos leva a crer que caso eles estivessem infectados, não resistiram a um transporte e confinamento tão longo e sacrificante (Herrera *et al.*, 2004).

O primeiro relato da presença do parasito nas Américas ocorreu na Ilha de Marajó/PA (Estuário Amazônico) entre os anos de 1827 e 1830, onde pela primeira vez foram observados equinos apresentando sintomatologia característica da infecção. Posteriormente, a infecção foi descrita também nessa mesma região em uma jaguatirica (Shaw, 1977), no Paraguai (1847), Pantanal Brasileiro (1850) e estado do MS (1860), dispersando-se também para Bolívia, Venezuela, Guiana e Colômbia. Apesar do primeiro relato da parasitose ter ocorrido na Região Norte nunca mais se descreveu este parasito nesta região, ainda que epizootias desta

parasitose sejam descritas nos mais variados ambientes desde a Argentina até o Panamá (Desquesnes *et al.*, 2013a).

No Brasil, a infecção é enzoótica no Pantanal mato-grossense e ocorre em surtos esporádicos, podendo haver morbidade alta em algumas regiões e ausência em outras (Dávila *et al.*, 2000). Já houve também relatos de casos no Rio Grande do Sul com surtos em equinos (Rodrigues *et al.*, 2005) e já foram encontrados casos da doença em cavalos de Minas Gerais (Nunes *et al.*, 2012) e capivaras soropositivas para a infecção em São Paulo, ambos estados da região sudeste, uma região não endêmica da infecção (Da Silva *et al.*, 2016).

#### 1.1.7 O bioma amazônico e o estado do Acre

O bioma amazônico é composto por 23 ecorregiões e tem uma área de 4.105.401 km<sup>2</sup>, correspondendo a 48,1% do território brasileiro. A bacia hidrográfica foi considerada para a definição dessas ecorregiões, já que os rios são considerados barreiras sobre a distribuição de plantas e animais da região. Os estados integrantes desse bioma são: Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Roraima e algumas partes do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. Há também terras de países próximos como Guianas, Suriname, Venezuela, Equador e Bolívia (Ministério do Meio Ambiente, 2002).

O estado do Acre era parte do território boliviano até o ano de 1903, quando foi incorporado ao Brasil. Situa-se no extremo oeste da Amazônia brasileira e possui uma área de 164.221,36 km<sup>2</sup>, correspondente a 4% da área amazônica brasileira. Possui como divisas os estados de Amazônia e Rondônia e faz fronteira com os países Peru e Bolívia. Seu relevo é predominantemente composto por rochas sedimentares e seu solo possui uma vegetação natural composta basicamente de dois tipos de florestas: Tropical densa e Tropical aberta. Com o intuito de uma melhor gestão política, o estado foi dividido em cinco áreas: Alto Acre, Baixo Acre, Purus, Tarauacá/Envira e Juruá, que correspondem a microrregiões classificadas pelo IBGE seguindo a distribuição das bacias hidrográficas dos principais rios acreanos. A população do estado é de 669.736 habitantes, na qual sua maioria está concentrada na capital, a cidade de Rio Branco, localizada na região do Baixo Acre (Acre, 2006).

Em relação à biodiversidade, a região do Baixo Acre é a mais impactada por processos de mudanças nos padrões de uso da terra e desmatamento, levando a um processo de fragmentação florestal e ocasionando problemas na fauna como isolamento de espécies e o efeito de borda. O efeito de borda caracteriza-se por mudanças nos padrões de incidência de luz, vento, temperatura e umidade na borda do fragmento florestal, que refletiriam na composição da flora e da fauna local (Acre, 2006; Calouro *et al.*,2010).

### 1.3 Justificativa

No ano de 2014, em Rio Branco/AC, inserido na região norte do Brasil e integrante do bioma amazônico, foi atendido em uma clínica veterinária um cão autóctone apresentando febre recorrente, anemia e grande edema de face. Foi confeccionado um esfregaço sanguíneo e observado pela equipe local vários parasitos flagelados, sem cinetoplasto evidente, com morfologia característica de *T. evansi*. Esse cão veio a óbito e não foi possível coletar outros materiais que confirmassem essa infecção. Houve também relatos de outros cães com sintomatologia semelhante, especialmente em regiões próximas ao ambiente silvestre, onde a presença de quirópteros e capivaras também é relatada. Apesar de *T. evansi*: (i) ser um parasito disperso em várias regiões da América Latina; (ii) ter sido descrita no estado do Pará, também na região norte, a primeira descrição da presença do parasito na América Latina; e (iii) ter sua última descrição do parasito nessa região há 40 anos (1977), não houve nenhum relato posterior da presença de *T. evansi* nessa parte da região Amazônica Brasileira.

Sendo assim, considerando a descrição de como o ciclo do parasito se apresenta em outras localidades do Brasil, a avaliação da possível presença de um ciclo de transmissão de *T. evansi* na região demandaria um estudo que envolvesse: (i) os cães, espécie que desencadeou a suspeita clínica, com alguns animais apresentando sintomatologia e esfregaço sanguíneo compatível com infecção por *T. evansi*; (ii) os morcegos, capazes de atuar tanto como reservatório, quanto como vetores da infecção (no caso dos hematófagos); e (iii) as capivaras, que têm sua presença constantemente relatada na área de estudo e já foram descritas no Pantanal como reservatórios capazes de apresentar altas parasitemias, permanecendo assintomáticas.

Considerando-se a diversidade do bioma amazônico, a escassez de relatos posteriores do parasito nessa região após sua primeira descrição e a presença de cães com sintomatologia positiva, nossa hipótese foi da existência de uma transmissão silenciosa de *T. evansi* na região e que se esta transmissão, se ocorresse, provavelmente envolveria alguma(s) desta(s) três espécies de mamíferos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de *Trypanosoma evansi* em mamíferos de Rio Branco/AC.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1) Coletar material para diagnóstico da infecção por *T. evansi* em cães de duas localidades do município de Rio Branco/AC;
- 2) Diagnosticar a infecção por *T. evansi* em cães e capivaras por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (este último apenas nos cães);
- 3) Realizar o diagnóstico sorológico diferencial frente à infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães e tentar isolamento deste parasito através de culturas de sangue;
- 4) Diagnosticar a infecção por *T. evansi* em amostras de baços de morcegos capturados em Rio Branco/AC;
- 5) Determinar a prevalência e perfis de infecção por *T. evansi* nos mamíferos analisados, correlacionando com os hábitos, localização e distribuição das espécies infectadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de antígeno para Reação de Imunofluorescência Indireta e controle positivo para diagnóstico molecular

Foi utilizado o isolado “cepa D” (MEQU/BR/1995/CPAP-D), proveniente de um cavalo da região sul do Pantanal Mato-grossense, coletado no ano de 1995 (Queiroz, Cabello e Jansen, 2000). Esse isolado foi mantido criopreservado em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos desde então, após passagem *in vivo* em roedores de laboratório.

Os parasitas foram retirados da criopreservação, aquecidos a  $37^{\circ}\text{C}$  e a cultura observada entre lâmina e lamínula para avaliar a viabilidade dos mesmos. Foram observados aproximadamente  $10^7$  parasitos/ml. Estes flagelados foram inoculados em 5 camundongos Swiss Webster e em 2 ratos “Wistar” previamente imunossuprimidos com Ciclofosfamida (200mg/kg) com 48 horas de antecedência. A infecção foi realizada por via intraperitoneal, utilizando-se 0,1 mL (aproximadamente  $10^6$  parasitos) em cada camundongo e 0,2mL (aproximadamente  $2 \times 10^6$  parasitos) nos ratos. Após 72 horas deste inóculo, coletou-se sangue dos camundongos através da cauda, e o conteúdo foi examinado entre lâmina e lamínula no microscópio óptico em aumento de 400x. Observou-se uma alta parasitemia (aproximadamente  $10^8$  parasitas/mL) e assim, os camundongos foram anestesiados com quetamina (0,2 mg) por via intramuscular e o sangue foi coletado por punção cardíaca. A parasitemia dos ratos ainda estava baixa, 72 horas após a infecção experimental.

Ao sangue coletado em tubos contendo EDTA foi adicionado 10% de PSG (Solução tampão de Salina Fosfatada com Glicose) pH 8,0. Este material foi passado em coluna de troca iônica DEAE celulose (Lanham e Godfrey, 1970), centrifugado e lavado a 3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos em PBS pH 7,2 0,15M e posteriormente diluídos em solução de PBS e formol 1%, até que fossem observados cerca de 40 parasitas por campo em microscópio óptico em objetiva de 400x. Com a solução diluída nesta concentração, retirou-se 10 $\mu$ l e depositou-se em cada um dos poços contidos nas lâminas de imunofluorescência deixando-as posteriormente para secar em temperatura ambiente até o dia seguinte para a

fixação dos parasitas. Em seguida, as lâminas foram enroladas em gaze e papel alumínio e armazenadas no freezer a -20°C para utilização nas Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Elevada parasitemia nos ratos foi observada após 96 horas da infecção experimental. Neste momento, foram realizados os mesmos procedimentos de anestesia (na dose de 2 mg) e coleta de sangue previamente descrito para os camundongos. O sangue obtido foi passado também em coluna de troca iônica (como descrito acima) e dos parasitos obtidos, uma parte da massa de parasitos foi colocada em criotubo e armazenada no freezer a -20°C (para posterior extração de DNA), enquanto outra parte foi separada e seguiu os mesmos passos descritos previamente para obtenção de antígeno formolizado. Este antígeno formolizado foi guardado na geladeira em tubo falcon de 50mL, para posterior depósito em lâminas e utilização na RIFI.

### **3.2 Área de estudo**

A área de estudo localiza-se na cidade de Rio Branco (09°57'33,0"S 067°52'23,3" W), pertencente ao bioma amazônico, caracterizada pela tênueinterface entre os ambientes doméstico e silvestre.

O clima acreano é descrito pela classificação de Köppen como sendo equatorial, quente e úmido. Apresenta variações de temperaturas anuais entre 24,5°C e 32°C (máxima), permanecendo uniforme em todo o estado e predominando em toda a região amazônica. Ocorrem duas estações distintas: uma seca (que se inicia no mês de maio e se estende até o mês de outubro) e outra chuvosa (de novembro a abril) (Acre, 2006).

A maioria das coletas foi feita nas imediações do Parque Zoobotânico, localizado no campus da Universidade Federal do Acre (UFAC) e envolveram três espécies de mamíferos: Cães, no mês de agosto de 2015, Morcegos em quatro expedições nos anos de 2014 e 2015 e capivaras em 2015 (Figura 3). Capivaras também foram coletadas no conjunto residencial Chácara Ipê, e em outras três regiões rurais: Fazenda São Raimundo, Fazenda Piracema e Fazenda Catuaba Senador Guiomard.



**Figura 3:** Localizações das coletas nas imediações do Parque Zoológico.

### 3.3 Mamíferos

#### 3.3.1 Cães (*Canis familiaris*)

##### 3.3.1.1 Coleta de sangue e separação do material

As coletas de sangue de cães foram realizadas no mês de agosto de 2015 em duas áreas residenciais: Os bairros Chácara Ipê, localizado na Estrada Dias Martins e Conjunto Universitário, localizado na Avenida Maria José de Oliveira, ambos nas imediações do Parque Zoológico. Também foi confeccionado um questionário para levantar informações como: Nome e idade do animal, sexo, acesso à rua e áreas de mata, histórico de deslocamentos e procedência (ANEXO 1). Foi coletado sangue desses cães utilizando-se de tubos vacutainer contendo EDTA, sendo coletados aproximadamente 4ml de sangue através da venopunção da veia cefálica (Figura 4). A antisepsia consistiu em tricotomia do membro anterior e limpeza com sabonete antisséptico e álcool iodado, visando diminuir a possibilidade de contaminação. Os tubos foram mantidos sob refrigeração e transportados ao laboratório do curso de Medicina Veterinária da UFAC.



**Figura 4 (A, B e C):** Coletas de sangue de cães no Condomínio Conjunto Universitário

No laboratório da UFAC o sangue total obtido de cada animal foi dividido para a realização dos seguintes procedimentos:

1. Foi semeado de 0,6-0,8 ml de sangue em dois tubos contendo meio NNN (Nicoly, Novy, and McNeal) com LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 140 mg/ml do antibiótico Gentamicina – hemocultivo (para diagnóstico de *T. cruzi*) (Rocha *et al.*, 2013);
2. Preenchimento de dois tubos capilares por animal, posterior fechamento dos tubos ao fogo e centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos para determinação do volume globular.
3. Determinação do volume globular (hematócrito), corte do capilar na altura do *buffy coat* (creme leucocitário) e depósito do material entre lâmina e lamínula, acondicionadas em câmara úmida e examinadas em microscópio óptico de luz (exame direto);

4. Confeção de dois esfregaços sanguíneos por animal que foram corados com o kit Panótico Rápido® e examinados em microscópio óptico;
5. Separação de uma outra alíquota do sangue total (300µL) em microtubo contendo Guanidina na proporção de duas partes de Guanidina para uma parte de sangue para posterior realização de diagnóstico molecular;
6. Centrifugação do sangue restante, separação do plasma e armazenamento do mesmo para realização de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

#### 3.3.1.2 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico foi realizado no campo através do exame direto para visualizar formas flageladas no sangue. Para isso, o material obtido após o corte do capilar na altura do *buffy coat* foi depositado entre lâmina e lamínula e visualizado em microscópio óptico no aumento de 400X. Os esfregaços confeccionados no campo foram examinados no LABTRIP, também no aumento de 400X, buscando a visualização de formas tripomastigotas de *T.evansi*.

Os tubos contendo sangue cultivados (2 para cada cão), foram identificados com etiquetas contendo: número da amostra, data, local e responsável(is) pela coleta. Foram mantidos à temperatura ambiente desde o momento de coleta até o transporte ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos- LABTRIP, onde foram armazenadas na estufa entre 26° e 28° C por até cinco meses, sendo observadas a cada 15 dias. Para o exame microscópico das culturas utilizou-se uma pequena gota do sobrenadante dos tubos em cabine de fluxo, por meio da pipeta de vidro de 3mL, dispostas entre lâmina e lamínula, seguindo identificação do tubo, acondicionadas em câmara úmida e observadas no aumento de 400X. Esse procedimento foi realizado visando apenas o diagnóstico de *T. cruzi*, já que *T. evansi* não é cultivável.

#### 3.3.1.3 Avaliação do Volume Globular

No campo, após a centrifugação do capilar de microhematócrito, foi feita a leitura do mesmo frente à tabela de hematócrito, com os valores de referência. O capilar era posicionado com a altura do buffy-coat sobre sua altura correspondente na tabela e, assim determinava-se o valor. Foram feitos dois capilares por animal e a média dos dois foi o valor final. Foram considerados anêmicos os animais que apresentaram volume globular igual ou inferior a 30% (Couto GC, 2010).

#### 3.3.1.4 PCR e Eletroforese do DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*

A extração do DNA de sangue foi realizada dentro de uma cabine de segurança com luz UV (DNA Workstation) em ambiente totalmente separado do lugar onde foram manipulados os produtos amplificados. A extração foi feita com a utilização do kit comercial QIAamp DNA Blood Minit Kit- Quiagen®, seguindo instruções do fabricante. As amostras foram previamente digeridas em solução de lise (Buffer AL) e proteinase K durante 10 minutos em termobloco a 56°C. Posteriormente foi adicionado etanol e os demais reagentes integrantes do kit, conforme as instruções.

A reação de PCR teve o DNA amplificado usando 10pmol/μL dos iniciadores TBR 1 (5'-GAATATTAACAATGCGCAG-3') e TBR 2 (5'-CCATTATTAGCTTTGTTGC-3'), tendo como alvo a região de DNA satélite específica para o subgênero *Trypanozoon* (Masiga *et al.*, 1992), 2 μL do DNA das amostras, tampão 10X PCR Buffer II (Sem MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems, Foster city, Califórnia), 2mM de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos fosfatados), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U/ μL da enzima Taq DNA polimerase recombinante Invitrogen e água MiliQ Ultra Pura, para um volume final de 50μL. Alternativamente, a última reação [que incluiu amostras controle de *T. cruzi* utilizadas na rotina do LABTRIP – TcII (FRN10) e TcI (cutia TcI) para confirmar que as mesmas não amplificariam frente a este marcador] foi realizada utilizando-se a GoTaq G2 Colorless Mastermix® (Promega), que apresenta uma maior concentração dos reagentes para a reação.

As reações foram realizadas em termociclador Esco Swift Max Pro, conforme as seguintes condições de ciclagens, de acordo com Herrera e colaboradores (2004): 95° C durante 5 minutos (desnaturação inicial) e então 35 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), seguido por 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), com um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C.

O produto obtido dessa amplificação foi aplicado em gel de agarose a 2% em TBE 1x (Tris 1,1M; Ácido Bórico 0,9M; EDTA 25mM, pH 8,3), utilizando-se um peso molecular de 50 ou 100 pb (Ludwig Biotec) em cuba de eletroforese horizontal a 70 volts de corrente, durante 60 minutos. Como intercalante de DNA foi utilizado GelRed™. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram presença de banda de 164pb, característica de *T. evansi* e demais espécies do subgênero *Trypanozoon*. Foram utilizados como controles positivos DNA de *T. evansi* da cepa

D em diferentes concentrações (1, 10, 50 ou 100 ng/μL) e o mix da PCR como controle negativo.

Adicionalmente, foi realizada também uma eletroforese em gel de Poliacrilamida, corado com prata, com o intuito de facilitar a visualização de bandas que apresentaram-se fracas quando observadas em gel de agarose 2%. Para isso, foi aplicado 7 μL do produto e dos controles positivo e negativo da reação em mini-géis de poliacrilamida 8%. Esses mini-géis foram colocados na cuba de eletroforese contendo tampão TBE 1x (Tris 0,04M, Ácido Bórico 0,04M e EDTA 0,02M) e submetidos à corrente de 110V, durante 50 minutos. Além das amostras, foi adicionado o marcador de pares de base de 50 pb (Promega, Madison, EUA). Em seguida, os géis foram revelados por nitrato de prata utilizando-se o kit Silver Stain Plus® (Bio Rad, Hercules, EUA). A visualização tanto do gel de agarose 2%, como do gel de poliacrilamida 8% foi realizada no fotodocumentador Gel logic 212 PRO, através do programa Carestream MI SE.

Os produtos amplificados foram purificados com o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante e enviados à Plataforma de Sequenciamento (RPT01A) da Fundação Oswaldo Cruz –RJ. Para a análise das sequências foi utilizado o algoritmo BLAST contra sequências de referências armazenadas no GenBank. A edição e construção das sequências foi realizada no Programa SeqMan- DNA Star.

#### 3.3.1.5 PCR e Eletroforese do gene ribossomal 18S

Para as amostras que foram positivas na PCR de DNA nuclear satélite, foi realizada uma *Nested* PCR da região variável do gene 18S rRNA de *Trypanosoma* sp. (Noyes et al., 1999).

Foi utilizado 16pmol/μL dos iniciadores: TRY927F (5'GAAACAAGAAACACGGGAG3') e TRY927R (5'CTACTGGGCAGCTTGA3'), 100 ng de DNA, tampão 10X PCR Buffer II (sem MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems, Foster City, California), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 1.4U/μl da enzima Taq DNA polimerase recombinante Invitrogen e água para um volume final de 25μl. Alternativamente, a última reação [que incluiu uma amostra controle de *T. cruzi* (cutia TcI)] foi realizada utilizando-se a GoTaq G2 Colorless Mastermix® (Promega), que apresenta uma maior concentração dos reagentes para a reação. A reação ocorreu no termociclador Esco Swift Max Pro, com a seguinte ciclagem: 95°C por 15 minutos (desnaturação),

34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 60 segundos (anelamento), 72°C por 90 segundos (extensão), 72°C por 10 minutos (extensão final). O tamanho do fragmento esperado é de 900 pb.

Em seguida, o produto da primeira amplificação foi diluído na proporção de 1:10 de água deionizada, sendo 45µl de água adicionado a 5 µl do produto amplificado. Logo, 2 µl dessa diluição foram utilizados na segunda etapa da PCR, com os seguintes iniciadores: SSU561F (5'TGGGATAACAAAGGAGCA3') e SSU561R (5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3), seguindo as mesmas condições de ciclagem previamente descritas para a etapa anterior. Também utilizou-se o produto amplificado sem diluir através da adição de 2 µl direto à mix dessa segunda etapa. O tamanho do fragmento esperado nesta segunda etapa é de 700 pb.

A eletroforese seguiu a mesma metodologia já descrita anteriormente para a PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*. O gel de agarose foi visualizado no fotodocumentador Gel logic 212 PRO, através do programa Carestream MI SE.

#### 3.3.1.6 Diagnóstico sorológico

A reação de imunofluorescência indireta foi feita conforme descrito por Camargo (1964): As amostras de plasma testadas foram diluídas em PBS (diluição seriada) de 1:10 a 1:320. Como controle positivo utilizou-se soro de cão naturalmente infectado por *T. evansi* e título de 1:320 e como controle negativo utilizou-se soro de cão livre da infecção por *T. evansi*. Os controles positivos e negativo fazem parte do banco de amostras de soro do LABTRIP.

Colocou-se 10 µL de cada diluição nos poços das lâminas com os antígenos fixados, incubados por 40 minutos, em câmara úmida a 37°C e lavados 3 vezes com PBS, 30 segundos de cada vez. Para a revelação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se conjugado anti-IgG de cão fluoresceinado, adquirido comercialmente (Sigma) que foi diluído em azul de Evans (Sigma) a 10%. As lâminas foram incubadas com conjugado por 40 minutos a 37°C e lavadas 3 vezes com PBS por 30 segundos e montadas em glicerina tamponada 9:1 (Merck pH=8,0).

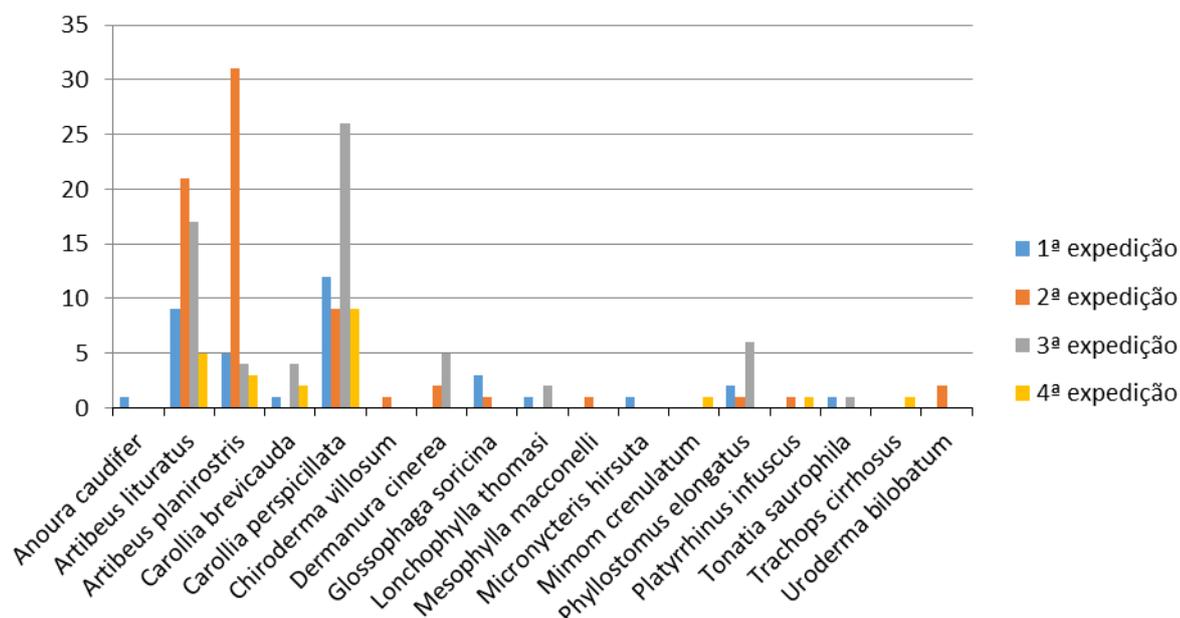
A leitura das lâminas foi realizada em microscópio Zeiss Axioplan com luz ultravioleta 12V50W (Osram, Munique, Alemanha) e a visualização foi feita no aumento de 400X. O resultado foi considerado positivo quando 50% dos parasitas estavam fluorescentes e o título sorológico correspondeu à última diluição da

amostra de soro ou plasma testados que apresentava fluorescência em 50% dos parasitas quando examinada na luz ultravioleta. Foram considerados como reação cruzada quando o título sorológico frente a uma parasitose estava pelo menos 2 titulações acima em comparação com a segunda parasitose. Nestes casos, o animal era considerado infectado frente a primeira parasitose e a segunda reação considerada como reação cruzada.

### 3.3.2 Quirópteros

As capturas de quirópteros foram realizadas em três áreas da Universidade Federal do Acre (UFAC) pertencentes ao Parque Zoobotânico (PZ) com área de aproximadamente 150 hectares (Calouro *et al.*, 2010) e situada a oeste do Campus Universitário. Foram definidos três pontos de coleta dentro de um gradiente de preservação: No primeiro ponto (A1), denominado de Terra Firme, a principal característica é a presença de floresta de dossel fechado e vegetação aberta na parte inferior, que permite uma visão horizontal a longa distância. O segundo ponto (A2), foi denominado Baixio e localiza-se em áreas de planícies alagadiças no período de inverno amazônico e com vegetação com alta diversidade de palmeiras. O terceiro ponto (A3), denominou-se Área aberta (Granja) e localiza-se em área de plantio de seringueiras, próximo a uma granja, na área experimental da UFAC e adjacente aos bairros Ipê e Universitário.

Para as coletas dos morcegos foram realizadas quatro excursões dentro do projeto de doutorado de Francisco Charles Bezerra dos Santos, intitulado: “Importância de quiróptera na manutenção de espécies do gênero *Trypanosoma* (*Schyzotrypaum*), Tripanosomatidae no estado do Acre”. Essas coletas ocorreram em: 2014 (março e agosto) e no ano de 2015 (junho e novembro), com seis noites de captura em cada expedição. As capturas foram feitas com a utilização de redes de neblina (modelo mist-net) de malha de 35mm e tamanho de 3m x 12m. Foram utilizadas 10 redes por noite, dispostas nos locais de captura a 50 cm de altura do solo, durante 6 horas em cada noite e verificadas a cada 1 hora, que eram colocadas após o pôr-do-sol do início da noite, das 18 horas até meia noite (Kunz *et al.*, 1996). A riqueza de espécies encontrada na quatro expedições está ilustrada na figura 5:



**Figura 5:** Gráfico da riqueza de espécies de morcegos coletadas nas expedições de 2014 e 2015

### 3.3.2.1 Coleta de material biológico para diagnóstico molecular

Os espécimes capturados eram manuseados e contidos mecanicamente, com o auxílio de luvas de couro e soltos da rede. Fêmeas identificadas como gestantes e/ou lactantes foram soltas no mesmo lugar. Em seguida, os morcegos eram colocados individualmente em sacos de pano e transportados ao laboratório de campo para realização de coleta de dados, como biometria, pesagem e etiquetagem.

Para identificação no laboratório foram utilizadas chaves específicas (Emmons e Feer, 1997; Simmons e Voss, 1998; Eisenberg e Redford, 1999; Lim e Engstrom, 2001; Gardner, 2007; Díaz, 2011), considerando-se as características dos espécimes analisados e respeitando-se os critérios de cada grupo. A chave simplificada para identificação das espécies de morcegos está no Anexo 2.

Os morcegos capturados foram anestesiados utilizando-se cloridrato de quetamina na dose de 100mg/kg em associação com acepromazina 1%, numa proporção de 9:1, por via intramuscular (IM). A dosagem era determinada de acordo com o peso do animal, sendo 0,1 mL para cada 100 gramas de peso.

Posteriormente, os espécimes foram eutanasiados, através da administração de Cloreto de Potássio 19,1% por via intracardíaca (2ml/kg) para coleta de material

visando o diagnóstico da infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. como parte integrante da tese de doutorado citada acima. Para a obtenção de fragmento de baço a ser utilizada no diagnóstico molecular a cavidade abdominal foi aberta e retirou-se um pequeno fragmento do órgão e esse fragmento foi colocado em um eppendorf com etanol absoluto e mantido a -20°C.

### 3.3.2.2 PCR e Eletroforese do DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*

A extração do DNA dos tecidos foi realizada dentro de uma cabine de segurança com luz UV (DNA Workstation) em ambiente totalmente separado do lugar onde foram manipulados os produtos amplificados. Primeiramente, os baços que foram coletados e colocados em etanol absoluto foram reidratados com a adição de água MiliQ, lavados três vezes e secos em papel filtro. Posteriormente, foi iniciada a extração utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification, da Promega, Madison, EUA, seguindo instruções do fabricante. Brevemente, um pedaço medindo entre 0,5 – 1 cm foi cortado com lâmina de bisturi e colocado em microtubo de 1,5 mL estéril contendo solução de lise nuclear e proteinase K (20mg/mL) e deixado na temperatura de 56°C durante 3 horas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em solução de precipitação proteica, isopropanol, etanol absoluto e etanol 70%, intercaladas em 3 centrifugações. Ao final, o DNA foi reidratado com solução específica para esse fim, integrante do kit, no volume de 100µL e colocado no termobloco por 1 hora à 65°C, para então ser estocado no freezer na temperatura de -20°C.

Os alvos moleculares (TBR e 18S), condições de ciclagem, eletroforese e visualização dos resultados seguiram os mesmos procedimentos descritos acima para os cães.

### 3.3.3 Capivaras

As capturas das capivaras foram realizadas no ano de 2015 em cinco regiões de Rio Branco: Campus da UFAC (S 09°57'33,0"; W 067°52'23,3") e bairro Chácara Ipê (S 09°57'51,4"; W 067°52'14,9") e três fazendas: Fazenda São Raimundo Rio Branco, com localização na estrada do Panorama (S 09°56'49,7"; W 067°44'09,4"), Fazenda Piracema Rio Branco, localizada na rodovia AC 90, Km 12 (S 10°00'39,7" ; W 067°56'14,9") e Fazenda Catuaba Senador Guiomard (S 10°03'42,6" ; W

067°36'07,3"). As propriedades rurais foram escolhidas devido ao convívio próximo das capivaras com bovinos, bubalinos e equinos. Já as áreas urbanas foram selecionadas em consequência da frequente observação desses roedores nas proximidades de açudes da UFAC, onde também é comum a aproximação de estudantes e visitantes. O condomínio Chácara Ipê localiza-se próximo ao campus da UFAC e observa-se com frequência a presença de capivaras nas proximidades das residências.

As coletas com capivaras foram feitas em gentil parceria com a professora Dra. Vania Maria França Ribeiro e seus alunos Itacir Olivio Farikosky e Adriana Rossi da UFAC.

### 3.3.3.1 Coleta de material biológico

Os animais foram atraídos com a utilização de cevas confeccionadas em cercados feitos de tela de alambrado e estacas de madeira (9x12 metros), fechados com porta tipo guilhotina, onde eram diariamente colocados sal mineral e outros alimentos palatáveis para a espécie. Com a entrada do roedor no interior da ceva para realizar sua alimentação, um gatilho de desarme, que sustentava a porta da estrutura era acionado, ocorrendo a contenção. As capivaras possuem hábito de alimentação ao final da tarde, então elas pernoitavam na ceva, para indução de jejum hídrico e alimentar. No dia seguinte, os animais eram capturados com puçás, para uma breve contenção física, seguida da contenção química que consistia na associação de azaperone 1,0 mg/kg, quetamina 12 mg/kg e diazepam 0,1mg/kg administrados por via intramuscular (King, Congdon e Tosta, 2010). Em seguida, os animais foram identificados por microchip colocado por via subcutânea na região do pescoço do animal, a cerca de 5 centímetros atrás do pavilhão auricular esquerdo (região padronizada para facilitar a localização do mesmo).

Para a coleta de sangue periférico, utilizou-se uma agulha descartável estéril e realizou-se uma pequena perfuração na orelha, para confecção de esfregaço sanguíneo, que posteriormente foi fixada por cinco minutos em metanol e levada ao Laboratório de Apoio a Vida Silvestre na Unidade de Ensino e Pesquisa de Medicina Veterinária da UFAC, onde eram coradas por com o Kit Panótico rápido® e enviadas ao LABTRIP. A análise após chegada ao LABTRIP seguiu a mesma metodologia já descrita anteriormente para os cães.

Também foi realizada a coleta de sangue através da veia cefálica ou femural, com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Posteriormente, o sangue obtido foi depositado em microtubos, e acondicionados em caixas térmicas até que fossem transportados ao Laboratório de Apoio à Vida Silvestre da UFAC (tempo de aproximadamente 1 hora). No laboratório, o sangue total foi centrifugado a 3000 rpm, o plasma separado, congelado à -20°C e enviado ao LABTRIP.

### 3.3.3.2 Obtenção de IgG total de *Thrichomys sp.* para realização de diagnóstico sorológico

Para a realização das RIFI utilizando-se um conjugado anti-roedor caviomorfo, foi necessário primeiramente a obtenção de IgG total de coelhos, previamente imunizados com IgG do roedor caviomorfo *Thrichomys sp.*, já que por tratar-se de animal silvestre não há conjugado comercial disponível. Esse processo foi realizado de acordo com Jansen e colaboradores (1985).

#### 3.3.3.2.1 Imunização de coelhos

Dois coelhos da raça Nova Zelândia foram imunizados em 3 ocasiões, por via intradérmica, em 4 pontos na região interescapular com o antígeno IgG anti-*Trichomys* associado à adjuvante de Freund no volume de 1mL. Antes do procedimento, em todas as imunizações, os animais foram pesados para padronização da dosagem de proteína. O adjuvante de Freund, quando completo, induz uma alta produção de anticorpos, pois a bactéria contida nele (*Mycobacterium tuberculosis*) atua como estimulante do sistema imune. As imunizações ocorreram da seguinte forma:

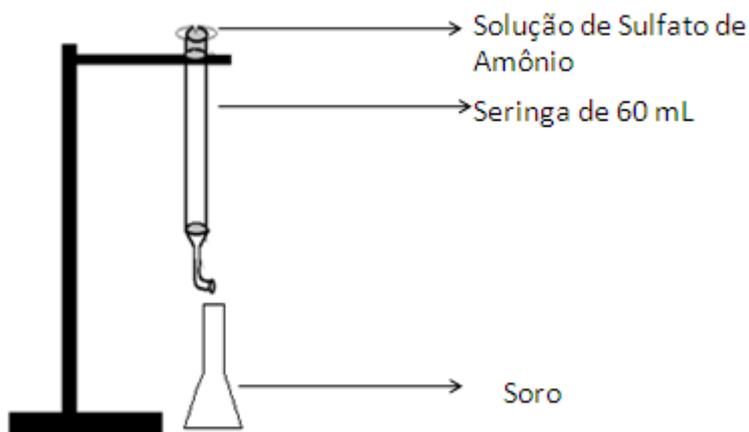
- **1ª imunização:** 1,5 mg/mL do antígeno em associação ao adjuvante completo de Freund, na proporção de 1:1 (ACF – SIGMA cod. F-5881)
- **2ª imunização:** Ocorreu 6 semanas após a primeira imunização. Utiliza-se o adjuvante incompleto de Freund associado a 1,5mg/mL do antígeno na mesma proporção usada anteriormente.
- **3ª imunização:** Realizada 10 dias depois da 2ª imunização. Utilizou-se 5mg/mL do antígeno associado ao adjuvante incompleto de Freund na proporção usada anteriormente.

Após as imunizações, foi coletado sangue dos coelhos pela punção da veia auricular e feito o teste de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony. No teste a titulação obtida foi superior a 1:64, sendo considerada uma boa titulação. Os coelhos foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e acepromazina na proporção de 9:1 e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados, através da administração de Cloreto de Potássio 19,1% por via intracardíaca (2ml/kg).

#### 3.3.3.2.2 Obtenção de IgG Total de *Thrichomys sp.*

O sangue foi centrifugado à 3000 rpm na temperatura de 4°C por 15 minutos e o soro foi armazenado no freezer na temperatura de -20°C.

Após 24 horas, o soro obtido foi descongelado na bancada sobre gelo e colocado em um Erlenmeyer. Foi montada uma coluna, conforme demonstrado na Figura 6, onde no interior da seringa continha o mesmo volume de Sulfato de Amônio que o soro. O propósito do Sulfato de amônio é provocar a precipitação das proteínas.



**Figura 6:** Representação de coluna para precipitação de proteínas plasmáticas.

Decorrido todo o gotejamento do Sulfato de amônio de forma vagarosa, os Erlenmeyers foram guardados na geladeira durante 24 horas. Após as 24 horas, observou-se a ocorrência de precipitação de proteínas no conteúdo eluído da coluna, sendo assim, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o pellet foi centrifugado por duas vezes a 3000 rpm durante 20 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, o material foi colocado em sacos de diálise imersos em solução de PBS

0,015M no volume de 1,5 L e armazenados em geladeira durante 3 dias, ocorrendo a troca da solução de PBS 0,015M duas vezes ao dia.

Posteriormente, o conteúdo do saco de diálise foi depositado em um tubo falcon de 25 mL e levado para dosagem de proteína no Nanodrop, sendo obtidos os valores de 29,86 e 21,46 mg/mL para proteínas totais e fração IgG, valores considerados satisfatórios para ocorrer em sequência o processo de conjugação por FIX e Peroxidase em parceria com o Dr. Edmilson Domingos da Silva, de Biomanguinhos/Fiocruz.

#### 3.3.2.4 Diagnóstico Sorológico

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada da mesma forma que a descrita para os cães, porém utilizou-se o conjugado do roedor caviomorfo *Thrichomys sp.* A reação foi feita para investigar a presença de anticorpos IgG anti-*T. evansi* e IgG anti-*T. cruzi*. Foi utilizado controle positivo de *Thrichomys sp.* com alta titulação frente a infecção por *T. cruzi* (e reativo por reação cruzada em proporção de 1:80 a 1:160 frente a antígeno de *T. evansi*) e controle negativo de *Thrichomys sp.* não infectado.

Alternativamente, apesar de não dispomos de controles positivo de porquinho da Índia (*Guinea Pig – Cavia sp.*) infectado por *T. evansi*, submetemos os plasmas das capivaras a RIFI utilizando um conjugado comercial anti-IgG de Guinea Pig, por ser da mesma família Caviidae que as capivaras (e, portanto, filogeneticamente mais próximas que os *Thrichomys*, que são da mesma subordem Hystricognathi, mas da família Echimyidae). Como controle negativo, foi utilizado soro de porquinho da Índia obtido junto ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz). A reação foi realizada utilizando-se a menor diluição do conjugado preconizada pelo fabricante (1:10) e, dada a impossibilidade de obter controle positivo na reação (ausência de soro de capivaras ou *Cavia sp.* experimentalmente infectadas por *T. evansi*), consideramos as titulações de 1:10 e 1:20 como faixa indeterminada e positivas apenas as reações com títulos maiores ou igual a 1:40

#### 3.2.4 Aspectos éticos:

Todos os procedimentos realizados com cães e morcegos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Ceua/Fiocruz), sob licença LW- 81/12. Os procedimentos realizados com ratos e camundongos foram aprovados sob a licença 18/2015.

As atividades de captura e eutanásia dos quirópteros foram realizadas sob as licenças 44089-1, em nome de Richarlly da Costa e Silva (coletas de 2014) e 47377, em nome de Francisco Chagas Bezerra dos Santos (coletas de 2015), fornecidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade –ICMBio .

A captura e coleta de sangue de capivaras foram autorizadas pelo ICMBio através de seu Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade – SISBio número 44791-1. Foi analisado também pelo Comitê de Ética do uso de Animais da Universidade Federal do Acre – CEUA/UFAC 23107.016723/2014-41. A pesquisa sobre hemoparasitas em capivaras é vinculada a um projeto que abrange diversas zoonoses, intitulado: “A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) da Amazônia Ocidental como possível reservatório de agentes etiológicos causadores de zoonoses.”

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Mamíferos

#### 4.1.1 Cães (*Canis familiaris*)

Foi coletado sangue de 78 cães, entre final de julho e início de agosto de 2015, sendo 18 deles residentes do condomínio Chácara Ipê (23,1%), 49 do condomínio Conjunto Universitário (62,8%) e 11 da Estrada Dias Martins (14,1%). Todas essas áreas localizam-se próximas ao Parque Zoobotânico e ao Campus da UFAC. Entre os animais estudados, 37 eram fêmeas (47,4%) e 41 eram machos (52,6%).

Através da análise do questionário empregado, o contato com outros possíveis reservatórios de *T. evansi* como capivaras ou morcegos foi reportado em 39 animais (50%), sendo 15 relatos de contato de cães com capivaras (19,2%), 16 de contato com morcegos (20,5%) e 8 relatos de animais com contato com ambos (10,3%). Outras condições que favoreceriam a infecção como o hábito de caça e acesso à rua foram reportadas em 24 (30,7%) e 39 cães (50%), respectivamente. Essas informações estão assinaladas com um X na Tabela 1.

Comparando-se as localidades, todos os animais da Chácara Ipê (n=18) e Estrada Dias Martins (n=11) relataram contato com possíveis reservatórios e apenas 10 (20,4%) cães do Conjunto Universitário apresentaram este mesmo comportamento. O acesso à rua foi descrito em 10 cães do condomínio Chácara Ipê (55,5%), 18 (36,7%) do Conjunto Universitário e todos os animais da Estrada Dias Martins. Na Chácara Ipê, 14 animais (77,7%) possuíam hábito de caça, enquanto apenas 10 (20,4%) apresentavam essa característica no Conjunto Universitário. Nenhum animal tinha esse hábito na Estrada Dias Martins. Essas informações estão assinaladas com um X na Tabela 1.

As características e hábitos dos cães, coletadas através do questionário, de acordo com a moradia estão demonstradas na Tabela 2.

#### 4.1.1.1 Diagnóstico

Foram realizadas análises de volume globular, diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular e o resultado dessas análises está na Tabela 2

#### 4.1.1.1.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico consistiu de exame à fresco, hemocultivo (visando detectar infecção por *T. cruzi*) e análise de esfregaço sanguíneo. Todas as amostras dos 78 cães analisados foram negativas.

#### 4.1.1.1.2 Volume globular

Na análise do volume globular, dos 78 animais integrantes do estudo, 7 apresentavam volume globular inferior a 30%, indicativo de anemia (9,0%) (Couto, G.C., 2010). Destes 7 cães, 4 eram moradores do Conjunto Universitário (57,1%) e 3 eram moradores do Condomínio Chácara Ipê (42,9%). Em relação ao sexo desses animais, 4 eram machos (57,1%) e 3 eram fêmeas (42,9%). O contato com possíveis reservatórios da infecção por *T. evansi* foi descrito em 3 animais (42,9%), o hábito de caça estava presente em 4 animais (57,1%) e o acesso à rua foi relatado em 2 cães (28,6%).

#### 4.1.1.1.3 Diagnóstico sorológico

Foi realizada RIFI em plasma de 73 cães, já que não foi obtido sangue suficiente para a análise em 5 animais. Dentre os animais analisados na RIFI, 16 (21,9%) apresentaram resultado positivo (titulação igual ou superior a 1:40) frente à infecção por *T. evansi*, sendo 56,2% fêmeas e 43,8% machos. Destes 16 cães, 10 foram considerados negativos frente a infecção por *T. cruzi*. Dentre os 5 cães que apresentaram titulação de 1/80 frente a infecção por *T. evansi*, dois deles estavam negativos frente a infecção por *T. cruzi*. Dois animais (2,6%), um infectado por *T. evansi* e outro com provável infecção mista com *T. cruzi* apresentaram volume globular inferior à 30% (22,5 e 27%, respectivamente), caracterizando anemia.

Também avaliou-se a exposição à infecção por *T. cruzi* como forma de detectar possíveis reações cruzadas frente a infecção por *T. evansi*. Foi confirmada a circulação desse parasito na área de estudo, uma vez que 19 animais (26,0%) apresentaram reações positivas frente a infecção por *T. cruzi*, sendo que em 13 deles (68,4%) a sorologia frente a infecção por *T. evansi* foi negativa. Dentre esses cães, 1 (5,2%) apresentava volume globular igual a 30%. Seis animais (8,22%) apresentaram sorologia positiva frente a ambas as infecções.

**Tabela 1:** Informações dos cães analisados obtidas pelo questionário aplicado durante o estudo realizado em Rio Branco/AC (Anexo 1)

<b>Cães</b>					
<b>ID da amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Moradia</b>	<b>Contato com morcegos e/ou Capivaras</b>	<b>Hábito de caça</b>	<b>Acesso à rua</b>
LBT6591	M	Chácara Ipê	X		
LBT6592	M	Chácara Ipê	X		
LBT6593	F	Chácara Ipê	X		
LBT6594	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6595	M	Chácara Ipê	X		
LBT6596	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6597	F	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6598	F	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6599	F	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6600	F	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6601	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6602	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6603	F	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6604	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6605	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6606	M	Estr. Dias Martins	X		X
LBT6607	M	Conjunto Universitário	X		X
LBT6608	M	Conjunto Universitário	X		X
LBT6609	F	Conjunto Universitário			X
LBT6610	F	Conjunto Universitário			X
LBT6611	F	Conjunto Universitário			
LBT6612	M	Conjunto Universitário			X
LBT6613	M	Conjunto Universitário			
LBT6614	F	Conjunto Universitário			
LBT6615	M	Conjunto Universitário			
LBT6616	M	Conjunto Universitário			
LBT6617	M	Conjunto Universitário	X		
LBT6618	M	Conjunto Universitário			
LBT6619	F	Conjunto Universitário	X		X
LBT6620	F	Conjunto Universitário			
LBT6621	F	Conjunto Universitário			
LBT6622	F	Conjunto Universitário			X
LBT6623	F	Conjunto Universitário			
LBT6624	F	Conjunto Universitário	X		
LBT6625	M	Conjunto Universitário	X		
LBT6626	F	Conjunto Universitário	X		
LBT6627	M	Conjunto Universitário			
LBT 6628	M	Conjunto Universitário			
LBT6629	F	Conjunto Universitário			
LBT6630	M	Conjunto Universitário			
LBT6631	M	Conjunto Universitário			
LBT6632	M	Conjunto Universitário			
LBT6633	F	Chácara Ipê	X	X	
LBT6634	F	Chácara Ipê	X	X	
LBT6635	M	Chácara Ipê	X	X	
LBT6636	F	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6637	F	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6638	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6639	M	Chácara Ipê	X	X	
LBT6640	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6641	F	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6642	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6643	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6644	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6645	M	Chácara Ipê	X	X	X
LBT6646	F	Conjunto Universitário			X
LBT6647	F	Conjunto Universitário		X	
LBT6648	M	Conjunto Universitário		X	X
LBT6649	M	Conjunto Universitário			X
LBT6650	F	Conjunto Universitário			X
LBT6651	F	Conjunto Universitário			X
LBT6652	F	Conjunto Universitário			

LBT6653	M	Conjunto Universitário		X	
LBT6654	F	Conjunto Universitário		X	
LBT6655	F	Conjunto Universitário		X	X
LBT6656	M	Conjunto Universitário	X		X
LBT6657	M	Conjunto Universitário	X	X	X
LBT6658	F	Conjunto Universitário	X	X	X
LBT6659	F	Conjunto Universitário		X	X
LBT6660	F	Conjunto Universitário		X	
LBT6661	F	Conjunto Universitário		X	X
LBT6662	M	Conjunto Universitário			
LBT6663	F	Conjunto Universitário			
LBT6664	F	Conjunto Universitário			
LBT6665	M	Conjunto Universitário			
LBT6666	M	Conjunto Universitário			
LBT6667	F	Conjunto Universitário			
LBT6668	F	Conjunto Universitário			

**Tabela 2:** Características e hábitos dos cães analisados de acordo com a localização de suas moradias.

Cães (N =78)			
Localidade/Característica do cão	Contato com morcegos e/ou capivaras	Acesso à rua	Hábito de caça
Chácara IpêN=18	100%	55,5%	77,7%
Estrada Dias Martins N= 11	100%	100%	0
Conjunto Universitário N=49	20,4%	36,7%	20,4%

**Tabela 3:** Resultado das análises executadas nos cães oriundos de Rio Branco/AC: Volume globular obtido com microhematócrito, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) frente a infecções por *T. evansi* e *T. cruzi* e Diagnóstico molecular frente a infecção por *T. evansi* utilizando os iniciadores TBR1 e TBR2 (Masiga *et al.*, 1992).

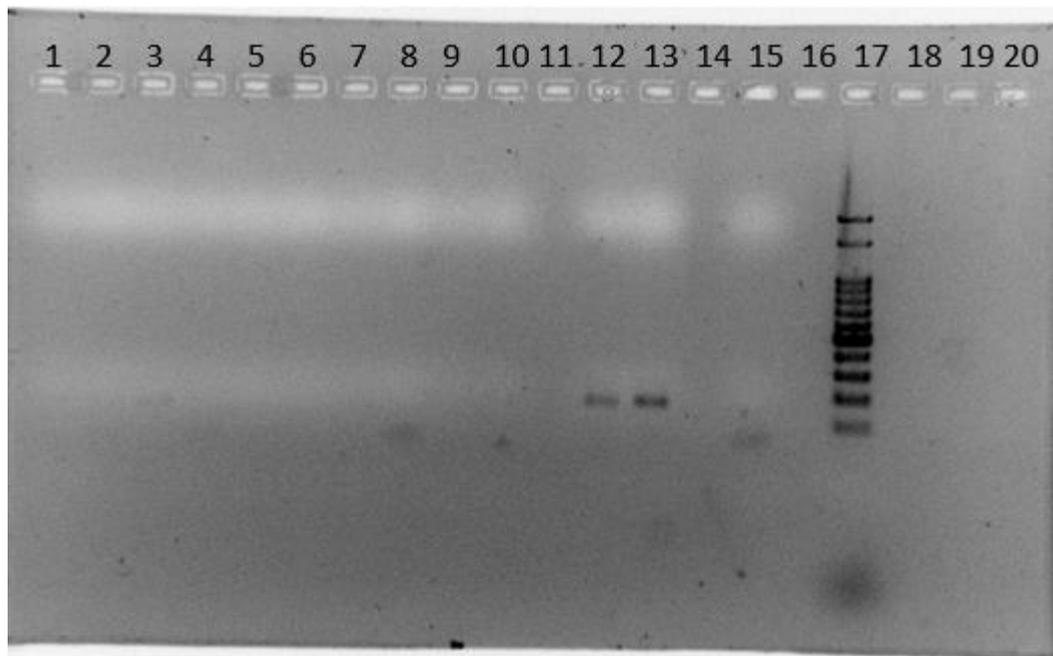
Cães				
ID da amostra	Volume globular	RIFI ( <i>T.evansi</i> )*	RIFI ( <i>T.cruzi</i> )*	Molecular
LBT6591	45	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6592	48	Negativo	1/80 (Positivo)	Negativo
LBT6593	50	1/10	1/20	Positivo
LBT6594	48	Negativo	1/10	Negativo
LBT6595	35	1/10	1/20	Negativo
LBT6596	46	1/20	Negativo	Negativo
LBT6597	NR	Negativo	1/160 (Positivo)	Negativo
LBT6598	NR	1/80 (Positivo)	1/10	Negativo
LBT6599	40	Negativo	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6600	34,5	1/80 (Positivo)	Negativo	Negativo
LBT6601	40,5	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6602	31	Negativo	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6603	38	1/20	1/20	Negativo
LBT6604	43,5	1/10	1/80 (Positivo)	Negativo
LBT6605	36,5	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6606	36,5	1/40 (Positivo)	Negativo	Negativo
LBT6607	38,5	Negativo	1/20	Negativo
LBT6608	41	Negativo	1/20	Negativo
LBT6609	31	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6610	33	Negativo	1/20	Negativo
LBT6611	35	1/20	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6612	39	1/10	1/10	Negativo
LBT6613	22,5	1/80 (Positivo)	1/80 (Positivo)	Negativo
LBT6614	30	1/20	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6615	39	Negativo	1/80 (Positivo)	Negativo
LBT6616	31,5	1/40 (Positivo)	1/10	Negativo
LBT6617	42	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6618	43,5	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6619	35	1/80 (Positivo)	1/160 (Positivo)	Negativo
LBT6620	40,5	1/40 (Positivo)	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6621	33	NR	NR	Negativo
LBT6622	41	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6623	32,5	1/20	Negativo	Negativo
LBT6624	35	1/80 (Positivo)	1/160 (Positivo)	Negativo
LBT6625	39	1/20	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6626	43	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6627	47,5	1/20	Negativo	Negativo
LBT6628	33,5	Negativo	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6629	42	Negativo	1/40 (Positivo)	Negativo
LBT6630	33	1/20	1/20	Negativo
LBT6631	46	1/10	1/40 (Positivo)	Negativo

LBT6632	46	1/20	Negativo	Negativo
LBT6633	42	NR	NR	Negativo
LBT6634	39	<b>1/40 (Positivo)</b>	1/10	Negativo
LBT6635	41,5	1/20	Negativo	Negativo
LBT6636	52,5	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6637	33	1/20	Negativo	Negativo
LBT6638	47	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6639	25	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6640	42,5	<b>1/40 (Positivo)</b>	<b>1/40 (Positivo)</b>	Negativo
LBT6641	40	<b>1/40 (Positivo)</b>	Negativo	Negativo
LBT6642	40	1/20	<b>1/40 (Positivo)</b>	Negativo
LBT6643	28,5	Negativo	1/10	Negativo
LBT6644	27	<b>1/40 (Positivo)</b>	1/20	Negativo
LBT6645	34	<b>1/40 (Positivo)</b>	<b>1/40 (Positivo)</b>	Negativo
LBT6646	48	NR	NR	Negativo
LBT6647	44	1/20	1/10	Negativo
LBT6648	40	1/10	Negativo	Negativo
LBT6649	50	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6650	42	1/20	Negativo	Negativo
LBT6651	45	Negativo	1/10	Negativo
LBT6652	46,5	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6653	47	<b>1/40 (Positivo)</b>	1/20	Negativo
LBT6654	54	<b>1/40 (Positivo)</b>	1/10	Negativo
LBT6655	49,5	Negativo	1/20	Negativo
LBT6656	48	1/10	1/20	Negativo
LBT6657	40,5	1/20	1/20	Negativo
LBT6658	38	1/10	1/10	Negativo
LBT6659	53	1/20	Negativo	Negativo
LBT6660	29,5	Negativo	1/10	Negativo
LBT6661	41	1/20	Negativo	Negativo
LBT6662	36	NR	NR	Negativo
LBT6663	43	Negativo	Negativo	Negativo
LBT6664	39	1/10	Negativo	Negativo
LBT6665	33	NR	NR	Negativo
LBT6666	39	1/20	1/10	Negativo
LBT6667	33,5	<b>1/40 (Positivo)</b>	1/20	Negativo
LBT6668	23,5	Negativo	Negativo	Negativo

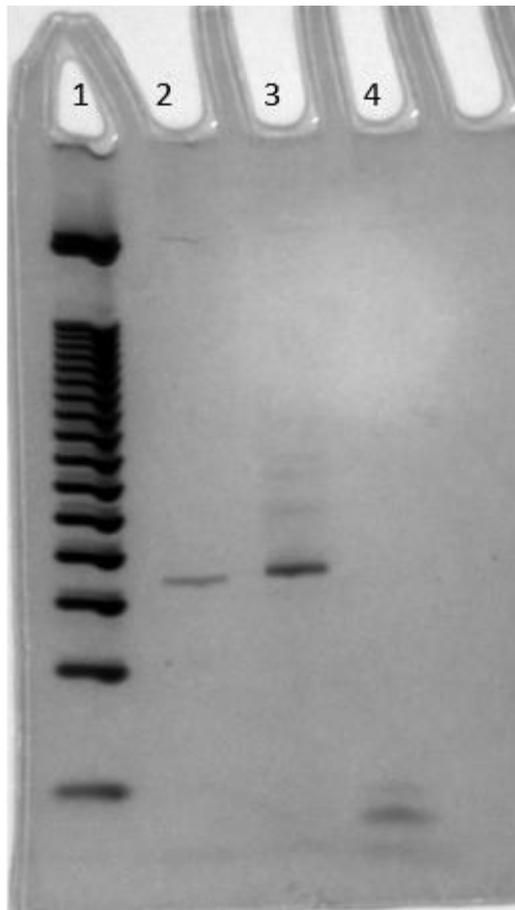
\* são consideradas positivas as reações com titulação maior ou igual a 1/40

#### 4.1.1.1.4 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular foi realizado PCR de DNA satélite do subgênero *Trypanozoon* em 78 amostras de sangue total em guanidina. Desse total, apenas um cão foi positivo (LBT6593), apresentando a banda esperada, de aproximadamente 164pb (Figuras 7 e 8). Essa amostra e os controles de 10 e 100 ng foram purificadas e enviadas para o sequenciamento pela Plataforma de Sequenciamento (RPT01A) da Fiocruz. Este cão era uma fêmea da Chácara Ipê que, surpreendentemente, não apresentava anemia e nem foi positiva nos diagnósticos parasitológico e sorológico. Para uma melhor visualização da banda obtida, a amostra também foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata (Figura 8).

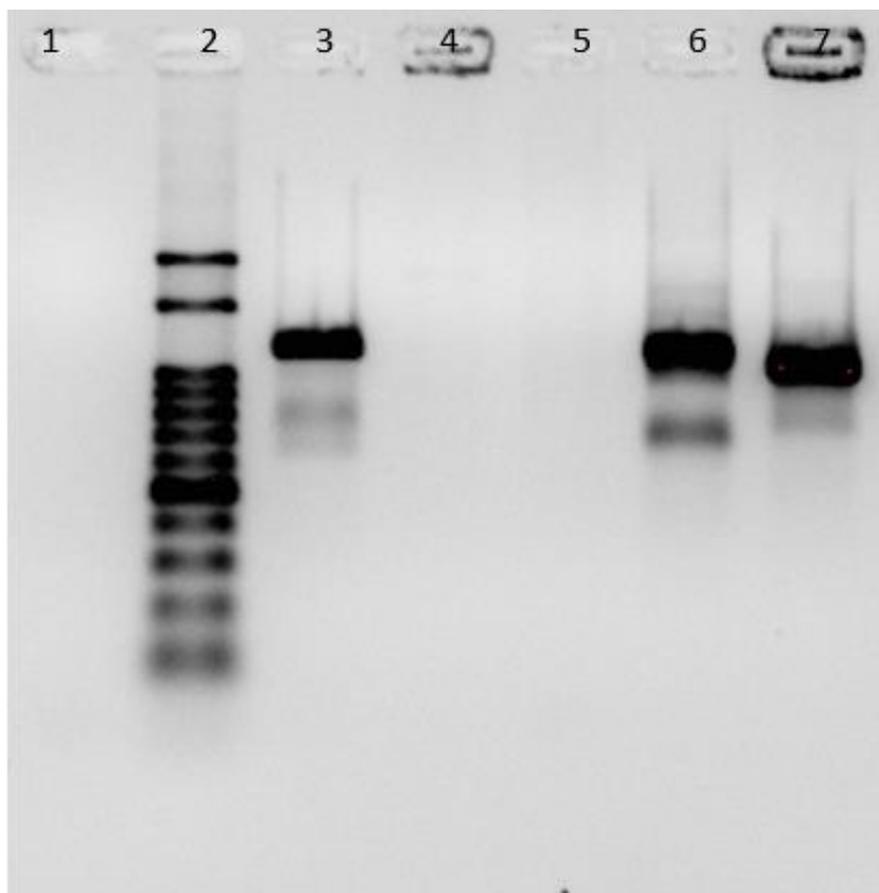


**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*. Amostras negativas - 1,2,4,5,6,7,8,9,10,11; Amostra 3 positiva de cão (LBT 6593) – banda fraca; 12) Controle positivo 10 ng; 13) Controle positivo 1 ng; 15) Controle negativo; 16) vazio e 17) marcador de pares de bases de 100pb.



**Figura 8:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*. 1) Marcador de pares de base de 50pb; 2) Amostra positiva de cão (LBT 6593); 3) Controle positivo de 1ng; 4) Controle negativo.

Esta amostra positiva foi submetida à PCR do gene 18S, onde apresentou um tamanho de banda um pouco maior que a banda esperada de aproximadamente 700pb (Figura 9). O controle positivo de *T. evansi* apresentou o mesmo padrão de tamanho de banda, enquanto o controle de *T. cruzi*, utilizando uma cepa de referência de *T. cruzi* DTU TcI, apresentou o tamanho esperado de banda de 700pb.



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR do gene ribossomal 18S. 1) Controle negativo; 2) Marcador de pares de base de 50pb; 3) Amostra positiva de cão (LBT 6593); 4) Amostra positiva de morcego (LBT 4989); 5) Amostra positiva de morcego (LBT5366); 6) Controle positivo de *T.evansi* de 100ng; Controle positivo de DTU TCI.

As amostras referência de *T. cruzi* (DTUs I e II) não amplificaram quando submetidas à reação de PCR utilizando os iniciadores específicos de *Trypanozoon* (TBR) (dados não mostrados). O resultado do sequenciamento para os iniciadores TBR da amostra de cão (LBT 6593) apresentou similaridade com DNA satélite de *T. brucei* (K00392.1), com cobertura de 90% e identidade de 89% para um fragmento de 102 pb.

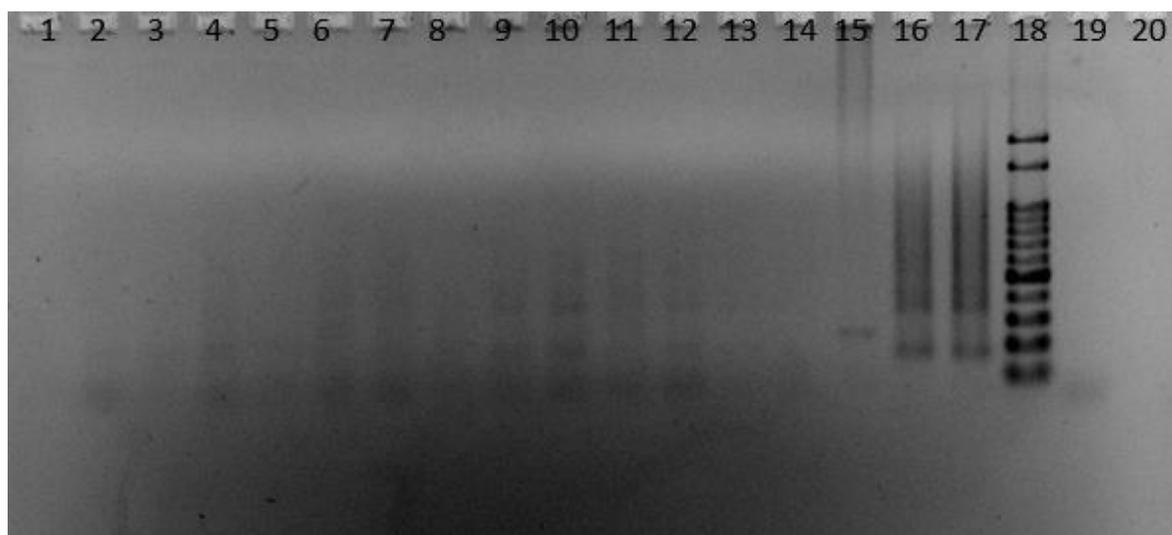
Os controles também foram enviados para sequenciamento e as sequências obtidas foram analisadas. O controle de 10 ng apresentou similaridade com *T. brucei gambiense* DAL 972 chromosome 3 (FN554966.1), com cobertura de 85% e identidade de 90% e o controle de 100 ng apresentou como resultado a mesma sequência similar, porém com cobertura de 100% e identidade de 96%, para um fragmento de 168 pb.

## 4.1.2 Quirópteros

### 4.1.2.1 Diagnóstico molecular

Durante as quatro expedições, realizadas nos anos de 2014 e 2015 em Rio Branco, foram coletados um total de 193 espécimes de morcegos, sendo 36 na primeira expedição, 70 na segunda, 65 na terceira e 22 na quarta (Figura 5).

Foi feito PCR para o subgênero *Trypanozoon* com os iniciadores TBR1 e TBR2 (Masiga *et al.*, 1992) de 182 baços de morcegos (32 da primeira expedição, 68 da segunda, 64 da terceira e 22 da quarta). Desse total, uma amostra foi positiva (LBT 4989), embora tenham resultado em um fragmento de banda um pouco maior que o esperado de 164pb (Figuras 10 ). A amostra LBT 4989 referia-se a um espécime fêmea de *Carollia perspicillata*, coletada no primeiro semestre de 2014, no ponto A1 (terra firme) Essa amostra positiva também foi submetidas à PCR do gene ribossomal 18S nas condições descritas na metodologia, com o produto obtido na primeira etapa sendo diluído na proporção de 1:10, mas não amplificou (Figura 9).



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR de DNA nuclear satélite do subgênero *Trypanozoon*. 1-14) Amostras negativas; 15) LBT 4989: positiva; Amostras 16 e 17: controles positivos de 10 e 1 ng, respectivamente; 18) Peso molecular de 100 pb; 19) Controle negativo

A amostra de morcego (LBT 4989) que amplificou frente ao alvo TBR foi purificada e enviada para o sequenciamento pela Plataforma de Sequenciamento (RPT01A) da Fiocruz. Como resultado foi obtido no BLAST o retorno de sequencias de DNA satélite de *T. brucei* (K00392.1) para um fragmento de uma das fitas de

DNA com 102 pb, com cobertura de 90% e identidade de 89%, semelhante ao observado com a amostra do cão positivo.

#### 4.1.3 Capivaras

No ano de 2015, foi coletado sangue de 51 capivaras de cinco diferentes áreas, duas na área urbana e três propriedades rurais. Os locais de capturas e o número de animais analisados de cada localidade são demonstrados no mapa abaixo (Figura 12 e Tabela 3).



**Figura 12:** Mapa de locais de capturas das capivaras analisadas no presente estudo

##### 4.1.3.1 Diagnóstico parasitológico e sorológico

Foram analisados esfregaços de sangue periférico de 43 animais e realizada RIFIs com conjugados anti- *Thrichomys* e anti- *Cavia sp.* no plasma de 46 animais (Tabela 3). Nenhum dos animais apresentou esfregaço positivo e as sorologias com conjugado anti- *Thrichomys* foram todas negativas. Os resultados obtidos na RIFI com conjugado anti- *Cavia sp.* estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Origem e número de amostras analisadas por exame de esfregaço sanguíneo e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) frente a infecções por *T. cruzi* e *T. evansi*.

LOCALIDADE	NÚMERO DE ANIMAIS	ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS (N)	RIFI (N)
Campus da UFAC	15	14	14
Chácara Ipê	11	7	10
Fazenda Piracema	9	9	8
Fazenda São Raimundo	15	7	14
Fazenda Catuaba	1	1	0

**Tabela 5:** Origem, sexo e resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando conjugado anti-*Cavia sp.* frente á infecção por *T. evansi*.

Capivaras			
ID da amostra	Localidade	Sexo	RIFI <i>T.evansi</i> (Conjugado anti- <i>Cavia sp.</i> )
LBT 7384	Fazenda Piracema	Macho	1/20
LBT 7385	Fazenda Piracema	Macho	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7386	Fazenda São Raimundo	Fêmea	Negativo
LBT 7387	Fazenda São Raimundo	Fêmea	1/20
LBT 7388	Fazenda São Raimundo	Fêmea	1/10
LBT 7389	Fazenda São Raimundo	Fêmea	1/20
LBT 7390	Fazenda São Raimundo	Macho	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7391	Fazenda São Raimundo	NR	Negativo
LBT 7392	Fazenda São Raimundo	Fêmea	Negativo
LBT 7393	Fazenda São Raimundo	Fêmea	<b>1/80 (Positivo)</b>
LBT 7394	Fazenda Piracema	Fêmea	Negativo
LBT 7395	Fazenda Piracema	Fêmea	Negativo
LBT 7396	Fazenda Piracema	Fêmea	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7397	UFAC	Fêmea	1/20
LBT 7398	Chácara Ipê	Fêmea	1/20
LBT 7399	Fazenda Piracema	Fêmea	1/20
LBT 7400	Fazenda São Raimundo	Fêmea	1/10
LBT 7401	UFAC	ND	1/10
LBT 7402	Fazenda São Raimundo	Fêmea	1/10
LBT 7403	Fazenda São Raimundo	Macho	1/20
LBT 7404	Chácara Ipê	Fêmea	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7405	Chácara Ipê	Fêmea	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7406	Chácara Ipê	Fêmea	1/20
LBT 7407	Chácara Ipê	Fêmea	Negativo

LBT 7408	Chácara Ipê	Fêmea	Negativo
LBT 7409	Chácara Ipê	Macho	Negativo
LBT 7410	Chácara Ipê	Macho	Negativo
LBT 7411	Chácara Ipê	Macho	Negativo
LBT 7412	Fazenda São Raimundo	Fêmea	Negativo
LBT 7413	Fazenda São Raimundo	Macho	1/10
LBT 7414	UFAC	Macho	1/10
LBT 7415	UFAC	Macho	1/10
LBT 7416	UFAC	Fêmea	Negativo
LBT 7417	UFAC	Macho	Negativo
LBT 7418	UFAC	Macho	1/10
LBT 7419	UFAC	Macho	Negativo
LBT 7420	UFAC	ND	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7421	UFAC	Fêmea	1/20
LBT 7422	UFAC	Fêmea	1/10
LBT 7423	Chácara Ipê	Fêmea	<b>1/40 (Positivo)</b>
LBT 7424	Fazenda Piracema	Fêmea	Negativo
LBT 7425	UFAC	Macho	Negativo
LBT 7426	UFAC	Fêmea	Negativo
LBT 7427	UFAC	Fêmea	Negativo
LBT 7428	Fazenda Piracema	Macho	1/10
LBT 7429	Fazenda São Raimundo	Macho	1/10

ND = não determinado

Dos 46 animais analisados na sorologia, 8 apresentaram títulos sorológicos positivos (17,4%). Dentre esses animais 4 eram de áreas rurais e outros 4 da área urbana de Rio Branco. Os animais da área rural incluíam 2 (25%) provenientes das proximidades da Fazenda Piracema e 2 (25%) da Fazenda São Raimundo. Os animais da área urbana eram da Chácara Ipê (n=3; 37,5%) e campus da Ufac (n=1; 12,5%). Cinco dos roedores positivos eram fêmeas (62,5%), enquanto 2 (25%) eram machos e um não teve o sexo determinado durante a coleta.

## DISCUSSÃO

As áreas incluídas no presente estudo foram escolhidas por estarem em sua maioria próximas ao Parque Zoobotânico e inseridas em um ambiente que vêm sofrendo uma forte pressão antrópica. A vegetação do parque é formada por florestas em diferentes estágios, devido ao desmatamento que ocorreu naquela área, pois até a década de 1940, a área era um seringal com atividade extrativista (Calouro *et al.*, 2010). Foi possível realizar as coletas em três espécies de mamíferos habitantes dessa área, as quais foram escolhidas dada a nossa hipótese de que haveria um ciclo de transmissão de *T. evansi* na área: (i) Cães, por ser a espécie que, segundo relato dos veterinários do local, estavam apresentando sintomas compatíveis com a infecção, sendo que as lâminas de esfregaço sanguíneo realizadas para um deles era fortemente sugestiva da infecção por *T. evansi*; (ii) morcegos, por serem animais longevos, com elevada capacidade de deslocamento e descritos como hospedeiros (também como vetores, no caso das espécies hematófagas) de *T. evansi* (Hoare, 1972); e (iii) capivaras, por serem abundantes na área de estudo e relatadas como um potencial reservatório deste parasito, capaz de manter altas e duradouras parasitemias, sem apresentação de sinais clínicos de doença (Herrera *et al.*, 2004). A transmissão de *T. evansi* no Acre não havia sido relatada até o momento. As áreas rurais onde foi realizada a coleta das capivaras foram escolhidas devido ao contato próximo desses animais com outros animais domésticos como cães, bovinos, bubalinos e equinos.

Os resultados negativos no exame à fresco de buffy coat deve-se provavelmente ao fato de que esse teste diagnóstico só conseguir detectar parasitemias superiores à  $10^{3-4}$  parasitas/mL em animais que apresentem alta competência infectiva, sendo pouco sensíveis para a detecção de baixas parasitemias (Herrera *et al.*, 2004; Jansen, Xavier e Roque, 2015). Este é um dos testes mais empregados no diagnóstico da infecção por *T. evansi* porque este é um parasito com a característica de provocar altas parasitemias em seus hospedeiros. A ausência do encontro de animais positivos por esta técnica pode ser consequência da baixa taxa de infecção encontrada nos animais pesquisados. Dos 73 cães analisados, 16 (20,5%) obtiveram sorologia positiva, apresentando anticorpos IgG anti-*T.evansi* (demonstrando estarem infectados). Esta infecção, porém

provavelmente ocorreu no mínimo 3 semanas antes (Herrera *et al.*, 2004) e as altas parasitemias podem ter sido controladas antes do momento da coleta de sangue para o presente estudo. Se considerarmos o encontro de parasitos no sangue, apenas em um cão isso foi detectado (diagnóstico molecular positivo, dentre os 78 que foram avaliados, ou seja 1,3%). Esse cão certamente apresentava baixa parasitemia, como comprovado pelo exame a fresco negativo e sugerido pela fraca intensidade de banda observada no diagnóstico molecular. Além disso, a ausência de títulos detectáveis de IgG anti-*T. evansi* na RIFI indica que provavelmente este animal estava em fase inicial de infecção.

O hemocultivo realizado nas amostras dos cães foi feito com o intuito de pesquisar a infecção por *T. cruzi*, pois como já dito anteriormente, *T. evansi* não é cultivável. Nos últimos anos muitos trabalhos vêm sendo feitos na região da Amazônia com animais silvestres e cães. Na região, as DTU's de *T. cruzi* encontradas são TcI, TcIII e TcIV. (Xavier *et al.*, 2012; Roque *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014). Duas importantes características da infecção na região são a sua relação com ingestão de alimentos contaminados e invasão das residências por espécies de triatomíneos silvestres (Roque *et al.*, 2013). No âmbito da infecção por *T. cruzi*, cães apresentam-se como importantes sentinelas em suas localidades, sinalizando a presença do parasito e sua infecção normalmente precede os casos humanos. A infecção dos cães na região amazônica está associada a proximidade das residências ao ambiente silvestre. Também já foi relatado que a diminuição da biodiversidade em ambientes degradados, favorece a possibilidade de infecção nesses animais. Porém, o relato de altas parasitemias, pelo menos detectáveis no hemocultivo é raro, demonstrando que, pelo menos nesta área, podem ser considerados hospedeiros com baixa competência infectiva (Xavier *et al.*, 2012). Relatos de isolamento de *T. cruzi* em cães nesta região ainda são pontuais (Roque *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014). Este cenário é oposto ao descrito na Região do Chaco na Argentina, onde as prevalências de xenodiagnóstico positivo em cães são bastante relatadas e ao menos 4 DTU's diferentes já foram isoladas destes animais (TcI, TcIII, TcV e TcVI). Essa região Argentina é considerada como hiperendêmica para a infecção por *T. cruzi* e os ciclos de transmissão silvestres e domésticos ocorrem simultaneamente. Um fator que favorece o ciclo doméstico é a existência do principal vetor responsável por esse tipo de transmissão, *Triatoma infestans* na região. Diferentemente, a transmissão do parasito por este vetor foi erradicada no

Brasil através das iniciativas de controle do “Cone Sul” em 2006 (Schofield, Jannin e Salvatella 2006; Enriquez *et al.*, 2013; Monje-Rumi *et al.*, 2015). Sendo assim, o cenário nessas duas regiões tanto relacionado a vetores, quanto hospedeiros e DTU's é bem distinto. Nossos resultados, com ausência de isolamento de *T. cruzi* nos hemocultivos realizados em cães corroboram o cenário usualmente observado na Amazônia.

Outro fator avaliado no presente trabalho foi o volume globular dos cães. Em nosso estudo a associação do decréscimo de volume globular com a infecção por *T. evansi* ou *T. cruzi* foi baixa. Logo, é possível que outros fatores estejam provocando a redução de volume globular nesses animais. No diagnóstico sorológico dentre os cães estudados no presente trabalho que apresentaram títulos sorológicos positivos para *T. evansi*, dois cães apresentavam-se com volume globular abaixo da normalidade, caracterizando anemia, um traço importante nas infecções por esse parasito (Desquesnes *et al.*, 2013a). Em um desses animais (LBT 6613), foi diagnosticada infecção mista frente a infecções por *T. evansi* e *T. cruzi* (ambos com 1/80).

A Reação de Imunofluorescência Indireta realizada tinha como objetivo detectar a presença de IgG anti-*T. evansi*, o que ocorre aproximadamente 2-3 semanas após a infecção. Por outro lado, já foi demonstrado que uma maior eficácia no controle da infecção por esse parasito se dá principalmente mediada por anticorpos IgM, responsáveis pelo controle inicial da infecção, principalmente através do mecanismo de fagocitose. Esse fato foi demonstrado em um trabalho realizado em 2007 (Baral *et al.*, 2007), onde ratos conseguiam debelar a infecção com altos níveis de IgM e níveis de IgG relativamente baixos, enquanto ratos com reduzidos níveis de IgM e altos níveis de IgG apresentavam uma descontrolada parasitemia tardia. Sendo assim, é possível que a taxa de infecção encontrada, de 20,5%, esteja ainda subestimada e que outros cães tenham se infectado por este parasito, mas conseguido controlar a infecção em seu estágio inicial, ainda antes da formação de níveis de IgG que pudessem ser detectados no diagnóstico sorológico.

Por outro lado, a utilização de IgM na RIFI, é bem menos específica e portanto mais sujeito à reações cruzadas por ser esta uma molécula pentamérica e de menor especificidade que a IgG (Abbas, A.K; 2012). A especificidade era um ponto a ser levado em consideração na escolha do método sorológico a ser utilizado e a utilização de IgM para detecção de *T. evansi* em uma área onde é sabida a

circulação de *T. cruzi* certamente aumentaria as chances de erros de interpretação no diagnóstico ocasionadas por reações cruzadas entre estes dois tripanosomatídeos.

Das 10 amostras com reação sorológica positiva apenas para *T. evansi*, sete delas apresentaram baixos títulos frente a infecção por *T. cruzi* (abaixo do ponto de corte de 1/40), mas três delas (LBT 6600, 6606 e 6641) estavam negativas. Destas, dois cães apresentaram titulação de 1/40 frente a infecção por *T. evansi* e um deles (LBT 6600) apresentou titulação de 1/80. Além disso, outro cão (LBT 6598) também apresentou titulação sorológica de 1/80 frente a infecção por *T. evansi* e apenas 1/10 frente a infecção por *T. cruzi*. Os dois cães com título sorológico de 1/80 tinham como moradia a Estrada Dias Martins, próximo a UFAC e ao Parque Zoobotânico e possuíam acesso à rua. Os resultados sorológicos, em especial nestes quatro últimos, descartam a possibilidade de infecção cruzada com *T. cruzi* na RIFI e confirmam a infecção destes cães por *T. evansi*.

O hábito de caça estava descrito nos cães LBT 6634, LBT 6641, LBT6644, LBT6653 e LBT 6654, cães que também foram sorologicamente positivos frente a infecção por *T. evansi* e negativos frente a infecção por *T. cruzi*. Esse fator favoreceria a ocorrência da infecção, uma vez que aumentaria a probabilidade da ocorrência de infecção oral, já demonstrada através de infecção experimental como importante via de transmissão do parasito (Bazolli *et al.*, 2002).

O contato com outros animais silvestres, como capivaras e morcegos foi descrito em metade dos cães analisados e, portanto, não foi um fator importante na diferenciação dos cães infectados, sendo observados cães infectados por *T. evansi* tanto entre os animais apresentavam essa convivência mais próxima com animais silvestres (o que favoreceria a possibilidade de infecção) quanto os que eram mais restritos às residências e sem relato de contato com o meio silvestre (Franke *et al.*, 1994).

As amostras LBT 6613, LBT 6619, LBT 6620, LBT 6624, LBT 6640 e LBT 6645, apresentaram títulos sorológicos positivos para *T. evansi* e títulos sorológicos positivos de valor igual ou superior frente a infecção por *T. cruzi*. Por tratar-se de uma técnica sorológica indireta há a probabilidade de reação cruzada, principalmente por utilizar-se o parasito inteiro na confecção do antígeno. Ainda assim, o alto ponto de corte adotado (1/40) e a ausência de títulos acima de 1/160 (que pudessem resultar em reações cruzadas mais fáceis de serem detectadas)

indicam que a maior possibilidade é da ocorrência de infecção mista com as duas espécies de *Trypanosoma*.

Além das 6 amostras com títulos sorológicos positivos para os dois parasitos, havia ainda 13 amostras com títulos sorológicos positivos apenas para *T. cruzi*. Esse achado demonstra que os cães da área estavam expostos também a esse parasito, inclusive quatro animais (LBT 6597, LBT 6599, LBT 6602 e LBT 6604) residiam na Estrada Dias Martins, localizada próxima ao campus da UFAC, e onde recentemente foi encontrado um exemplar do triatomíneo *Rhodnius stali*, naturalmente infectado com este parasito (Meneguetti *et al.*, 2016). Apesar de especificamente no estado do Acre não haver descrição da infecção por *T. cruzi* em cães, a região amazônica vem sendo considerada uma nova fronteira endêmica para doença de Chagas e a presença de cães sorologicamente positivos no bioma amazônico já foi relatada em várias outras áreas (Xavier *et al.*, 2012). Em trabalho realizado na região sul do Pantanal, onde a infecção por *T. evansi* é endêmica, foi realizada sorologia por RIFI para detecção de anticorpos IgG anti-*T. evansi* e anti- *T. cruzi* em 69 cães. Entre esses cães, apenas 6 apresentaram títulos sorológicos positivos para *T. cruzi*, em comparação com 29 animais obtiveram sorologia positiva para *T. evansi* (Herrera *et al.*, 2011). A diferença nas taxas de infecção em cães por *T. cruzi* ou *T. evansi* foram diferentes do que observamos no presente trabalho, onde foi possível detectar uma maior exposição dos animais ao *T. cruzi* do que ao *T. evansi*, ainda que os dois parasitos estejam presentes na área de estudo. Esta diferença provavelmente reflete a diferença na distribuição destes parasitos nestes dois biomas, pois no Pantanal a infecção por *T. evansi* é endêmica, enquanto na região amazônica é a infecção por *T. cruzi* que é mais relatada.

Para o diagnóstico molecular foram utilizados os iniciadores TBR1 e TBR2 (Masiga *et al.*, 1992), específicos para o subgênero *Trypanozoon*, que apresentam a importante característica de serem muito sensíveis e possuir como alvo o DNA nuclear satélite, que possui muitas cópias (10.000- 20.000 por célula) (Milocco *et al.*, 2013). A vantagem da utilização destes iniciadores é que resultam em uma mais eficiente detecção de DNA mesmo com pouca quantidade disponível, podendo detectar parasitemias tão baixas quanto 1 *Trypanosoma*/ mL de sangue (Herrera *et al.*, 2005; Pruvot *et al.*, 2010). Esse alvo foi descrito pela primeira vez em cepas discinetoplásticas e não possui homologia com o kDNA, sendo sua localização independente da presença dessa estrutura. Uma das principais características da

utilização do DNA satélite é sua capacidade em apresentar diferenças consideráveis de sequência entre espécies e diferenças limitadas dentro de um mesmo organismo. Isso ocorre devido à rápida evolução dessa estrutura em tripanossomas. O fragmento alvo de 177pb encontrado em *Trypanosoma brucei* possui como possível origem a replicação de uma mesma sequência de 19pb. (Sloof *et al.*, 1983).

Na amostra positiva de cão (LBT 6593) e do morcego LBT 4989, a análise das sequencias realizadas no BLAST retornou com sequencias de DNA satélite de *T. brucei* para um fragmento de uma das fitas de DNA com 102 pb. Este fragmento, apesar de pequeno, corresponde à aproximadamente 2/3 do fragmento do alvo escolhido. A análise da sequência do controle positivo de 100ng retornou com uma qualidade muito melhor e um tamanho de fita de 168 pb, igualmente similar com *T. brucei*. As similaridades apresentadas foram em torno de 90% com *T. brucei* que, apesar de inserido no mesmo subgênero *Trypanozoon*, é uma espécie diferente de *T. evansi*. A falta de sequencias de *T. evansi* e a baixa quantidade de sequencias de *T. brucei* depositadas para este alvo (n=3) explicam este menor percentual de similaridade que o normalmente adotado para identificação de uma espécie. Cabe ainda ressaltar que as sequências obtidas nas amostras de cão e morcego (idênticas entre si) foram diferentes das sequencias obtidas nos controles positivos utilizados na reação, descartando assim, qualquer possibilidade de contaminação no laboratório. Além disso, é possível inferir que as infecções encontradas no cão e no morcego sejam decorrentes da mesma população de *T. evansi*.

Na literatura é descrita que apenas a presença dessa banda de 164 pb já é conclusiva para garantir a infecção por *Trypanosoma (Trypanozoon) sp.*, *T. evansi* no caso (Pruvot *et al.*, 2010; Milocco *et al.*, 2013), fato corroborado no presente trabalho (em especial na amostra de cão). Em apenas um trabalho os autores sequenciaram os produtos obtidos na reação de TBR e encontraram similaridade com DNA satélite de *T. brucei* (K00392.1) (Milocco *et al.*, 2013). No presente estudo, além de sequenciarmos e obtermos fragmentos similares a sequencias de *T. brucei* tanto nas amostras positivas, quanto nos controles da reação, também realizamos uma PCR, com o mesmo marcador, incluindo cepas de referência de *T. cruzi* das DTUs TcI e TcII para garantir que as mesmas não seriam amplificadas utilizando as condições descritas em Masiga *et al.*, (1992). Como esperado, não ocorreu amplificação para *T. cruzi*, provavelmente porque o DNA nuclear satélite de *T. brucei*, integrante do subgênero *Trypanozoon* e alvo do marcador utilizado, é um

fragmento de 177 pb, composto por uma sequência bem específica e característica desse subgênero, totalmente diferente, tanto em sequência de bases nitrogenadas, quanto em tamanho de fragmento, de *T. cruzi* (Sloof *et al.*, 1983). Sendo assim, é possível afirmar que foi detectado DNA de *T. evansi* na área de estudo em cão e morcego, já que esse é o único integrante do subgênero *Trypanozoon* possível nessa localidade, uma vez que a transmissão de *T. brucei* é restrita a área da mosca tsé-tsé, no continente africano e *T. equiperdum* é uma espécie que parasita apenas cavalos.

Além do marcador já mencionado, também utilizamos o marcador de gene ribossomal 18S, através de uma *nested* PCR com os iniciadores TRY927 e SSU561 (Noyes *et al.*, 1999). Ainda que os autores que descreveram a reação não a recomendem para utilização frente a tripanossomas salivários devido à taxa de evolução do gene ssRNA desses organismos ser oito vezes maior do que de tripanossomas da seção Stercoraria, eles observaram que o tamanho do fragmento obtido em parasitos da seção Salivaria é ligeiramente maior do que os produtos obtidos para os parasitos da seção Stercoraria (Noyes *et al.*, 1999). Esse fato foi corroborado com o encontrado no presente trabalho, onde a amostra de cão e o controle de *T. evansi* utilizado apresentavam um tamanho de fragmento superior ao apresentado pelo controle positivo de *T. cruzi*. As duas amostras de morcegos positivas na reação de TBR também foram testadas, mas não foram positivas, possivelmente porque apresentavam uma quantidade menor de DNA do parasito no tecido do hospedeiro.

A amostra de cão com diagnóstico molecular positivo era de uma fêmea, moradora do condomínio Chácara Ipê. Para esse animal não foi relatado acesso à rua, nem o hábito de caçar, mas foi descrita a presença de morcegos próximo à residência do animal. O diagnóstico sorológico foi negativo frente a infecção tanto por *T. evansi* quanto por *T. cruzi*. Além disso, este animal também não apresentava parasitos circulantes que pudessem ter sido detectados no exame direto em *buffy coat* ou no esfregaço sanguíneo corado. Este perfil de infecção demonstra que o animal apresentava baixa parasitemia (detectável apenas através do diagnóstico molecular) e indica que este animal: (i) conseguiu controlar a infecção por *T. evansi* sem a necessidade de montar uma resposta imune humoral detectável na RIFI; ou (ii) este animal ainda está na fase inicial da infecção (infecção recente) e as ondas parasitêmicas ainda ocorrerão e poderão resultar em elevadas parasitemias

(detectáveis no exame direto) e montagem de uma resposta imune humoral detectável na RIFI.

Dos 182 morcegos analisados, apenas 1 apresentou-se positivo no diagnóstico molecular (1,1%). O morcego encontrado positivo na reação de TBR era uma fêmea da espécie *Carollia perspicillata* (confirmado inclusive pelo sequenciamento do produto amplificado). Essa espécie tem boa adaptação a ambientes perturbados e é descrita como a abundante na área de estudo (Calouro *et al.*, 2010). *C. perspicillata* possui uma dieta baseada em frutos e insetos, e ocorre em áreas florestais e utilizam como abrigos cavernas, minas, fendas de rochas, ocos de árvores, tubulações e edificações urbanas. Podem ainda abrigar-se sozinhos, formar pequenos grupos ou colônias com muitos espécimes (Dos Reis *et al.*, 2007). O tamanho de banda acima do esperado de 164pb para o alvo TBR que foi observado na amostra de morcego não pode ser considerado conclusivo para garantir a infecção por *T. evansi*. A infecção na fêmea de *C. perspicillata* foi confirmada pelo resultado do sequenciamento obtido com o produto amplificado na reação de TBR. A presença do DNA do parasito em morcegos não chega a ser surpreendente uma vez que ambos incluem insetos em sua dieta, apesar desses mamíferos possuírem hábitos noturnos e as moscas hematófagas possuírem hábitos diurnos, crepusculares. Este, no entanto, não é o primeiro achado deste tipo e, além do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, as espécies nectíparas *Tonatia sp.* e *Leptonycteris curasoae* também já foram encontradas infectadas por este parasito no Pantanal e na Venezuela, respectivamente (Herrera *et al.*, 2011; Silva-Iturriza. *et al.*, 2016). A não sobreposição de horários entre estes morcegos e os potenciais vetores da área (as moscas hematófagas) sugere a possibilidade de haver outros possíveis vetores envolvidos na transmissão do parasito na área estudada. A presença de morcegos hematófagos na área, se é que existe, é rara (nenhum coletado em 4 expedições realizadas). Assim, os morcegos de Rio Branco a princípio estão inseridos no ciclo de transmissão de *T. evansi* como hospedeiros mamíferos (potenciais reservatórios), mas não como vetores, papel que pode ser exercido exclusivamente por espécies de hábitos hematófagos.

Foi possível detectar anticorpos IgG anti-*T.evansi* em 8 das 46 (17,4%) capivaras analisadas através de RIFI com a utilização do conjugado anti-*Cavia sp.* Sendo assim, é possível concluir que a circulação do parasito na área de estudo também inclui as capivaras. Para a realização do diagnóstico sorológico das

capivaras no presente estudo foram realizadas duas reações utilizando conjugados diferentes. A primeira, utilizando-se conjugado de *Thrichomys sp.* foi feita com o intuito de detectar exposições à infecção por *T.evansi* e *T.cruzi*, obteve todos os resultados negativos. Ainda que o roedor *Thrichomys sp.* seja um roedor caviomorfo da mesma subordem Hystricognathi, sua família é Echimyidae, enquanto as capivaras pertencem a família Caviidae, a mesma família dos porquinhos da Índia (*Cavia sp.*). Realizamos esta reação pela mesma já estar padronizada no laboratório e dispomos de controles positivos e negativos para a reação. Acreditávamos que a distância filogenética entre as duas famílias não seria grande o suficiente para impedir a reação em amostras positivas, mas não foi o que aconteceu. Assim, quando realizamos a RIFI com conjugado anti-*Cavia sp.*, conseguimos diagnosticar a infecção por *T. evansi* (através da presença de anticorpos IgG anti- *T.evansi*) em 8 das 46 capivaras analisadas no presente estudo. Esse fato ressalta a importância de trabalharmos com conjugados mais próximos filogeneticamente dos animais a serem analisados. Apesar de em um primeiro momento parecer uma conclusão redundante, em vários estudos com animais silvestres, pela ausência de conjugados comerciais para essas espécies, os autores adaptam metodologias de outros hospedeiros para preencher essas lacunas. Como consequência, alguns destes estudos conseguem realizar o diagnóstico nesses animais, mas certamente os resultados obtidos devem ser analisados com cautela e as chances de subestimação das taxas de infecção são elevadas. Logo, a relação filogenética das espécies a serem analisadas deve ser o fator mais importante a ser considerado na escolha dos reagentes para o desenvolvimento de reações mais sensíveis.

Outro ponto a ser ressaltado a respeito da sorologia com as capivaras é o ponto de corte. Tendo em vista que a diluição do conjugado de *Cavia sp.* utilizada no presente estudo foi a menor possível descrita pelo fabricante (1:10) e considerando a ausência de controles positivos de capivara ou *Cavia sp.* infectados por *T.evansi*, optou-se por considerar as diluições de 1:10 e 1:20 como faixa indeterminada e o título sorológico considerado positivo foram diluições a partir de 1:40. Cabe ressaltar que adotamos este ponto de corte de 1:40, ainda que o controle negativo utilizado (de *Cavia sp.* oriundo de um biotério de experimentação) tenha sido negativo na reação. Se adicionarmos ao cálculo da taxa de infecção os títulos presentes na faixa indeterminada, esta taxa aumentaria de 17,4% para 21,7%. Porém, consideramos como ponto de corte o título sorológico de 1:40, ainda assim a possibilidade de

essas capivaras de menor título sorológico estarem também sorologicamente positivas não pode ser completamente descartada.

Há poucos estudos que reportam a investigação da infecção por *T. evansi* em capivaras através de testes sorológicos. O mais recente foi realizado no estado de São Paulo, onde foi investigada a soroprevalência da infecção por *T. evansi* em 172 capivaras. Para isso, foram utilizados os testes sorológicos CATT/*T. evansi* e RIFI, utilizando anti-guinea pig. Nesse estudo, os autores também não dispunham de controles positivos espécie-específicos e optaram por utilizar controles de cavalos, cães e ratos infectados por *T. evansi*. Ainda assim, foi possível observar taxas de infecção de 9,9% e 8,1% frente aos testes CATT/*T. evansi* e RIFI, respectivamente. Nenhum dos animais estudados apresentava sintomatologia clínica e os plasmas foram coletados durante um trabalho para estudo de febre maculosa. Vale ressaltar que o primeiro é um teste rápido e visa a detecção do antígeno RoTAT 1.2 e anticorpos IgM e o segundo IgG. No entanto, ambos os testes mostraram-se eficientes para detecção de anticorpos e apresentaram resultados semelhantes. Neste estudo, não foram realizados exames parasitológicos diretos que possibilitassem a detecção de altas parasitemias e, conseqüentemente, possibilitassem a avaliação destes hospedeiros como dispersores da parasitose. Os resultados do exame sorológico demonstram, no entanto, que estes animais estavam inseridos no ciclo de transmissão do parasito nesta área, que é não endêmica para a parasitose (Da Silva *et al.*, 2016).

Anteriormente, o papel das capivaras na transmissão de *T. evansi* no Pantanal Mato-grossense já havia sido descrito. Nesta região, estes animais apresentam-se como importantes reservatórios do parasito, já que conseguem albergar parasitemias patentes e duradouras e não apresentam sinais clínicos da infecção (Franke *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 2004, 2011). Além disso, há o relato do isolamento do parasito no bioma amazônico, no Peru, na região da Amazônia Peruana, também em capivara (Muñoz e Chávez, 2001).

Sendo assim, a presença de sorologia positiva nos cães (20,5%) e capivaras (17,4%), bem como confirmação da presença de sequencias de DNA de *T. (Trypanozoon) sp.* em amostra de cão e morcego, confirma a circulação do parasito na região de Rio Branco, estado do Acre. Sendo assim, a hipótese de ocorrência de transmissão silenciosa entre as três espécies de mamíferos selecionadas foi confirmada. O presente estudo, portanto, é o primeiro que demonstra a circulação de

*T. evansi* no estado do Acre e o primeiro, desde 1830, que confirma a presença do parasito na região Amazônica Brasileira.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ Há circulação de *T. evansi* entre cães, morcegos e capivaras na região de Rio Branco/RJ;
- ✓ O ciclo parece ser mantido mesmo em baixas parasitemias, já que não foram observados testes parasitológicos positivos em nenhum dos animais testados;
- ✓ Através do diagnóstico sorológico dos cães foi possível concluir que a prevalência de anticorpos anti-*T. evansi* foi de 20,5%;
- ✓ A presença de títulos sorológicos positivos para *T. cruzi* e *T. evansi* na área de estudo demonstra a presença de ambos na área de estudo;
- ✓ A presença de sequência similar entre as amostras de cão e morcego sugere que os mamíferos estejam expostos a mesma população do parasito;
- ✓ Foi possível detectar a presença de IgG anti-*T. evansi* em 17,4% das capivaras analisadas em Rio Branco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K. Anticorpos e antígenos. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Elsevier, p 90-106, 2012.
- Acosta I.C.L., Costa A.P., Nunes P.H. *et al.* Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (Lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 6, pp. 349, 2013.
- Acre. Governo do Estado do Acre. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre. Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre Fase II: documento Síntese-escala 1: 250.000. Rio Branco: SEMA, 356p, 2006.
- Añez, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. IV - A reconsideration of its systematic position. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 77, pp. 405-15, 1982.
- Aquino, L. P. C. T.; Machado, R.Z.; Alessi, A.C. *et al.* Clinical, Parasitological and Immunological Aspects of Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in Dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, pp. 255–260, 1999.
- Aquino, L. P. C. T.; Machado, R.Z.; Lemos, K.R. *et al.* Using Sera From Experimentally and Naturally Infected Bovines, Equines, Dogs, and Quatis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 2961, pp. 112–118, 2010.
- Aref, M.; Yasin, S.M.; Baher, M. *et al.* Canine *Trypanosoma evansi* infection in Afghanistan. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n. 3–4, pp. 638–641, 2013.
- Auty, H.; Torr, S.J.; Michoel, T. *et al.* Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control Trypanosome species of relevance to cattle. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 34, n. 2, pp. 587–598, 2015.
- Baral, T. N.; De Baetselier, P.; Brombache, F. *et al.* Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *The Journal of infectious diseases*, v. 195, n. 10, pp. 1513–1520, 2007.
- Bazolli, R. S.; Marques, L. C.; Machado, R. Z. *et al.* . Transmissão Oral de *Trypanosoma evansi* em cães (Oral transmission of *Trypanosoma evansi* in dogs). *ARS Veterinaria*. v. 18, pp. 148–152, 2002.
- Birhanu, H.; Gebrehiwot, T.; Godeeris, B.M. *et al.* New *Trypanosoma evansi* Type B Isolates from Ethiopian Dromedary Camels. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, pp. 1–22, 2016.
- Borghesan, T. C.; Ferreira, R.C.; Takata, C.S.A. *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.
- Calouro, A. M.; Santos, F.G.A.; Faustino, C.L. *et al.* Riqueza e abundância de morcegos capturados na borda e no interior de um fragmento florestal do estado do Acre, Brasil. *Biotemas*, v. 23, n. 4, pp. 109–117, 2010.
- Camargo, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis for toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 3 pp. 117-118, 1964.
- Camargo, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances in parasitology*, v. 42, p. 29–112, 1999.

- Claes, F.; Radwanska, M.; Urakawa, T. *et al.* Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biology and Disease*, v. 3, n. 3, pp 1 -6, 2004.
- Couto, C.G. Anemia. In: Nelson R.W. & Couto C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4<sup>a</sup> ed. Elsevier, p. 1213, 2010.
- Da Silva, A. S.; Krawczak, F.S.; Soares, J.F. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma evansi* infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from a nonendemic area in Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 28, n. 2, pp. 171–174, 2016.
- Dávila, A. M. R.; Silva, R.A.M.S.S. . Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, pp. 199–212, 2000.
- Dávila, A. M. R.; Herrera, H.M.; Schlebinger, T. *et al.* Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 117, n. 1–2, pp. 1–13, 2003.
- Defontis, M.; Richartz, J.; Engelmann, N. *et al.* Canine *Trypanosoma evansi* infection introduced into Germany. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 41, n. 3, pp. 369–374, 2012.
- Deschamps P., Lara E., Marande W., . *et al.* Phylogenomic Analysis of Kinetoplastids Supports That Trypanosomatids Arose from within Bodonids. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n.1, pp. 53–58, 2011.
- Desquesnes, M.; McLaughlin, G.; Zougrana, A. *et al.* Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International Journal of Parasitology*, v. 31, pp. 610–614, 2001.
- Desquesnes M. *Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America*. OIE. World Organization for Animal Health, Paris. 2004.
- Desquesnes, M.; Holzmüller, P.; De-Hua, L. *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, pp. 1–22, 2013a.
- Desquesnes, M.; Dargantes, A.; De-Hua, L. *et al.* *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013b.
- Díaz M.M., Aguirre L.F., Barquez R.M.. *Clave de identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica*. Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada, Cochabamba, Bolivia, 2011.
- Dominghetti, T. F. S.; Barros, A. T. M.; Soares, C. O. *et al.* *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae) outbreaks : current situation and future outlook with emphasis on Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 24, n. 4, pp. 387–395, 2015.
- Eisenberg, J. F., Redford, K. H. *The Mammals of Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago, The University of Chicago Press, 609p, 1999.
- Emmons, L. H., Feer, F. *Neotropical Rainforest Mammals: A field guide*. 2 ed. Chicago, The University of Chicago Press. 307p, 1997.
- Enriquez, G.F., Cardinal, M.V., Orozco, M.M. *et al.* Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *NIH Public Access*, v. 140, n. 3, pp. 303-308, 2013.
- Franco, J. R.; Simarro, P. P.; Diarra, A. *et al.* Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, v. 6, n. 1, pp. 257–275, 2014.

- Franke, C.R; Greiner, M; Mehlitz, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Tropica*, v. 58, n. 2, pp. 159–169, 1994.
- Gardner, A.L. Mammals of South America. Volume 1. Marsupials, Xenarthrans, Schrews and Bats. Londres e Chicago, The University of Chicago Press. 2007.
- Haag J; O'h Uigin C; Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 91, pp. 37-49, 1998.
- Herrera, H. M.; Alessi, A.C.; Marques, L.C. *et al.* Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American quati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta tropica*, v. 81, n. 3, pp. 203–10, 2002.
- Herrera, H. M.; Dávila, A.M.R.; Norek, A. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 125, n. 3–4, pp. 263–275, 2004.
- Herrera, H. M.; Norek, A.; Freitas, T.P.T. *et al.* Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitology Research*, v. 96, n. 2, pp. 121–126, 2005.
- Herrera, H. M.; Rocha, F.L.; Lisboa, C.V. *et al.* Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 7, pp. 380–387, 2011.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, UK 1972.
- Jansen, A. M., Moriearty, P. L., Castro, B. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: An indirect fluorescent antibody test for diagnosis and follow up of natural and experimental. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, pp. 474–477, 1985.
- 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, pp. 1–15, 2015.
- Jensen, R. E.; Simpson, L.; Englund, P.T. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa? *NIH Public Access*. v. 24, n. 10, pp. 4–9, 2009.
- Joshi, P. P.; Shegokar, V.R.; Powar, R.M. *et al.* Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, pp. 491–495, 2005.
- King, J. D.; Congdon, E., Tosta, C. Evaluation of Three Immobilization Combinations in the Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Zoo Biology*, v. 67, n. June 2009, pp. 59–67, 2010.
- Kunz, T. H.; Thomas, D. W.; Richards, G. C. *et al.* Observational techniques for bats. In: Wilson, D. E.; Cole, F. R.; Nichols, J. D.; Rudran, R. F. & Foster, M. S. (Eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard methods for mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, p.105-114, 1996.
- De-Hua, L.; Hashimi, H.; Zhao-Rong, L. *et al.* Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 6, pp. 1999–2004, 2008.
- Lanham, S. M.; Godfrey, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, v. 28, n. 3, pp. 521–534, 1970

- Lim, B.K., Engstrom, M.D. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in Iwokrama Forest, Guyana, and the Guianan subregion: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 10: 613-657, 2001.
- Lima, V. D. S.; Xavier, S.C.C; Maldonado, I.F.R. *et al.* Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS one*, v. 9, n. 12, pp. e116137, 2014.
- Mamoudou, A.;Njanloga, A.; Hayatou, A. *et al.* Animal trypanosomosis in clinically healthy cattle of north Cameroon: epidemiological implications. *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, pp. 206, 2016.
- Masiga, D. K.; Smyth, A.J.; Hayes, P. *et al.* Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*, v. 22, n. 7, pp. 909–918, 1992.
- Maslov D.A., Podlipaev S.A., Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, pp. 397-402, 2001.
- Matthews K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, v.118, pp. 283-90, 2005.
- Meneguetti, D. U. O.; Castro, G.V.S; Castro, M.A.L.R. *et al.* First report of *Rhodnius stali* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and in the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 3, pp. 365–368, 2016.
- Merzlyak, E.; Yurchenko, V; Kolesnikov, A.A. *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.
- Milocco, C.; Kamyngkird, K. Desquesnes, M. *et al.* Molecular Demonstration of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma lewisi* DNA in Wild Rodents from Cambodia, Lao PDR and Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 60, n. 1, pp. 17–26, 2013.
- Ministério do Meio Ambiente. Avaliação e identificação das áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF. 404p, 2002
- Monje-Rumi, M. M.; Brandán, C.P.; Ragone, P.G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: Mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 29, pp. 53–59, 2015.
- Morrison, L. J.; Mcculloch, R.; Hall, J. P. J. DNA Recombination Strategies during Antigenic Variation in the African Trypanosome. *Mobile DNA III*, n. 1, pp. 409–435, 2014.
- Morrison, L. J.; Vezza, L.; Rowan, T.; *et al.* Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. *Trends in Parasitology*, v. 20, pp. 1–9, 2016.
- Muñoz, K.; Chávez, A. *Trypanosoma evansi* Isolated from Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, pp. 945–946, 2001.
- Njiru, Z. K.; Constantine, C.C.; Masiga, D.K. *et al.* Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, n. 4, pp. 292–300, 2006.
- Noyes, H. A.; Stevens, J.R.; Teixeira, M. *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, pp. 331–339, 1999.
- Nunes, J. T. S.; Silva, A.S.S.; Dorneles, F.S. *et al.* Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, n. 4, pp. 205–207, 2012.

- Parreira, D. R.; Jansen, A.M; Abreu, U.G.P. *et al.* Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. *Acta Tropica*, v. 163, pp. 98–102, 2016.
- Ponte-Sucre, A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host – Parasite Interaction. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. December, pp. 1–12, 2016.
- Pruvot, M.; Kamyngkird, K.; Desquesnes, M. *et al.* A comparison of six primer sets for detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. *Veterinary Parasitology*, v. 171, n. 3–4, pp. 185–193, 2010.
- Queiroz, A. O.; Cabello, P. H.; Jansen, A. M. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso--Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 92, n. 2, pp. 107–118, 2000.
- Reis, N. R. *et al.* Morcegos do Brasil. Londrina, 253p, 2007.
- Rocha, F. L.; Roque, A.L.R.; Lima, J.S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the T. cruzi Transmission Chain. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.
- Rodrigues, A.; Figuera, R.A.; Souza, T.M. *et al.* Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 25, n. 4, pp. 239–249, 2005.
- Rodríguez, N. F.; Tejedor-Junco, M. T.; González-Martín, M.*et al.* *Stomoxys calcitrans* as possible vector of *Trypanosoma evansi* among camels in an affected area of the Canary Islands, Spain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 4, pp. 510–512, 2014.
- Roque, A. L. R.; Xavier, S.C.C; Gerhardt, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Veterinary Parasitology*, v. 193, n. 1–3, pp. 71–77, 2013.
- Rotureau, B.; Van Den Abbeele, J. Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, n. September, pp. 53, 2013.
- Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, v.22, n.12, pp. 583-588, 2006.
- Shaw, J.J. The epizootiology of American Surra with special reference to the Lower Amazon Region. *Protozoology*, v.3, pp. 119-128, 1977.
- Silva-Iturriza, A.; Nassar, J.M.; García-Rawlins, A.M. *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, pp. 95–99, 2013.
- Simmons N.B., R.S. Voss. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna Part 1. Bats. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 237, pp.1–219, 1998.
- Simpson A.G.B., Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplasts. *Molecular Biology and Evolution*, v.19, n.12, pp. 2071-83, 2002.
- Sloof Bos, J.L., Konings, A.F.J.M., Menke, H.H., *et al.* Characterisation of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Molecular Biology*, v. 167, pp. 1–21, 1983.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite Journal*, v.15, pp. 226-32, 2008.

- Sumba, A. L.; Mihok, S.; Oyieke, F. A. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, n. 4, pp. 417–422, 1998.
- Svobodova, M.; Zidková, L.; Cepicka, L. *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, pp. 423–432, 1 fev. 2007.
- Vanhollebeke, B.; Truc, P.; Poelvoorde, P. *et al.* Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of Apolipoprotein L, *The New England Journal of Medicine*, v. 355, pp. 2752–2756, 2006.
- Van Vinh Chau, N.; Buu Chau, L.; Desquesnes, M. *et al.* A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection with the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 8, pp. 1002–1008, 2016.
- Ventura, R. M.; Takata, C.S.A.; Silva, R.A.M.S. *et al.* Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *The Journal of parasitology*, v. 86, pp. 1289–1298, 2000.
- Votýpka, J.; Suková, E.; Kraeva, N. *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.
- Wallace, F. G.; Camargo, E.P.; Barclay, M.R. *et al.* Guidelines for the Description of New Species of Lower Trypanosomatids. *The Journal of Protozoology*, v. 30, n. 2, p. 308–313, maio 1983.
- Xavier, S. C. C.; Roque, A.L.R.; Lima, V.S. *et al.* Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, 2012.
- Yurchenko, V.; Kostygov, A.; Havlová, J. *et al.* Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *The Journal of eukaryotic microbiology*, v. 63, n. 2, pp. 198–209, 2016.
- Zingales, B.; Miles, M.A.; Campbell, D.A. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, pp. 240–253, 2012.

## ANEXO I QUESTIONÁRIO DOS CÃES

Número LBT:

Nome:

Nome do proprietário:

### Dados epidemiológicos:

O animal tem acesso à rua? ( ) Sim ( ) Não

O animal tem acesso a áreas de mata? ( ) Sim ( ) Não

O animal costuma caçar? ( ) Sim ( ) Não Onde?

\_\_\_\_\_

Tipo de residência : ( ) Fixa ( ) Veraneio Tempo de moradia: \_\_\_\_\_

Nº cães na casa? \_\_\_\_\_ ( ) Fixo ( ) Esporádicos

Possui outro(s) animal (is)? ( ) Sim ( ) Não

Qual? \_\_\_\_\_ Quantos?

\_\_\_\_\_

A casa é próxima à: ( ) Mata ( ) Plantações ( ) Bananal ( ) Coleção de água

( ) Terreno baldio

( ) Criações de animais ( ) Outras casas

Vê na propriedade: ( ) entulho ( ) carrapatos ( ) moscas ( ) morcegos ( ) barbeiros ( ) animais silvestres ( ) Quais:

\_\_\_\_\_

Número de moradores da casa? \_\_\_\_\_

Costuma viajar junto com o animal com frequência para algum lugar? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Outros relatos dos proprietários (outras informações):

## ANEXO 2 CHAVE SIMPLIFICADA DE IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS E ESPÉCIES DE MORCEGOS

1. Presença de folha nasal (=apêndice nasal) em forma de lança ou apêndice em forma semi-circular (=ferradura) ao redor da narina ....  
..... **Família Phyllostomidae**
- 1'. Ausência de folha nasal ..... **2**
2. Presença de discos adesivos na base do pólex e do hálux  
..... **Família Thyropteridae**
- 2'. Ausência de discos adesivos ..... **3**
3. Cauda tão longa ou mais longa que a membrana interfemural (=uropatágio)  
..... **4**
- 3'. Cauda mais curta que a membrana interfemural, podendo perfurá-la dorsalmente ..... **6**
4. Cauda livre, aproximadamente metade do comprimento da cauda se dá além da borda distal da membrana interfemural (=uropatágio) .....  
..... **Família Molossidae**
- 4'. Cauda toda ou quase toda contida ao longo da membrana interfemural .... **5**
5. Pólex reduzido (=diminuto), contido na membrana do propatágio e sem garra ..... **Família Furipteridae**
- 5'. Pólex bem desenvolvido, livre da membrana do propatágio em sua porção distal e provido de garra..... **Família Vespertilionidae**
6. Lábio superior com marcada fenda vertical; plagiopatágio ligado à perna (=tíbia)..... **Família Noctilionidae**
- 6'. Lábio superior sem fenda vertical, um par de almofadas no lábio inferior formando um V; plagiopatágio ligado ao tornozelo, e cauda perfurando dorsalmente a membrana interfemural (=uropatágio) .....  
..... **Família Emballonuridae.**

**Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Phyllostomidae coletados.**

1. Apêndice ao redor da narina em forma semi-circular (=ferradura), incisivos superiores mais amplos que os caninos, polegar bem desenvolvido.....**2**
  - 1'. Folha nasal bem desenvolvida; cauda geralmente presente; se cauda ausente, rostro visivelmente estreito e alongado; folha nasal lanceolada (=triangular ou forma de lança), incisivos superiores menores que os caninos, polegar de tamanho normal.....**3**
    2. Incisivos 1/2; polegar com três calosidades, pontadas das asas sem manchas brancas.....***Desmodus rotundus***
    3. Nenhuma fenda mediana profunda no lábio inferior; lábio inferior com fenda vertical, ladeado por almofadas em forma de V ou U, essas fendas podem ou não ser margeadas por papilas; coroas dos molares formando um W; geralmente com orelhas, folha nasal, membrana interfemural e calcâneo bem desenvolvidos; língua não alongada;.....**4**
      - 3'. Lábio inferior tem um único par de papilas lisas divididas por uma profunda fenda mediana; rostro geralmente alongado; orelhas curtas; estreitas e alongadas; língua alongada; molares e pré-molares reduzida; geralmente os pré-molares separados uns dos outros partir de canino.....**9**
    4. Arco zigomático incompleto; cauda relativamente curta ou ausente, lábio inferior ladeado por uma ou mais linhas de papilas menores ou papilas lábias centrais ladeadas por uma única papila, molares inferiores não se assemelham ao pré-molar inferior ou assemelham-se pré-molares inferiores.....**5**
      4. Arco zigomático completo.....**12**
    5. Antebraço, na maioria das vezes, menor que 40 mm.....**6**
      - 5'. Antebraço maior que 40 mm.....**7**
    6. Antebraço sem pelos, 34 a 38 mm; dorso castanho pálido; primeiro molar inferior com cúspide principal baixa; segundo pré-molar inferior maior do que o primeiro.....***Carollia benkeithi***
    - 6'. Antebraço com pelos, de 35 a 40 mm; dorso castanho-escuro; pelos tricoloridos; primeiro molar inferior com cúspide principal de alta; primeiro e segundo pré-molares inferiores quase iguais em altura.....***Carollia brevicauda***
  7. Pelagem relativamente curta; redução do primeiro pré-molar superior em relação ao canino; primeiro e segundo pré-molares inferiores são iguais em altura; antebraço

e dedos dos pés sem ou com poucos pelos; fileira de dentes da maxila maior que 7,4 mm; quando visto diretamente acima por mandíbula, 1/2 ou mais dos incisivos externos escondidos pelo cingulo dos caninos; mandíbula tende a ser em forma de V.. ***Carollia perspicillata***

**8.** Primeiro incisivo superior relativamente amplo e com 3 ou 4 lóbulos bem definidas; nenhum espaço entre o incisivo superior e canina; margem membrana interfemural sem pelos; primeiros incisivos superiores com cingulo laterais..... ***Rhinophylla pumilio***

**8'.** Antebraço menor que 32 mm; comprimento do condilobasal inferior a 16 mm; margem de uropatágio com uma franja de pelos; primeiros incisivos superiores sem cingulo laterais..... ***Rhinophylla fischeriae***

**9.** Incisivos superiores internos e externos não muito diferentes em tamanho; língua com a ponta "pincel" que consiste em longas papilas filamentosas; nenhum sulco profundo ao longo de cada lado da língua; Três molares superiores e inferiores de cada lado..... **10**

**9'.** Incisivos superiores internos em destaque com pontas largas, visivelmente maiores do que os incisivos externos; língua carece de ponta "pincel"; um sulco longitudinal profundo presente ao longo de cada lado da língua..... **11**

**10.** Três molares superiores e inferiores de cada lado; três pré-molares superiores; uropatágio pouco desenvolvido; margem posterior de uropatágio geralmente bem peludo; caninos superiores de tamanho moderado..... ***Anoura caudifer***

**10'.** Dois pré-molares superiores; incisivos inferiores bem desenvolvidos em adultos; I1 sobressai muito além da ponta do I2; incisivos inferiores aglomerados, geralmente em contato uns com os outros e caninos..... ***Glossophaga soricina***

**11.** Comprimento do crânio menor que 24,5 mm; comprimento da fileira de dentes da maxila igual ou inferior a 7 mm (6,2-7 mm); maior comprimento do crânio (19,6-21,8 mm); antebraço 31-34 mm..... ***Lonchophylla thomasi***

**12.** Lábios com pequenas papilas ou com um par de almofadas dérmicos dispostos em um V ou Y; molares superiores com cúspides externas distintas em forma de W..... **13**

**12'.** Molares superiores sem cúspides externas distintas em forma de W..... **26**

**13.** Um par de incisivos inferiores..... **14**

- 13'**. Dois pares de incisivos inferiores..... **19**
- 14**. Cauda bem desenvolvida; antebraço inferior a 70 mm; comprimento do crânio menor que 35 mm; dois pré-molares inferiores; margem da folha nasal crenulada e franjas com pelos retos; listra dorsal presente mediana pálida ou ausente; membrana da asa anexada ao lado do pé; antebraço 45-51 mm; maior comprimento do crânio (21-23mm); pelos dorsais variando de acinzentada a marrom enegrecida; listra dorsal ao longo da linha média; sem ranhura vertical entre protocônide e hipocônide no cingulo lingual de M1 e M2..... ***Mimon crenulatum***
- 14'**. Cauda bem desenvolvida; antebraço inferior a 70 mm; comprimento do crânio menor que 35 mm; três pré-molares inferiores..... **15**
- 15**. Constrição pós-orbital inferior a 5 mm..... **16**
- 15'**. Constrição pós-orbital maior que 5 mm..... **18**
- 16**. Antebraço maior que 49 mm; comprimento do crânio maior que 26 mm... **18**
- 16'**. Antebraço menor que 49 mm; comprimento do crânio menor que 26 mm..... **17**
- 17**. Antebraço mais curto do que 40 mm; maior comprimento do crânio inferior a 21 mm..... ***Lophostoma braziliense***
- 18**. Manchas brancas pós-auricular presentes ou ausentes; pelagem ventral mais pálida, muitas vezes fortemente fosco branco; superfície anterior do segundo pré-molar superior sobreposto por primeiro pré-molar superior..... ***Lophostoma silvicolum***
- 18'**. Constrição pós-orbital geralmente 5,0-5,5 mm; diferença distinta entre cingulo de caninos inferiores quando visto de cima; listra no topo da cabeça entre as orelhas..... ***Tonatia saurophila***
- 19**. Cauda contida na membrana interfemoral, não se estendendo a margem posterior; dois pré-molares inferiores..... **20**
- 19'**. Cauda contida na membrana interfemoral, não se estendendo a margem posterior; três pré-molares inferiores..... **23**
- 20**. Calcâneo igual ou maior do que o comprimento do pé; comprimento da orelha mais de 25 mm; crista sagital bem desenvolvido..... **21**
- 20'**. Calcâneo mais curto do que o comprimento do pé; comprimento da orelha inferior a 25 mm; crista sagital ausente ou pouco desenvolvida..... ***Phyllostomus discolor***

21. Antebraço menor que 75 mm; membrana da asa anexada aos tornozelos; maior comprimento do crânio inferior a 35 mm.....**22**
- 21'. Antebraço maior que 75 mm; membrana da asa anexada ao lado do pé; maior comprimento do crânio maior que 35 mm,.....***Phyllostomus hastatus***
22. Antebraço maior que 61 mm; tíbia mais do que 23 mm; maior comprimento do crânio maior que 29 mm.....***Phyllostomus elongatus***
23. Antebraço maior que 100 mm; cauda ausente; rostro mais longo que caixa craniana.....***Vampyrum spectrum***
- 23'. Antebraço menor que 75 mm; cauda presente; rostro menor que caixa craniana.....**24**
24. Varias papilas ao redor da boca; margem da folha nasal levemente serrilhada; antebraço entre 55-65 mm.....***Trachops cirrhosus***
- 24'. Sem papilas ao redor da boca; margem da folha nasal não serrilhada.....**25**
25. Antebraço 33-58 mm; maior comprimento do crânio 17-28 mm; primeiros incisivos superiores semelhantes aos caninos em comprimento; primeiro pré-molar superior (P3) com cúspides acessórias sobre as margens lingual e posterior; ventre de cor escura semelhante ao dorso; antebraço com comprimento superior a 41 mm; maior comprimento do crânio superior a 21 mm; incisivos inferiores estreitos com e coroas altas.....***Micronycteris hirsuta***
26. Molar 2/2.....**27**
- 26'. Molar 2/3 ou 3/3.....**33**
27. Arcada dentária superior não semicircular, rostro maior que a ½ da caixa craniana; rostro não inflado ou em forma cuboide; sem nasais, a margem posterior de narinas externas marcadas em forma de lira; tamanho moderada a grande, antebraço maior que 43 mm, comprimento do crânio maior que 23 mm; incisivos superiores internos delgados e paralelos uns aos outros (não convergentes nas pontas); listras dorsais e faciais relativamente discretos ou ausentes.....***Chiroderma villosum***
- 27'. Nasais presentes, a margem posterior de narinas externas sem marginalização em forma de lira.....**28**
28. Margem posterior das narinas externas mais ou menos em linha reta; segundo molar superior muito menor do que o primeiro e em forma diferentes; processo

paroccipital pequeno ou moderadamente desenvolvido; pelos dorsais bicolores; primeiro incisivo superior marcadamente bífido, duas vezes menor que o tamanho da segunda incisivo.....	<b>29</b>
<b>28'</b> . Primeiro incisivo superior não bífido ou apenas fracamente, duas vezes maior que o tamanho da segunda incisivo; segundo molar superior visivelmente maior do que em primeiro lugar; pré-molares superiores separados uns dos outros partir de dentes adjacentes através de lacunas evidentes.....	<b><i>Mesophylla macconnelli</i></b>
<b>29</b> . Antebraço menor que 46 mm.....	<b>30</b>
<b>29'</b> . Antebraço maior que 46 mm.....	<b>31</b>
<b>30</b> . Molares 2/2; membrana Interfemoral praticamente sem pelos.....	<b><i>Dermanura cinerea</i></b>
<b>30'</b> . Molares 2/2.....	<b><i>Dermanura sp</i></b>
<b>31</b> . Molares 3/3; listras faciais geralmente evidentes; ferradura da folha nasal com borda inferior, geralmente livre do lábio superior; ponta das asas pálida; antebraço maior que 61 mm; comprimento do crânio maior que 29,5 mm.....	<b><i>Artibeus planirostris</i></b>
<b>31'</b> . Molares 3/3; pelos longos, enegrecidos; listras faciais fracas ou ausentes; mascara negra ao redor dos olhos.....	<b><i>Artibeus obscurus</i></b>
<b>32</b> . Molares 2/3; listras faciais proeminentes e bem definidas.....	<b><i>Artibeus lituratus</i></b>
<b>33</b> . Molar 2/3.....	<b>34</b>
<b>33'</b> . Molar 3/3.....	<b>34'</b>
<b>34</b> . Primeiro incisivo superior não bífido ou levemente bífido e duas vezes maior em tamanho que segundo incisivo; segundo molar superior de tamanho igual a, ou menor do que o primeiro; incisivos 2/1; primeiro incisivo mais de alto que primeiro pré-molar; comprimento do crânio inferior a 24 mm; primeiro pré-molar inferior caniniformes.....	<b><i>Vampyressa sp</i></b>
<b>34'</b> . Arcada dentária superior não expandida lateralmente, em forma de U, vista occlusal.....	<b>35</b>
<b>35</b> . Membrana interfemural ausente; molares superiores distintamente sulcados longitudinalmente.....	<b>36</b>
<b>35'</b> . Membrana interfemural presente mesmo que às vezes reduzida; molares superiores sem sulco longitudinal.....	<b>37</b>

**36.** Quatro incisivos inferiores, dois de cada lado, e não reduzida para espículas; Molares e pré-molares geralmente em contato com os dentes adjacentes; cúspides linguais do M1 e M2 bem definidas e separadas por um entalhe profundo; paraconide não está presente em M1 e M2; antebraço inferior a 55 mm; antebraço entre 43-51 mm; pontas dos incisivos superiores interiores amplos e fracamente bilobado com os lóbulos de igual tamanho.....***Sturnira tildae***

**36'.** Antebraço 45,5 mm ou menos; maior comprimento do crânio 20.0- 24,5 mm; pontas dos incisivos superiores interiores estreitas; linhas dentes superiores arqueadas para fora; incisivos superiores internos levemente bifeto.....***Sturnira lilium***

**37.** Primeiro incisivo superior duas vezes o tamanho do segundo e diferente em forma; espaços evidentes presentes entre os incisivos superiores; coroas de primeira incisivos superiores paralelo, profundamente bífida; incisivos inferiores em contato uns com os outros; cor escura, listras faciais proeminentes, margem orelha amarelada, membrana interfemoral quase nua.....***Uroderma bilobatum***

**37'.** Coroas de primeiros incisivos superiores convergem nas suas extremidades, não profundamente bífida; incisivos inferiores separadas por espaços distintos.....**38**

**38.** Antebraço maior que 54 mm; comprimento do condilobasal maior que 26 mm; dorsal com pelagem marrom claro a marrom escuro, não enegrecido; listras dorsais e faciais; PM4 com uma curta cúspide posterior.....***Platyrrhinus infuscus***

**38'.** Pelage castanho claro ao castanho-escuro; listras faciais sempre brancas e geralmente bem visíveis; antebraço 32-42 mm; crista anterolingual no último pré-molar inferior (p2) com uma cúspide acessória bem desenvolvida.....***Platyrrhinus incarum***.

**Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Vespertilionidae coletados.**

1. Orelhas normais, comprimento menor que 20 mm, não alcançando a ponta do focinho quando dobradas para frente .....**2**
2. Superfície dorsal da membrana interfemural densamente pilosa.....**3**

- 2'. Superfície dorsal da membrana interfemural nua ou pouco pilosa; se pilosa, com pelos esparsos e apenas na porção proximal.....4
3. Coloração geral avermelhada; orelha arredondada ou romboidal, antebraço menor que 45 mm (36,75 – 40,45 mm); superfície dorsal da membrana interfemural densamente pilosa em toda sua extensão; pré-molares 2/2 (primeiro pré-molar superior bastante reduzido)..... ***Lasiurus blossevillii***
4. Incisivos 2/3.....5
5. Face dorsal da membrana interfemural pouco pilosa em sua porção proximal; pré-molares 3/3; focinho não inflado; coloração geral castanha a castanha-enebecida; membrana interfemural sem franja, sem despigmentação ou borda pregueada; crista sagital presente; segundo pré-molar superior deslocado internamente à série de dentes (deslocado para a face lingual) (Figura 46), se não completamente deslocado esse dente é reduzido e comprimido lateralmente entre o primeiro e o terceiro pré-molares.....***Myotis riparius***.

**Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Emballonuridae coletados.**

1. Fenda Basefenoidal dividida por septo mediano; dorso com duas linhas esbranquiçadas ou castanho mais ou menos distintas longitudinais, asa ligada ao tarso ou no tornozelo, pelagem dorsal castanha uniforme; linhas dorsais longitudinais geralmente distintos; comprimento do antebraço 37,4 - 42,3 (machos 37,4 - 40, fêmeas 39.1 - 42.3); comprimento da fileira de dentes do maxilar superior 5 (5,1-5,5); maior largura de molares transversais (M3-M3) geralmente mais de 6 (5,9-6,3).....***Saccopteryx leptura***.