

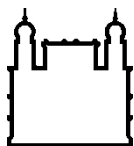
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno

SUELEN SANCHES FERREIRA

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

SUELEN SANCHES FERREIRA

Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno

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

Orientador (es): Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque
Dr^a. Marina Galvão Bueno

RIO DE JANEIRO

Março de 2019

FERREIRA, SUELEN SANCHES.

Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno / SUELEN SANCHES FERREIRA. - Rio de Janeiro, 2019.

xxviii, 128f. f.; il.

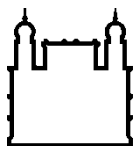
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Co-orientadora: Marina Galvão Bueno.

Bibliografia: f. 101-115

1. Trypanosomatidae. 2. Triatominae. 3. Mammalia. 4. Zoológico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

SUELEN SANCHES FERREIRA

Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque
Dr^a. Marina Galvão Bueno

Aprovada em: 20/03/2019

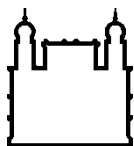
EXAMINADORES:

Prof. Dr. Márcio Galvão Paván
Prof. Dr. Rafael Veríssimo Monteiro
Prof. Dr^a. Cecília Andreazzi

Prof. Dr^a. Nádia Regina Pereira Almosny
Prof. Dr^a. Maria Halina Ogrzewalska

Presidente e Revisor (IOC/Fiocruz)
Membro externo (UFJF)
Membro interno (Campus Fiocruz da Mata Atlântica/FIOCRUZ)
Suplente externo (UFF)
Suplente interno (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 20 de março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Suelen Sanches Ferreira**, sob orientação do Dr. André Luiz Rodrigues Roque e Dr^a. Marina Galvão Bueno. Ao vigésimo dia do mês de março de dois mil e dezenove, realizou-se às treze horas e trinta minutos, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“Infecção por *Trypanosoma spp.* em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Marcio Galvão Pavan - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Rafael Veríssimo Monteiro - UFJF/MG, Dr^a. Cecilia Siliansky de Andreazzi - FIOCRUZ/RJ e como suplentes: Dr^a. Nádía Regina Pereira Almosny – UFF/RJ e Dr^a. Maria Halina Ogrzewalska – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de março de 2019.

Dr. Marcio Galvão Pavan (Presidente da Banca):

Dr. Rafael Veríssimo Monteiro (Membro da Banca):

Dr^a. Cecilia Siliansky de Andreazzi (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho à minha amada família: meu marido, Rodrigo D. Gessulli, nossos filhos de outras espécies, Bonnie Thunders e Dagmar, minha Ohana Wutuda (meus pais, Sonia Cristina S. Ferreira e Nelson Ferreira, e meus irmãos de sangue e alma, Nelson F. Júnior e Letícia Ferreira Cordeiro), meus sogros (Odimar Gessulli e Elaine D. Gessulli), cunhados (Renata Mendes, Maurício D. Gessulli e Alexandre D. Gessulli) e sobrinho (Dmitri Bahia Gessulli).

AGRADECIMENTOS

Uma das maiores dificuldades que tive ao longo do mestrado foi aprender a resumir: 4000 caracteres (contando com os espaços); 10 páginas (incluindo as referências); 15 minutos (mas treine pra sobrar tempo, pois na hora pode dar algo errado); 1 *slide*/minuto; 1,20 x 0,90m. Sempre citando apenas o essencial. Nestes agradecimentos eu não me preocupei (tanto) em resumir, afinal, eu definitivamente não cheguei até aqui sozinha: MUITAS pessoas estão envolvidos nesse processo! No entanto, acreditem, contém APENAS o essencial. Pode ser que eu tenha esquecido alguém: me perdoem! **Destaquei** o nome de vocês, pra facilitar (nem todo mundo gosta de assistir colação de grau como eu gosto).

Primeiramente agradeço a **Deus**. Desde os 11 anos, quando o professor de geografia disse que quem acreditasse em Deus iria finalmente entender "como surgiu o universo!", penso que ciência e religião não precisam se anular. Agradeço a Ele por me permitir viver essa experiência maravilhosa ao lado de todos vocês que me ajudaram!

Agradeço DEMAIS aos meus orientadores, a quem prefiro chamar de *coach*: **André Luiz R. Roque** e **Marina Galvão Bueno**. Na minha vida a palavra *coach* sempre foi imensuravelmente mais importante do que a palavra "orientador". O *bench coach* é muito mais do que fundamental pro sucesso do time (na vitória e, principalmente, na derrota). O bom *coach* é a ALMA do seu time! Ele conhece os pontos fracos e os pontos fortes. Sabe como estimular a atleta a melhorar os pontos fracos. É generoso e gentil nos momentos difíceis. Tive dois *bench coach* INCRÍVEIS e MUITO pacientes comigo. E além disso tudo, eu quero agradecer aos dois individualmente. À Marina por ser um exemplo pra mim desde sempre. Como veterinária de silvestres, envolvida em ações de conservação e projetos de pesquisa, a quem eu admiro desde meus anos da graduação e de quem eu tive a honra não só de ser estagiária (em meu primeiro estágio na área, quando comecei a amar primatas), mas também de ajudar um pouquinho em seu mestrado/doutorado. Depois como mulher incrível (e amiga), que corre atrás dos seus sonhos e me incentivou a ir atrás dos meus, me apoiando desde o início sobre meu desejo de fazer mestrado (mesmo depois de eu ter perdido meus piolhos!), e ainda me dando colo sempre nas dificuldades e nos momentos de choro! E ao André por ter aceitado me orientar sem me conhecer, me orientando inclusive em assuntos para além da dissertação – em momentos bons, como indicações de lugares para acalmar o espírito, e em momentos ruins, dando bronca e limites. Por todas as aulas (literalmente ou não) sobre ecologia e parasitologia, fazendo eu me apaixonar por parasitos! E por ser um exemplo de competência, responsabilidade e comprometimento! E aos dois por serem seres humanos íntegros, incríveis, ainda mais do que podem ser como profissionais, e por me ajudarem a entender e aceitar que eu posso, e que eu VOU, errar! E que não precisa (e nunca vai) estar perfeito! MUITO OBRIGADA! Foi e é maravilhoso ser do time de vocês, que "do banco" me orientam a cada falha, me incentivam e vibram comigo a cada acerto, e PRINCIPALMENTE

transmitem pelo olhar a confiança que têm em mim: "Você tem potencial para brilhar!". Carrego vocês pra sempre no meu coração canceriano/pisciano não-tão-musculoso-como-eu-gostaria de atleta (barreiras difíceis de passar pra entrar, mas ainda mais difíceis pra sair)!

Um time completo é formado por muito mais gente! Uma excelente *line-up manager*, que mesmo às vezes estando "de costas" pro jogo, está atenta a TUDO ao seu redor. E que mesmo não tendo o mesmo papel dos *coachs* na "orientação" das atletas, quando acha que tem que dizer algo pra melhorar a performance da atleta, simplesmente diz! E sempre é algo muito valioso! Muito obrigada à **Dra. Ana Maria Jansen** por sua participação sempre precisa e enriquecedora! Desde o primeiro conselho "Faça isso por você!" até as últimas (incansáveis e pacientes) correções de conceitos e/ou posturas! E principalmente por dicas valiosas pra vida toda: "Não sofra pelo futuro que ainda não chegou; viva e aproveite o presente!". Admiro-a demais!

Um time conta ainda com as *jammer coachs*, que ficam ali na curva, ajudando a orientar tudo de um ângulo que o *coach* geralmente não enxerga tão bem (e quando enxerga, sua voz não chegaria ali com facilidade, mesmo gritando, porque é informação demais ao mesmo tempo). Obrigada à **Samanta Xavier** e à **Juliana Barros** por todas as atividades que me ajudaram a desenvolver, ou desenvolvendo por mim quando "não dava mais tempo", fazendo pedidos de materiais durante as férias, revelando géis (e opinando e tirando dúvidas sobre eles!). Obrigada pelo conhecimento sobre sorologia e biologia molecular, dicas, conselhos e pela paciência!

Quando o time está na pista é primordial saber quem vai comandar aquele *jam*! E os *pivots* sabem exatamente "o que" e "como" fazer! Já jogaram nessa função inúmeras vezes! Muito obrigada ao **Carlos Alberto Ardé** e ao **Marco Antônio dos Santos Lima** pelo carinho com os cultivos e pela paciência em me explicar tudo tantas vezes e em me receber pra xeretar as fichas de anotações e tirar dúvidas quantas vezes precisasse! Ao **Felipe de Oliveira**, à **Viviane S. X. dos Santos** e, especialmente, ao **Marlon Silva** por toda doçura, ajuda, paciência e "horas extras" com a sorologia (e eu já disse doçura e paciência?!). E um obrigada muito especial também à **Cristiane Varella**, por estar aberta à parcerias desde antes de me conhecer pessoalmente, por me ensinar sobre biologia molecular, por dar dicas e opiniões valiosas, mas principalmente por me ajudar a me entender melhor como ser humano e me mostrar a importância da sinceridade pra um bom trabalho em equipe!

Um BOM time, daqueles que ganha campeonatos várias vezes seguidas, e que só perde pra times tão ESPETACULARES quanto ele, conta também com uma boa CAPITÃ. A capitã é a atleta modelo do time. Ela é experiente, sagaz, tem inteligência estratégica e emocional (sem ser um robô, porque quando a emoção bate no coração, ela demonstra o ser humano incrível que ela é!). Afinal, o time elegeu ela como capitã não foi à toa!! A capitã conhece as regras, conhece o time, trabalha em parceria com os *coachs* (*bench* e *jammer*) e o *line-up*, pelo bem do time, pelo bem de cada atleta! A capitã pode até ser penalizada pelas

falhas das outras atletas, faz parte das regras do jogo, mas o jeito que ela encontra pra evitar isso é: ser o exemplo. Sendo sempre O MELHOR que aquele time poderia ter. E Deus me agraciou com uma capitã que eu não tenho nem palavras pra elogiar e/ou agradecer: **Marina Rodrigues**. Você me recebeu desde o início com esse sorriso lindo, um abraço aconchegante e sua voz doce "Seja bem-vinda"! Você foi e é FUNDAMENTAL pro meu time! Sem você, não teria jogo. Quando a capitã de um time é eleita, muitas (quicá todas) as atletas olham pra ela com admiração, respeito, carinho e pensam "vou trabalhar duro pra ser COMO ela!". E é assim que eu penso: eu quero ser assim quando crescer! Inteligente, atenciosa, paciente, carinhosa, enfim, um ser humano maravilhoso completo e uma pesquisadora admirável!! MUITO obrigada simplesmente por existir (no meu time e na minha vidinha, pra sempre e com abraços de aniversário em qualquer ocasião)!

Mas e quando você está jogando como *jammer*?! O que mais um time deve ter pra ser, digamos, MARAVILHOSO? Atacantes! Um bom time, pra ajudar a sua *jammer* a passar por todas as barreiras, por todas as dificuldades, de forma mais fácil, mais rápida, menos dolorosa, com o mínimo de lesões e com o aproveitamento máximo do tempo, precisa de um bom ataque. O bom atacante conhece os movimentos da *jammer*, tem sintonia com ela: já sabe exatamente por onde e como a *jammer* quer passar! Não precisa comunicação verbal: basta o olho no olho! E eu tive ATACANTES MARAVILHOSOS ao meu lado, que me ajudaram com muito conhecimento, mas especialmente com muita parceria, cumplicidade, respeito e carinho. Que me viram gargalhar (e me zuaram por isso!), me viram chorar (e me abraçaram nessas horas!!), me ouviram desabafar (e desabafaram comigo), comeram comigo, VIVERAM comigo! Dividiram comigo não só o bloqueio na pista, mas fora dela. Meu muito obrigada aos queridos amigos **Bruno Alves**, **Fernanda Alves**, **Ludmila Gurião** e **Ada Matos** por tudo – dicas, broncas, abraços, risos, trilha, cinema, festa junina! Tudo! Meu muito obrigada à "minha" estagiária maravilhosa, **Luiza Prado**, que passou por maus bocados comigo e chorou por mim (a gente aprendeu muita coisa juntas e se abraçou bastante também – a leonina mais canceriana que eu poderia conhecer)! Muito obrigada à **Kátia Cristina** e **Elida Brandão** pela sintonia (por vezes telepática!), pelos abraços carinhosos e pela força nos momentos duros! E é claro: a mais nova integrante do meu time, que chegou pra completar esse ataque incrível com seu humor ácido e a doçura que não vou expor (muito) por respeito a ela: **Alice Berbigier**! Obrigada, amigos amados!

Tem também as demais *blockers*, que mantêm a parede do seu time intacta pra que a outra *jammer* não passe, e você ganhe tempo pra passar. Que te transmitem confiança pra que você faça sua passagem sem preocupações! Te trazem tranquilidade! Um bloqueio que em vários momentos acaba virando ataque também – afinal de contas, o jogo é dinâmico! Te dá dicas dos melhores caminhos que você pode escolher. Que no banco, no intervalo entre *jams*, te elogia pelas boas passadas e te aconselha como melhorar. Aquela *power wall* que entra com você a todo *jam*, pra GANHAR SEMPRE! Muito obrigada à **Mayra Mansur**, **Lucélia**

Guedes, Lorrayne Brito, Thaíla Pessanha, Maria Augusta Dario, Larissa Sousa, Fabiola Roman, Patrícia Nunes, Victor Hugo, Alessandra Filgueiras, Renata Pires e Camila Lopes. Por tudo que me ensinaram, seja na bancada, seja com árvores filogenéticas, seja discutindo temas importantes (ou apenas interessantes), seja como exemplo, obrigada! Obrigada também àqueles *blockers* com quem a gente joga menos, em jogos amistosos, tudo junto e misturado, mas sempre joga bem – porque quando o atleta é bom, o entrosamento acontece rápido! Muito obrigada à **Luiza Gervazoni, **Paula Finamore** e **Beatriz Junqueira** por tantas caronas e risadas! MUITO obrigada ao **Carlos Araujo**, de quem sempre lembrarei com muita alegria, carinho e muita admiração – e, por vezes, com a microbiota inflamada! Agradeço ainda à **Ana Cláudia Penna** e toda sua família, **Ricardo**, **Laura** e, especialmente, **Bruninho**, por tantas caronas, por me esperarem em diversos momentos (mesmo às vezes com pressa), por tantas conversas maneiras, por serem do time da resistência e por essa vizinha doce, dando oi, pedindo biscoito e dando tchau pra "Tia Sussu"! Memórias de um time que levarei pra sempre no coração!**

Tem atletas que podem ser convocadas só no overtime jam, mas que chegam com um grande espírito de equipe, simplesmente pra ajudar a somar pontos. Obrigada, **Talitha Mayumi Francisco** por todo carinho, fofura, por me receber tão bem e me ajudar com a elaboração da rede bipartida!

Além do time, tem um requisito básico pra mágica acontecer: sem oficial, não tem jogo! Os juízes, estejam eles de patins (REF) ou sem patins (NSO), são essenciais pro bom andamento do jogo. Observam se tudo está caminhando bem. Pedem aquele *official timeout* básico se tem algo saindo do prumo. Advertem quando algo está errado. Obrigada ao pessoal que trabalha com hanseníase pelos inúmeros "empréstimos" do Nanodrop. Obrigada à **Rita Gomes**, **Ana Dantas** e **Rosilene de Jesus** pelas informações, ajuda e paciência. Obrigada às meninas da plataforma de sequenciamento, sempre queridas e trabalhando em tempos recorde! Obrigada ao **Hugo Guimarães**, pela ajuda com a identificação dos primeiros triatomíneos que chegaram ao LABTRIP. Obrigada à **Renata Bianck** por todos os agendamentos de transporte de meio de cultivo! Obrigada à **Jaque**, por deixar o material prontinho pra uso! Obrigada às meninas **Sonia** e **Cris**, por manterem o ambiente limpo, cheiroso e agradável! Um obrigada especial à **Valquiria Trajano** e à **Maria Felipe**, por organizarem nossas vidinhas burocráticas no LABTRIP, me aceitarem em sua sala e ainda me fazerem dar boas risadas! E muito obrigada também ao **Fabio Kruger**, da ASFOC, por todo apoio e carinho que me deu em um momento tão difícil e de grande crescimento espiritual.

Mas e o que acontece FORA "da pista"?! Toda atleta, pra render bem na pista, conta com um bom *offskate!* O condicionamento físico é o que garante que a atleta consiga executar tudo que sabe durante o jogo! Eu tive uma equipe e tanto pra me ajudar nos bastidores! Essa equipe se chama **FPZSP!** Primeiramente, obrigada a todos os animais da fundação,

especialmente **Vermelho**, **Soneca**, **Milu** e o gambá LBT **10278** por cederem, involuntariamente, amostras ao projeto. Tratamos a todos com o respeito que gostaríamos de ser tratados. Obrigada ao **Dr. João Batista da Cruz**, ao **Dr. Paulo M. Bressan** e à **Dra. Patrícia L. Ramos**, por entenderem a importância do tema, demonstrarem confiança no trabalho do LABTRIP e autorizarem a execução do projeto! Obrigada aos colegas **Fabício Rassy** e **Carolina Nery** pela escolha dos animais que fariam parte do projeto, pela paciência com os meus pedidos (e por sempre atendê-los!), pelo respeito, pela atenção, por tocarem as coletas quando eu não estava presente, pelos dados clínicos dos animais, por todo esforço que o projeto (com coletas e recoletas!) exigiu de vocês e vocês se mantiveram firmes comigo até o final! E apesar de estarem "no comando", tudo isso só foi possível graças aos esforços de várias colegas incríveis! Obrigada **Suzana B. Hirata**, **Claudia R. Ontivero**, **Robertta C. A. Nogueira**, **Jordana Barros**, **Luísa C. S. Belmiro**, **Bruna Z. de Campos** e **Marina Yumi Kanadani** por todas as coletas, por cada amostra preciosa, mesmo perto do temido fogareiro, e pelos maravilhosos *memes* que me fazem gargalhar até hoje! Obrigada às meninas do laboratório que tiveram paciência com minhas "estagiáricas", me ensinaram o que podiam, tocaram os exames a fresco e tudo mais que foi necessário quando eu não estava presente, me encaminharam todas as informações que eu solicitava e pelas muitas risadas e lanchinhos! Obrigada **Carolina Chagas**, **Irys Gonzalez**, **Paula Salgado**, **Adeline Quadrini**, **Bárbara Rodrigues**, **Priscila Calil** e **Bianca Trassi Miquel**. Obrigada também a melhor equipe de campo do mundo: **Cauê Monticelli**, **Luan Henrique Moraes** e **Amanda Alves**. Por estarem cedo conosco nas trilhas, por comerem "café da manhã de teia" conosco, pelas caronas, pelos dados biológicos dos animais, pela doçura e paciência e principalmente pela ajuda com a soltura dos gambás após a recuperação anestésica. Se não fossem vocês, o dia 27 de fevereiro de 2018 (o famigerado "dia que nunca acabou"), e tantos outros, teriam sido ainda mais longos e cansativos! Sei que algumas solturas foram feitas por tratadores que eu nem sequer conheci, assim como a contenção dos animais. Por tudo isso, um obrigada ao **Luizinho** (tratador da DV), à **Jéssica** (tratadora da Soneca, do Milu, da Titi e da Guti) e a todos os demais tratadores que cuidam dos animais da fundação com carinho e respeito! Sem essa galera, não teria zoológico! Um obrigada às meninas maravilhosas que me ajudaram com diversos assuntos burocráticos e fichas de animais: às **Fátimas**, à **Rosana** e à **Denise**! E obrigada aos estagiários maravilhosos da DV e do Setor de Mamíferos que eu não tive a oportunidade de conhecer, mas que ajudaram nas execuções de diversas atividades e da compilação de dados dos animais quando eu não podia estar na FPZSP! Agradeço a todos por me receberem de braços abertos, sempre com muito respeito, atenção e paciência! Fico feliz em poder agradecer também pela AMIZADE de vários de vocês que vou carregar pra sempre! Vocês são profissionais extremamente competentes, éticos, comprometidos, responsáveis e desenvolvem um trabalho incrível. Admiro, respeito e tenho um carinho grande por todos. Obrigada!

Tem também os "atletas modelo" de outros time e a torcida! A torcida, pra mim, muito mais do que vibrar com as vitórias do time, tem o papel fundamental de ANIMAR o time nos momentos difíceis e nas derrotas. A torcida está lá pra dizer: estarei sempre aqui, te admirando, porque mesmo que você não vença sempre, eu sei que você é incrível e que você pode! Sí, se puede! Cinco más! Mas e quando os atletas modelo, além de serem fonte de inspiração, espelhos, exemplos pra seguir, FAZEM PARTE da torcida?! É muita sorte! É muito amor! E por ser MUITO AMOR mesmo, nesta parte eu tentarei ser mais sucinta e citar "apenas" aqueles que tenham relação direta com o projeto (me desculpem se eu falhar). Assim, eu quero agradecer especialmente à **Profa. Dra. Silvia Cortopassi** por todas as aulas, carinho e atenção desde a graduação. Por fazer a diferença SIM, ser um exemplo, e me desafiar em diversos momentos! Obrigada por me receber em sua sala para discutir protocolos anestésicos, doar o seu tempo, a sua doçura e o seu conhecimento sem ganhar nada em troca além de mais respeito, carinho e admiração! Espero que possamos estar sempre perto! E um obrigada especial aos colegas e amigos queridos que abriram portas pra mim, me ajudando a engatinhar na medicina veterinária de animais selvagens: **Adriana Joppert**, **Thaís Guimarães** e **Samuel Betkowski**. E também a todos os profissionais que participaram de algum capítulo importante da minha carreira, alguns fazendo parte da minha vida como grandes amigos até hoje. Todos vocês, de alguma forma, me inspiram e me deram força nessa caminhada (pelo exemplo, pela amizade ou pelos dois!);, **Tânia de Freitas Raso**, **Ivone Kuribara**, **Melissa Peixoto**, **Mariana Hereny**, **Vanessa Olivares** (meu eterno quarteto fantástico!), **Amanda Coimbra**, **Ticiane Zwarg**, **Alice Soares**, **Thaís Sanches**, **Tatiane Sipriani** (além de veterinária maravilhosa, minha eterna melhor amiga e namorada, além de comadre de casamento), **Erika van Tol**, **Thaís Butti**, **Fernanda Gonsales**, **Cristina Amaral** e **Katherine Colomba**. Obrigada também aos colegas da área, de mesma profissão ou não, que são grandes exemplos de competência e ética: **Flavia Miranda**, **José Luiz Catão Dias**, **Eliana R. Matushima**, **Raquel von Hohendorff**, **Henrique Noqueira**, **Henrique Becker**, **Monally Aquino**, **Fernando Gaspari**, **Roque Gaspari**, **Luis Fernando Melo** e **Murilo P. Del Grande**. Um obrigada especial a um grande entusiasta da pesquisa e da carreira acadêmica, que me estimulou a trilhar esse caminho, e com quem as conversas são sempre muito enriquecedoras e animadas: **Helio Secco**. Obrigada aos pesquisadores da Fiocruz que me inspiram, em especial pela competência, pela doçura e pelo respeito aos outros seres humanos: **Alena Mayo Iñiguez**, **Monick L. Guimarães**, **Roberta Olmo**, **Anunciata Sawada**, **Marcos Vannier** e **Elba Lemos**. Obrigada ainda aos pesquisadores que aceitaram compor a **banca examinadora** (Dr. Márcio G. Paván, Dr. Rafael V. Monteiro, Dra. Cecília Andreazzi, Dra. Nádia R. P. Almosny e Dra Maria Halina Ogrzewalska), conseguindo se fazer presentes ou não no dia da apresentação. Obrigada por terem lido este documento, terem dado atenção ao meu trabalho e, principalmente, contribuído com a melhoria dele!

Outra fonte de inspiração (talvez a maior delas!) são todos os animais que já passaram pela minha vida, sendo meus filhos, sobrinhos ou meus pacientes, mas que me ensinaram TANTO e todo o pouco que sei hoje: **Pluck Duck** (sobre amor, castigo e vingança), Nina Mandioca, Mel, Belinha, Carmem Lúcia, Pituxa, **Maggie** (sobre ser veterinária), Syang, Kimbol, Madonna, Panter, Kissy, Rusty, Max Má-máquito, Fila Fi-fi-fila, Miluzinho, Pretinha, Dilma, Negão e todos os peixes "apócrifos" que eu enterrava em caixinhas de fósforo quando morriam. E também: Garrincha, Picuco, Mariazinha, Peregrino "meu filho", todos os milhares de filhotinhos que eu pude alimentar, limpar, aquecer e amar – e os outros pacientes adultos a quem também pude doar o meu tempo e aprender cada vez mais.

É claro que na torcida também tem a "marmelada". Aquela torcida literalmente mais doce, que apoia o time desde quando as atletas se juntaram e disseram: vamos tentar?! Aquela torcida que se fantasia de monstro ou de unicórnio pra torcer, pinta a barriga e o rosto, faz grito de guerra, faixa brega, compra todos os modelos de camiseta pra ajudar o caixa do time! Por isso, eu JAMAIS poderia deixar de agradecer: MEUS AMADOS PAIS, **Sonia Cristina Sanches Ferreira** e **Nelson Ferreira**, por serem os meus exemplo de garra, caráter e amor! Por me pegarem no colo, LITERALMENTE, até hoje! Por serem os corações mais doces e amáveis, e o casal mais chorão (eu e Rodrigo estamos quase empatados na disputa!) e cheio de amor pelos filhos que eu conheço! Por me apoiarem SEMPRE, mesmo achando que eu estava ficando maluca! Mesmo quando eu decidi ficar mais dois anos na graduação, pra fazer mais estágios!! Esses dois anos fizeram uma grande diferença na minha carreira, e sei que vocês sabem disso! Amo vocês do tamanho do mundo! Obrigada ao meu irmão, **Nelson Ferreira Júnior**, por também me apoiar e me amar, apesar de eu ter um temperamento TÃO diferente do seu e tão difícil de aturar – obrigada por me chacoalhar, literalmente em algumas ocasiões, e me fazer enxergar! Obrigada por ser o melhor irmão que Deus poderia me dar! Eu nunca cansarei de repetir: você é o maior tesouro que a vida me deu. Te amo mais que tudo! Obrigada à minha irmã de alma, minha caçula que veio em outra barriga: **Letícia Ferreira Cordeiro**, por ser esse mulherão da (você sabe), forte, guerreira, esforçada, inteligente e estudiosa ("como a Suelen", alguns dizem por aí, rsrsrs!). Obrigada por ser resistência ao meu lado! Pra mim, será sempre UMA HONRA ser comparada a você! E que um dia, espiritualmente, eu atinja sua elevação! Você é LUZ na minha vida, de uma forma que só você consegue ser! Obrigada por existir, minha irmã! Te amo! Obrigada, MUITO OBRIGADA, ao meu maridão, meu alô, **Rodrigo Delmonte Gessulli**. Primeiro por apoiar minha ideia maluca de fazer mestrado em outra cidade, morar em outra casa, e deixar você, a nossa baixinha, **Bonnie Thunders**, nossa "qué qué", **Cocada**, e nosso "Gojira", **Daqmar**, sozinhos em casa por tantos períodos longos e intermináveis. Enfrentamos perrengues que só a gente sabe nesses 2 anos. Nas horas difíceis você e a Bonnie me ajudaram como puderam: com abraços, com amor, com palavras doces, com uivos carinhosos, pelo telefone ou pela *internet*. A Cocada ajudou com a doçura de suas bicadas, com o sorriso que me trazia

ao rosto ao vê-la tomar banho e brigar com as rolinhas que vinham comer sua comida, e com a alegria de seus diálogos "intermináveis", mas que infelizmente tiveram um fim durante o mestrado. E o Dagmar ajudou me distraindo para procurá-lo sob a geladeira ou atrás do botijão de gás, me fazendo pensar em outras coisas além do mestrado e me divertindo. Falar com você, meu alô, diversas vezes por dia, todos os dias, foi o que me manteve de pé. Além disso, assistiu minhas apresentações *online* pra eu poder ensaiar! Ouviu eu ler meus textos, me ajudou a corrigir, com a sua visão e seus conhecimentos de biólogo que eu admiro tanto! Foi resistência ao meu lado nos momentos de crise política. Segurou minha mão e não me deixou desistir. Você é meu porto seguro! Você e a baixinha são minhas vidinhas! Amo vocês, a Cocada (*in memorian*) e o Dagmar! O que eu escrevi está longe de demonstrar toda gratidão que eu sinto pelo que fizeram por mim todos esses anos, e principalmente durante o mestrado, mas eu nunca seria capaz de transformar em palavras tudo que eu sinto por vocês. E se eu agradeço meu marido, preciso agradecer minha marida: **Ana Clara Miranda**. Um labrador humano que o *roller derby* trouxe pra minha vida anos atrás e que, com o passar dos anos, passou de colega de time e *coach* a uma amiga das mais maravilhosas! Uma marida linda, companheira, parceira, inteligente, engraçada, criativa, e, principalmente, solidária. Você me deu uma casa e também um lar! Me deu teto, cama e chuveiro quentinhos, mas mais do que isso, também me abraçou muito, me deu amor (especialmente quando o Rodrigo não podia estar lá), enxugou minhas lágrimas, assistiu minhas apresentações, deu sugestões! E ainda por cima me emprestou os bebês, **Billy e Mandy**, pra eu esmagar, brincar e morder sempre que precisasse!! Se não fosse por você, marida, eu não teria conseguido. Obrigada! E como estou falando de família e amores, tem mais algumas pessoas especiais pra agradecer. Minha cunhada incrível, **Renata Mendes**, por ser esse amorzinho, amiga, carinhosa, e me acolher (e às minhas amigas também) na sua casa – e por cuidar bem do meu tesouro maior! Meus sogros, **Odimar Gessulli** e **Elaine Delmonte Gessulli**, pelo presente que trouxeram ao mundo, e educaram de forma a ser esse homem exemplar que eu amo tanto, por sempre cuidarem bem de mim, com tanto amor e carinho, por me fazerem rir e me acolher na casa de vocês, me deixando à vontade mesmo quando o Rodrigo não estava presente! Obrigada também aos meus cunhados, **Maurício D. Gessulli**, pelo carinho, abraços, risadas e pelo meu sobrinho lindo, e **Alexandre D. Gessulli**, por me ensinar sobre a vida e sobre mim mesma e por toda parceria e amor com o Rodrigo! Obrigada ao meu sobrinho, **Dmitri Bahia Gessulli** pelo amor, carinho, abraços, risadas e momentos de lazer sempre maravilhosos ao seu lado, e à querida **Juliana Bahia** por encaminhar os vídeos desse lindinho cheios de amor pra "tia Su"! Agradeço a Deus pela família maravilhosa do meu marido que veio junto com ele pra minha vida! Quero agradecer ainda minhas primas amadas de Mogi das Cruzes (**Dani**, **Silvia** e **Viviane Alvarez**), por serem resistência em momentos duros, e a todos meus primos, tios e avós, que mesmo de longe e de outros planos, estavam sempre presentes. Obrigada especialmente ao meu avô **Rafael Sanches Filho** e à minha avó, "aquela velha", "veinha",

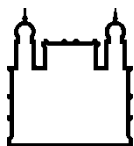
"Zizi", **Dionisia Torres Barbero Sanches**, que foram os alicerces da nossa família em diversos sentidos e momentos.

Um obrigada especial ainda a TODOS os meus amigos de longas datas que deram força nos momentos difíceis, sempre com palavras amáveis e bons conselhos para que eu não desistisse do sonho de fazer esse mestrado. Eu não conseguiria citar TODOS vocês aqui, pois Deus me agraciou com muitas almas maravilhosas em meu caminho!! Por isso, deixarei um obrigada mais do que especial àqueles que estiveram "mais presentes" nesses 2 anos, mesmo estando a mais de 400 km de distância: ao meu mano, **Gabriel Scatolin**, e minhas amadas **Carolina Mayumi** e **Camile Mariana**. A amizade, o amor, e a irmandade que existe entre nós me torna mais forte! Obrigada à **Isis Mariana** e ao **Arnaldo Shindi** por compartilharem suas experiências desesperadoras de mestrado, me mostrando que eu era capaz! Obrigada às mulheres inspiradoras de tempos difíceis: **Carolina Shecaira**, **Raísa** e **Duda Salabert**. Obrigada a todxs amigxs que o *roller derby* me trouxe, por me darem força na pista e fora dela. Por me mostrarem que não existe *wall* impenetrável se a gente souber trabalhar em equipe! É tanta gente *maravilhouser*, mas quero agradecer especialmente: Ladies (**Boazona**, **Manu**, **Luka**), Sugars (**Bauer**, **Vivi**, **Caruso**, **Periald**, **Mini**, **Letícia**, **Guine**, **Angelina**, **Helena**, **Vanessas** e, principalmente, **Lídia**, **Gi** e **Valesca**, que me ofereceram/deram abrigo no começo disso tudo!), Avas (**Ana Clara** de-novo-sim, **Lala** e **Lari**), Seleção (por me inspirarem sempre e cada vez mais: **Claudinha**, **Bonsai**, **Maria "sua" Loka**, **Cris**, **Karmem** e **Celice**) e os meninos (especialmente **Lyon**, **Renan** e **Felipe**, por me derrubarem e me fazerem levantar com mais vontade de ir pra frente!).

Obrigada ao apoio e financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), para a execução do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES), pois o presente trabalho foi realizado com seu apoio (Código de Financiamento 001).

E por último, a Deus novamente. Que permitiu que TUDO isso acontecesse na minha vida. Que permitiu que minha família me proporcionasse bons estudos, pra eu cursar a faculdade que cursei. Que me permitiu trabalhar com os animais silvestres (livres, brutos e "sensíveis" como eu) e conhecer a Marina, pra gente se encontrar de novo nesse tal de MESTRADO! Que me fez atleta de corpo, alma, coração e MENTE. Que trouxe o *roller derby* como forma de aprender tanto sobre mim, sobre o mundo e sobre xs outrxs. Entender sobre disciplina, determinação, garra, trabalho em equipe e sobre NÃO DESISTIR NUNCA! Que me apresentou o *roller derby* carioca, que foi a força que eu precisava pra suportar me afastar do meu marido, da minha filha canina e da minha família por dois anos.

Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo dos animais. Nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra toda a humanidade. (Leonardo Da Vinci)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno

RESUMO

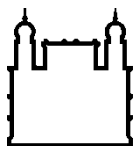
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Suelen Sanches Ferreira

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, cujo ciclo de transmissão é primariamente enzoótico. É um parasito antigo de mamíferos selvagens. Infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* em animais cativos são pouco estudadas. Para compreender a participação destes mamíferos no ciclo de vida do parasito, obtivemos 106 amostras de sangue de animais das ordens Primates, Carnivora, Rodentia, Cetardiodactyla e Didelphimorphia da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Ademais, capturamos 62 mamíferos de vida livre (Didelphimorphia, Rodentia e Primates) e 11 triatomíneos (*Panstrongylus megistus*) do entorno. Para os mamíferos realizou-se inquérito sorológico, exame à fresco, cultura (LIT-NNN) e diagnóstico molecular (Nested-PCR 18S rDNA) a partir de hemoculturas positivas e sangue. Para a análise de triatomíneos, realizou-se cultura de tubo digestivo (LIT-NNN) e diagnóstico molecular a partir de culturas positivas e tubo digestivo congelado. Amostras positivas no diagnóstico molecular foram sequenciadas e analisadas quanto à similaridade com sequências de referência (GenBank®), seguido de análises filogenéticas. Dentre os mamíferos cativos, 41,5% (44/106) apresentaram resultados positivos: 3% (3/104) em exames à fresco (*Leontopithecus chrysomelas*); 4,7% (5/105) em hemoculturas; 31,8% (29/91) em inquéritos sorológicos; e 32% (34/106) em análises moleculares de sangue. Foram identificados sete parasitos do gênero *Trypanosoma* em mamíferos cativos: *T. rangeli* (n=1), *T. minasense* (n=1), *T. dionisii* (n=1), *T. janseni* (n=1), *T. terrestris-like* (n=4), *T. cruzi* DTU Tcl (n=23) e *T. cruzi marinkellei* (n=1). Duas coinfeções foram observadas em *L. chrysomelas* (*T. cruzi* DTU Tcl / *T. dionisii* e *T. cruzi* DTU Tcl / *T. cruzi marinkellei*). Dos mamíferos cativos infectados por *T. cruzi*, 64% (16/25) são casos autóctones. Dentre os mamíferos de vida livre, 53,2% (33/62) apresentaram resultados positivos: 26,6% (16/60) em exames à fresco; 33,8% (21/62) em hemoculturas; 38% (22/58) em inquéritos sorológicos, todos *D. aurita*; além de 40% (24/60) em análises moleculares de sangue (*D. aurita*, *S. villosus* e *Alouatta clamitans*). Foram identificadas 2 espécies de *Trypanosoma* em mamíferos de vida livre: *T. minasense* em *A. clamitans* e *T. cruzi*, genótipos DTU Tcl em *D. aurita* (n=16) e *S. villosus* e DTU TcII em *D. aurita* (n=2), além de uma infecção mista Tcl / TcII. Dos *P. megistus* coletados, 90,9% (10/11) estavam infectados por *T. cruzi* DTU Tcl e dois apresentaram coinfeção com *T. cruzi marinkellei*. Os mamíferos cativos participam do ciclo enzoótico de diferentes

Trypanosoma spp. na FPZSP. Estes parasitos compõem a biodiversidade local e estão geograficamente dispersos pela instituição. A transmissão de *T. cruzi* na FPZSP decorre da proximidade com a mata, de onde são oriundos *P. megistus* e *D. aurita*, além da manutenção de ao menos duas espécies de reservatórios cativos (*D. aurita* e *S. villosus*). A movimentação de animais cativos, em permutas ou reintroduções, pode resultar no intercâmbio de parasitos. É fundamental acompanhar a saúde animal e compreender seus padrões de infecção como forma de melhorar sua qualidade de vida e prevenir a transmissão de parasitos.

Palavras-chave: tripanosomatídeos, *Trypanosoma cruzi*, mamíferos cativos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Infection by *Trypanosoma* spp. in captive wild mammals from Fundação Parque Zoológico de São Paulo, triatomines and small wild mammals from surrounding forest

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Suelen Sanches Ferreira

Trypanosoma cruzi is a flagellate protozoan from Trypanosomatidae family, which transmission cycle is primarily enzootic. It is an ancient parasite of wild mammals. Infections by *Trypanosoma cruzi* in captive animals are poorly studied. In order to understand the participation of these mammals in this parasite's life cycle, we obtained 106 blood samples from Primates, Carnivora, Rodentia, Cetardiodactyla and Didelphimorphia from the *Fundação Zoológico de São Paulo* (FPZSP). Besides, we captured 62 free-living mammals (Didelphimorphia, Rodentia and Primates) and 11 triatomines (*Panstrongylus megistus*) from the surrounding forest. Regarding mammals, it was performed serological survey, fresh blood examination, culture (LIT-NNN) and molecular analysis (Nested-PCR 18S rDNA), this latter carried out from positive blood cultures and whole blood. Triatomines were examined by culture of the digestive tract (LIT-NNN) and molecular analysis was carried out from positive cultures and frozen digestive tract. Positive products of the molecular assays were sequenced and the similarity with reference sequences (GenBank®) was observed, followed by phylogenetic analysis. Among captive mammals, 41.5% (44/106) were positive: 3% (3/104) in fresh blood examinations (*Leontopithecus chrysomelas*); 4.7% (5/105) in blood cultures; 31.8% (29/91) in serological surveys; and 32% (34/106) in blood molecular diagnoses. Seven parasites belonging to *Trypanosoma* genus were identified in captive mammals: *T. rangeli* (n=1), *T. minasense* (n=1), *T. dionisii* (n=1), *T. janseni* (n=1), *T. terrestris*-like (n=4), *T. cruzi* DTU TcI (n=23) and *T. cruzi marinkellei* (n=1). Two coinfections were described in *L. chrysomelas* (*T. cruzi* DTU TcI / *T. dionisii* and *T. cruzi* DTU TcI / *T. cruzi marinkellei*). From the captive mammals infected by *T. cruzi*, 64% (16/25) of them represent autochthonous cases. Among the free-living mammals, 53.2% (33/62) were positive: 26.6% (16/60) in fresh blood examinations; 33.8% (21/62) in blood cultures; 38% (22/58) in serological surveys, all *Didelphis aurita*; and also 40% (24/60) positive in molecular analysis of blood samples (*D. aurita*, *Sphiggurus villosus* and *Alouatta clamitans*). Two species of *Trypanosoma* were identified in free-living mammals: *T. minasense* in *A. clamitans* and two *T. cruzi* genotypes, DTU TcI in *D. aurita* (n = 16) and *S. villosus* and DTU TcII in *D. aurita* (n = 2), besides a TcI / TcII mixed infection. From the collected *P. megistus*, 90.9% (10/11) were infected by *T. cruzi* DTU TcI and two presented coinfection with *T. cruzi marinkellei*. Captive mammals are immersed in the enzootic cycle of different *Trypanosoma* species at FPZSP. These parasites are geographically dispersed and comprise the local biodiversity. The

transmission of *T. cruzi* at FPZSP derive from the proximity to the forest, where *P. megistus* and *D. aurita* come from, as well as the maintenance of the parasite in reservoirs of at least two captive species (*D. aurita* and *S. villosus*). The captive animal's movement, by interchanges or reintroductions, may result in the exchange of parasites. It is essential to follow up the health status of the infected animals and comprehend their infection patterns in order to improve the quality of life of the animals and prevent the transmission of parasites.

Keywords: trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi*, captive mammals.

ÍNDICE

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Saúde Única e a Importância da Diversidade Biológica	1
1.2 Componentes da Diversidade Biológica I: Parasitos	3
1.2.1 <i>Trypanosoma</i> spp.	5
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> : biologia, transmissão e alterações orgânicas	6
1.2.3 Diagnóstico da Infecção por <i>T. cruzi</i> e <i>Trypanosoma</i> spp.	9
1.3 Componentes da Diversidade Biológica II: Insetos	12
1.3.1 Triatomíneos e a Transmissão de <i>T. cruzi</i>	13
1.4 Componentes da Diversidade Biológica III: Animais de Cativeiro	14
1.5 Mata Atlântica e a Manutenção da Biodiversidade	19
1.5.1 Parque Estadual das Fontes do Ipiranga.....	20
1.5.2 Fundação Parque Zoológico de São Paulo	21
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Área de Estudo	25
4.2 Mamíferos <i>ex situ</i>	27
4.2.1 Contenção dos Mamíferos Cativos.....	31
4.3 Mamíferos <i>in situ</i>	31
4.3.1 Contenção e Biomarcção de Pequenos Mamíferos de Vida Livre.....	33
4.4 Coleta de Triatomíneos	34
4.5 Exame Físico e Coleta de Amostras	34
4.5.1 Mamíferos <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	34

4.5.2	Triatomíneos.....	36
4.6	Processamento e Análise das Amostras	36
4.6.1	Diagnóstico Parasitológico.....	37
4.6.2	Diagnóstico Sorológico	40
4.7	Análise dos Resultados de Infecção por Tripanosomos	41
4.8	Licenças e Aspectos Éticos	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Mamíferos <i>ex situ</i>	43
5.1.1	Diagnóstico Parasitológico.....	43
5.1.2	Diagnóstico Sorológico	49
5.1.3	Diagnósticos Parasitológico e Sorológico	50
5.2	Mamíferos <i>in situ</i>.....	56
5.2.1	Diagnóstico Parasitológico.....	56
5.2.2	Diagnóstico Sorológico	58
5.2.3	Diagnósticos Parasitológico e Sorológico	59
5.3	Triatomíneos.....	60
5.3.1	Diagnóstico Parasitológico.....	60
5.4	Mamíferos <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> e Triatomíneos	62
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Infecção por <i>T. cruzi</i> em vertebrados e insetos.....	65
6.1.1	Transmissão de <i>T. cruzi</i> na FPZSP	67
6.1.2	Reservatórios de <i>T. cruzi</i> na FPZSP	72
6.1.3	<i>Trypanosoma cruzi</i> e as Ordens de Mamíferos Infectados na FPZSP	74
6.2	Infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em vertebrados e insetos	76
6.2.1	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	77
6.2.2	<i>Trypanosoma dionisii</i>	79
6.2.3	<i>Trypanosoma rangeli</i>	80
6.2.4	<i>Trypanosoma minasense</i>	81
6.2.5	<i>Trypanosoma janseni</i>	81
6.2.6	<i>Trypanosoma terrestris-like</i>	82
6.3	Métodos de Diagnóstico e Infecções Mistas.....	83
6.4	Parasitismo, Zoológicos e Programas de Conservação.....	88
6.4.1	Medidas Preventivas de Transmissão de <i>T. cruzi</i>	92

6.5	Considerações Finais	94
7	CONCLUSÕES	96
8	ANEXOS	97
8.1	Anexo I	97
8.2	Anexo II	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	APÊNDICE A	116
	APÊNDICE B	118
	APÊNDICE C	121
	APÊNDICE D	127

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (no interior do círculo vermelho): o maior fragmento de Mata Atlântica inserido na área urbana de São Paulo (SP). *Fonte: Google Earth e Prefeitura de São Paulo* (adaptado). 25
- Figura 2. A.** Localização do Zoológico (área em branco) e do Zoo Safari (área em amarelo), na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (área em vermelho), dentro do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Os pontos azuis indicam a localização das nascentes no interior do PEFI. *Fonte: Google Earth. B.* Imagem aproximada mostrando, nas áreas em azul, os lagos existentes no interior do Zoológico. *Fonte: Google Earth (adaptado do Plano de Manejo do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – SMA, 2007).* São Paulo (SP). 26
- Figura 3.** Localização dos recintos do Setor Extra (extra, micário e planície), da Divisão de Veterinária (DV), do Setor Vida de Bicho e dos recintos (recintos e ilhas) de exposição dos mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo avaliados quanto à infecção por *Trypanosoma* spp. Apenas um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) avaliado habitava um recinto de exposição (sinalizado no mapa) no momento da coleta de amostras biológicas; os demais indivíduos da espécie habitavam o Setor Extra (micário). *Fonte: Google Earth.* 30
- Figura 4.** Localização dos transectos lineares (linhas amarelas) para captura de pequenos mamíferos de vida livre dentro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (São Paulo – SP). *Fonte: Google Earth.* 32
- Figura 5.** Fluxograma dos métodos de diagnóstico empregados a partir das diferentes amostras biológicas analisadas (sangue de mamíferos e tubo digestivo de triatomíneos). Pos.: Resultado positivo. 36
- Figura 6.** Eletroferograma gerado pelo *software* SeqMan a partir das sequências de DNA de parasitos presentes na infecção de um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (LBT 9120 – primeira coleta), antes de ser editado, sugerindo presença de infecção mista (picos duplos). 46
- Figura 7.** Histograma ilustrando o percentual de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos (Positivo) ou não (Negativo), frente aos diagnósticos parasitológicos: Exame a Fresco (de sangue e de papa leucocitária), Hemocultivo (seguido de caracterização molecular) e diagnóstico molecular a partir de Sangue com Guanidina-EDTA. 47
- Figura 8.** Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA de parasitos do gênero *Trypanosoma*, pertencentes ao clado *T. cruzi*, oriundos de sete mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 21 sequências nucleotídicas na análise, sendo 12 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo 2 parâmetros de Kimura) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. 48
- Figura 9.** Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA de parasitos da espécie *T. janseni*, pertencentes ao clado *T. cruzi*, oriundos de um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) cativo, da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 13 sequências nucleotídicas na análise, sendo 12 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo 2 parâmetros de Kimura) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. 48
- Figura 10.** Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA de parasitos identificados como *T. terrestris*-like, pertencentes ao clado *T. terrestris*, oriundos de quatro felinos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 17 sequências nucleotídicas na análise, sendo 13 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo Kimura 2 parâmetros) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. 49
- Figura 11.** Representação percentual da quantidade de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos, frente aos diagnósticos parasitológicos (EF: exame a fresco; HC: hemocultivo; SG G-EDTA: a partir de sangue com guanidina-EDTA) e por *Trypanosoma cruzi* frente à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), divididos em grupos de acordo com o táxon adotado para a realização da RIFI. A barra *TOTAL* representa todos os

indivíduos infectados por algum tripanosomatídeo, frente a todos os métodos de diagnóstico realizados.

..... 52

Figura 12. Rede quantitativa de interações entre mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos e os parasitos envolvidos em cada infecção. As barras à esquerda representam as espécies de mamíferos infectados e à direita as espécies de parasitos (ordenadas por ordem alfabética das espécies, seguida pelo gênero *Trypanosoma* e pela família dos tripanosomatídeos). O comprimento das barras ilustra a frequência de interação de cada mamífero e/ou de cada parasito. As ligações representam as interações encontradas e a espessura é proporcional à sua frequência. 54

Figura 13. Amostras LBT 9610, 9614, 9615 e 9618 (produtos amplificados de DNA extraído de sangue total com guanidina-EDTA de espécimes de *Didelphis aurita*) como exemplo de bandas em gel de agarose a 2%, próximas da altura de interesse (600 pb), sugerindo quantidade suficiente de DNA para ser purificada e sequenciada, sendo única (9610) ou havendo também bandas inespecíficas (9614, 9615 e 9618). 57

Figura 14. Histograma ilustrando o percentual de mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos, frente aos diagnósticos parasitológicos (EF: exame a fresco; HC: hemocultivo, seguido de caracterização molecular para os cultivos estabelecidos; SG G-EDTA: diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA), e por *Trypanosoma cruzi*, frente à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A barra *TOTAL* representa todos os indivíduos infectados por algum tripanosomatídeo, frente a todos os métodos de diagnóstico realizados. 59

Figura 15. A. Amostras LBT 9916, 9984 e 10167 (produtos amplificados de DNA extraído de tubo digestivo de triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus*) como exemplo de bandas em gel de agarose a 2%, próximas da altura de interesse (600 pb), com pouca quantidade de DNA para ser purificada e sequenciada, mesmo sendo bandas únicas. Os parasitos das três amostras foram classificados como *Trypanosoma* sp. 61

Figura 16. Representação da localização geográfica dos animais (vertebrados e invertebrados) infectados por tripanosomatídeos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Estão representados no mapa: os mamíferos cativos, os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) de vida livre e os triatomíneos (*Panstrongylus megistus*), de acordo com o local em que estavam no momento em que foram examinados. O mapa mostra a proximidade dos animais em relação aos transectos lineares (A a E) utilizados para captura dos pequenos mamíferos de vida livre. *Fonte: Google Earth*. 63

Figura 17. Representação da localização geográfica dos animais (vertebrados e invertebrados) infectados por tripanosomatídeos e dos mamíferos cativos não infectados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Estão representados no mapa: os mamíferos cativos, os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) de vida livre e os triatomíneos (*Panstrongylus megistus*), de acordo com o local em que estavam no momento em que foram examinados. O mapa mostra a proximidade dos animais em relação aos transectos lineares (A a E) utilizados para captura dos pequenos mamíferos de vida livre. *Fonte: Google Earth*. 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mamíferos cativos avaliados frente a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil e presença de triatomíneos (<i>Panstrongylus megistus</i>) no ambiente de cativeiro destes mamíferos (revisão de literatura).	17
Quadro 2. Grupos de risco de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo para as duas coletas sistemáticas de amostras previstas, visando o diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. (Grupos I a IV).	28
Quadro 3. Mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo manejados para coletas oportunistas de amostras, visando o diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. (Grupo V).	29
Quadro 4. Disposição dos transectos lineares para captura de pequenos mamíferos de vida livre, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, com relação aos grupos de mamíferos cativos da instituição selecionados para a coleta sistemática de amostras, visando o diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.	32
Quadro 5. Mamíferos silvestres de vida livre manejados para coleta oportunista de amostras, visando diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.	33
Quadro 6. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos dos exames parasitológicos a fresco e dos hemocultivos para diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	44
Quadro 7. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos no diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA para detectar a infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. .	45
Quadro 8. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos da reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	50
Quadro 9. Relação entre os resultados das análises parasitológicas e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregados para o diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. e <i>T. cruzi</i> , respectivamente, em todos os mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo que foram examinados.	51
Quadro 10. Matriz quantitativa de interação entre as espécies de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados (hospedeiros) e as espécies de tripanosomatídeos envolvidas na referida infecção (parasitos).	53
Quadro 11. Espécies de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> , de acordo com os grupos de risco (I a V), a partir de diagnósticos parasitológicos e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).	55
Quadro 12. Ordens e famílias de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo examinados e infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> , a partir de diagnósticos parasitológicos e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).	55
Quadro 13. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos dos exames parasitológicos a fresco e dos hemocultivos para diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	56
Quadro 14. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos no diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA para detectar a infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	57
Quadro 15. Relação entre os resultados dos diagnósticos parasitológicos (exame a fresco, hemocultivo e diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA) observados para os mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	58
Quadro 16. Relação entre os resultados das análises parasitológicas e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregados para o diagnóstico de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. e <i>T. cruzi</i> , respectivamente, em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.	58
Quadro 17. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados dos exames parasitológicos diretos, dos cultivos de conteúdo intestinal e de diagnóstico molecular a partir de tubo	

digestivo congelado para diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp.em triatomíneos da mata do entorno da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. 61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BIC	Crítério Bayesiano de Informação
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/Fiocruz
CAD	Número de Cadastro (sigla utilizada para identificar os animais da FPZSP)
CECFAU	Centro de Conservação de Fauna Silvestre do Estado de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COLTRYP	Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPA	Departamento de Pesquisas Aplicadas
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
DTU	<i>Discrete Type Unit</i>
DV	Divisão de Veterinária
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FC	Frequência Cardíaca
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
FR	Frequência Respiratória
ha	hectare
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IgG	Imunoglobulina G
ISIS	<i>International Species Information System</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of the Nature</i>
LABTRIP	Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
LBT	Número LBT ou Número LABTRIP (sigla utilizada para identificar as amostras de cada espécime no LABTRIP)
LSU	<i>Large Subunit</i>

LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NAIS	Núcleo de Atividades <i>In Situ</i>
NBR	Norma Brasileira
NNN	ágar sangue Novy, McNeal e Nicolle
pb	Pares de bases
PBS	Fosfato-salino tamponado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEFI	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
PIT	Posto de Informação de Triatomíneo
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico codificador de Ácido Ribonucleico ribossômico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SSC	<i>The Species Survival Comission</i>
SSU	<i>Small Subunit</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
UC	Unidade de Conservação

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saúde Única e a Importância da Diversidade Biológica

Desde o século VI, filósofos gregos e pesquisadores percebem a Terra como um organismo vivo e único, sendo esta consideração reforçada por James Lovelock e Lynn Margulis, a partir da Hipótese de Gaia, originalmente proposta em 1969. Esta hipótese tem como conceitos chave a Terra como um ecossistema único, onde os indivíduos de diferentes espécies atuam como órgãos de um corpo, e os seres humanos não desempenham nenhuma função especial que seja diferente dos demais seres vivos. A ecologia profunda, por sua vez, rejeita a visão antropocêntrica e valoriza igualmente todos os seres vivos, plantas e animais, inclusive bactérias, pelo valor intrínseco de cada ser (Nations, 1997). Já no século XX, Kock (1996) foi pioneiro ao sinalizar a importância da medicina veterinária e dos cuidados com os animais selvagens para a manutenção da biodiversidade. Ao analisar no continente africano como os animais selvagens eram preteridos em relação aos animais de produção, o autor levanta questões sobre como “Diretores de Serviços Veterinários ativamente desencorajam o envolvimento dos veterinários com os animais selvagens”. Por fim, o autor faz um apelo para que os veterinários se unam a outros profissionais, em especial biólogos conservacionistas, com a finalidade de “preservar a diversidade biológica global”. A partir de considerações como essas, e tendo o trabalho de Kock como principal alicerce, surgiu a Medicina da Conservação, ciência cujo objetivo é manter a biodiversidade e, conseqüentemente, a saúde e a qualidade de vida dos animais selvagens e domésticos, dos seres humanos e dos ecossistemas (Mangini e Silva, 2007; Lange et al., 2013). Paralelamente ao surgimento dessa ciência, estudos demonstraram a relação do intercâmbio de parasitos entre animais e seres humanos com a emergência de doenças infecciosas. Entre 1940 e 2004 foi descrita a emergência de 335 doenças infecciosas acometendo seres humanos, sendo que 60,3% eram zoonoses, das quais 71,8% dos parasitos envolvidos eram oriundos de animais selvagens (Jones et al., 2008). O aumento das doenças infecciosas em seres humanos está ligado a diversos fatores, dentre os quais estão as pressões antrópicas, como: desmatamento, alteração do uso do solo (como agricultura), globalização (viagens por todo mundo), crescimento populacional excessivo, sistema falho de saúde pública e comércio ilegal de animais selvagens. Percebeu-se que a abordagem

tradicional quanto ao manejo de doenças, que segregava seres humanos em um grupo, animais domésticos em outro e animais selvagens em um terceiro grupo não era eficiente, provocando sofrimento, mortes e prejuízo financeiro (Cook e Karesh, 2008). Após o reconhecimento das relações estreitas entre a saúde de todos os seres vivos e do meio ambiente, fixou-se o conceito de Saúde Única (*One Health*), com enfoque na saúde do planeta como organismo único (Deem, 2016). O conceito de Saúde Única tem como base o equilíbrio entre seres humanos, animais, plantas, outros organismos vivos e o ambiente como um todo. A Saúde Única e o bem-estar devem ser o foco de decisões socioeconômicas, ambientais e geopolíticas em todas as esferas, desde local até global (Lueddeke et al., 2017).

Uma ação humana com importante impacto para a Saúde Única é a exploração dos recursos naturais, seja literal ou através da ocupação de espaço. O crescimento acelerado das populações humanas vem desgastando o ambiente rapidamente, em especial nos trópicos, onde a perda de *habitat* ocorre de forma mais acentuada (Wilson, 1997), como consequência do avanço da urbanização sobre áreas originalmente de mata nativa (Tavares et al., 2014). A perda de *habitat*, e sua consequente fragmentação, é uma das principais causas da perda de diversidade biológica, com espécies sendo levadas à extinção. Apesar de a extinção ser um fenômeno natural, a velocidade com que a perda da biodiversidade vem ocorrendo gera um desequilíbrio ambiental global de difícil reorganização (Andriolo, 2007). No Brasil há 874 vertebrados cujos *status* de conservação indicam algum grau de ameaça, sendo: 409 peixes, 234 aves, 110 mamíferos, 80 répteis e 41 anfíbios (MMA, 2014). Na prática, no entanto, o impacto pode ser maior do que o mensurável. Isto porque algumas espécies podem não estar classificadas como ameaçadas de extinção, de acordo com as listas oficiais, mas já podem estar ecologicamente extintas em virtude do tamanho reduzido da população *in situ* (no ambiente natural): o tamanho é tão pequeno que a espécie já não exerce sua função ecológica no ambiente (Andriolo, 2007).

Outro fator a ser considerado quando há fragmentação do *habitat* é o possível aumento da frequência nas interações ecológicas entre os animais, como o parasitismo, que pode ser mais frequente devido ao adensamento populacional e/ou à redução do espaço (Primack e Rodrigues, 2007). A fragmentação também apresenta como consequência a alteração na composição de espécies daquele ambiente. Nestes casos, geralmente se observa uma maior abundância relativa das espécies generalistas sobre as não-generalistas, tanto em virtude da adaptação aos

recursos alimentares e hídricos remanescentes (Devictor et al., 2008), quanto a adaptação a alteração do *habitat* em si e aos consequentes efeitos de borda¹ (Primack e Rodrigues, 2007). Fatores relacionados aos organismos, como densidade populacional e tamanho corporal, ou às características do fragmento, como área total e matriz vegetal, podem influenciar a permanência de espécies nestes ambientes. Em fragmentos com menos de 15 ha, por exemplo, a tolerância à nova matriz vegetal formada é o principal fator para que uma espécie não seja localmente extinta (Carlos e Fernandez, 2004). Quanto menor é o fragmento, mais evidentes são os efeitos de borda, alterando de forma mais rápida a composição local das espécies (Primack e Rodrigues, 2007).

1.2 Componentes da Diversidade Biológica I: Parasitos

Estima-se que 30% dos organismos eucariontes correspondam a diferentes espécies de parasitos (Poulin e Morand, 2004). O parasitismo é uma importante forma de partilha de energia, espaço e alimento e de controle populacional (Brito e Favaretto, 1997; Bush et al., 2001a), especialmente quando o ecossistema é estável e diverso o suficiente para admitir adaptações recíprocas entre hospedeiros e parasitos (Odum, 1988). Os parasitos podem influenciar na adaptação e na evolução de seus hospedeiros, devido aos efeitos que podem ter sobre o comportamento, a reprodução, a regulação do sistema imune e até mesmo a evolução de genes relacionados à imunidade dos hospedeiros (Paterson e Piertney, 2011). A perda de parasitos espécie-específicos, por exemplo, pode afetar a trajetória evolutiva do hospedeiro. Recentemente estudos começaram a reconhecer os benefícios da conservação dos parasitos, que pode ser crucial para a integridade dos ecossistemas, uma vez que eles podem influenciar a saúde e a dinâmica das populações (Morand, 2015; Northover et al., 2018). Assim, é importante considerar para a conservação da biodiversidade que alguns parasitos podem estar mais ameaçados do que seus hospedeiros (Pizzi, 2008). Tendo isso em vista, *The Species Survival Commission* (SSC) da *Internacional Union for Conservation of the Nature* (IUCN) recomenda considerar os parasitos nos programas de conservação (IUCN-SSC, 2013).

¹ O microambiente das bordas de um fragmento apresenta características distintas de seu interior, como aumento dos níveis de luz e vento, além de mudanças na temperatura e na umidade. Estes efeitos de borda são mais comuns a uma distância de até 35 m da mesma, podendo atingir até 500 m.

A compreensão da ecologia dos parasitos é fundamental, especialmente quando o ciclo de vida do parasito abrange diretamente diferentes elementos da Saúde Única: os ecossistemas, os seres humanos e os outros animais (Mangini e Silva, 2007). Neste cenário, é importante ressaltar que os próprios hospedeiros, individualmente, também são considerados um ecossistema único, uma vez que representam o *habitat* de diferentes comunidades de diversos parasitos (Bush et al., 2001a). Apesar de infecções mistas ainda serem subestimadas, dificilmente um ser vivo está parasitado por uma única espécie: as infecções concomitantes são maioria na natureza (Morand, 2015). Além disso, fatores como a dinâmica das populações (de parasitos e hospedeiros), o comportamento e a resposta imune dos hospedeiros, tornam um desafio criar modelos realistas e úteis para compreensão da ecologia dos parasitos. Modelos para parasitos multi-hospedeiros e/ou que envolvam vetores em sua transmissão, são ainda mais complexos (Seabloom et al., 2015). *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, apresenta as duas características.

A ideia de que a diversidade de hospedeiros, geralmente observada em um ambiente preservado, diminua a transmissão local de determinados parasitos surgiu há pouco mais de 50 anos e vem sendo cada vez mais estudada, embora ainda não estejam claros os mecanismos subjacentes (Johnson et al., 2013, 2015). Diversos autores concordam que a frequência com que este efeito ocorre e os parasitos suscetíveis a ele dependem do contexto espacial e temporal em que estão inseridos. Isto porque fatores como mudanças climáticas e disponibilidade de recursos interferem tanto na composição e na diversidade de parasitos quanto na de hospedeiros (Johnson et al., 2015). Ao mesmo tempo que a maior diversidade de hospedeiros parece estar relacionada com a diminuição da transmissão de determinados parasitos (Johnson et al., 2013, 2015; Kamiya et al., 2014), parece haver também uma correlação positiva com a riqueza de parasitos (Lafferty, 2012). Esta observação tem como base a hipótese da heterogeneidade do *habitat*, que presume que uma maior diversidade de hospedeiros, seguida de sua abundância, tolera um maior número e/ou tipo de infecção (Hechinger e Lafferty, 2005; Kamiya et al., 2014; Johnson et al., 2015, 2016). Desta forma, quando há uma queda na diversidade de hospedeiros, ocorre uma diminuição na riqueza dos parasitos, especialmente os especialistas ou aqueles que dependem de diversos hospedeiros para completar seus ciclos. (Lafferty, 2012). Ocorre um incremento na riqueza de parasitos conforme a unidade biológica estudada passa de um hospedeiro individual para um grupo, uma população e uma comunidade. Além disso, a abundância de

hospedeiros, que representa disponibilidade de recursos e oportunidade de colonização para os parasitos, contribui tanto para o aumento da diversidade de parasitos quanto dos próprios hospedeiros (Johnson et al., 2016).

Os parasitos são muito diferentes entre si, exibindo graus variados de "especialização", sendo esperado que infectem hospedeiros de diferentes espécies. No entanto, muitos parasitos podem compartilhar as mesmas guildas e/ou os mesmos nichos, estabelecendo ou não interações ecológicas entre si, como competição e simbiose. Estas interações podem ocorrer de forma concomitante, exibindo inúmeras combinações entre si, se considerarmos as diferentes espécies de parasitos envolvidas e os diferentes tamanhos de cada uma de suas populações (Bush et al., 2001b). Compreender como estas relações ocorrem pode ajudar a esclarecer diversas lacunas do conhecimento sobre estes organismos. Uma destas lacunas é a forma como eles influenciam a dinâmica dos ecossistemas (Preston et al., 2016). O fato de os ecólogos não considerarem os ecossistemas dos endoparasitos (composto pelo interior de seu hospedeiro) rotineiramente em seus estudos colabora para a existência destas lacunas. (Wood e Johnson, 2015).

Apesar da importância destes organismos para a manutenção da biodiversidade e da Saúde Única, alguns parasitos podem causar alterações orgânicas em seus hospedeiros, podendo comprometer ou não a saúde dos mesmos (Northover et al., 2018), e gerando um estigma perante todos os parasitos quando acontece. O fato de serem habitualmente chamados de patógeno ou agentes patogênicos, ainda nos dias atuais, reflete o desconhecimento da importância dada aos parasitos frente à preservação da biodiversidade.

1.2.1 *Trypanosoma spp.*

A classe Kinetoplastea é composta por protozoários que apresentam o DNA mitocondrial compactado e formado por maxi e minicírculos concatenados. Este DNA mitocondrial é conhecido como cinetoplasto (kDNA). Os parasitos do gênero *Trypanosoma* estão incluídos nesta classe, na subclasse Metakinetoplastea, superordem Kinetoplastida e ordem Trypanosomatida, que apresenta uma única família: Trypanosomatidae (Moreira et al., 2004; Stevens et al., 2008). A família Trypanosomatidae, amplamente distribuída pelo globo, é composta por parasitos obrigatórios, que podem ou não ser patogênicos a seus hospedeiros, sejam eles animais ou plantas (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006). A taxonomia tradicional, baseada nos hospedeiros (vertebrados, invertebrados e plantas), no ciclo

de vida (mono ou heteroxênico) e na morfologia (forma, tamanho, posição do cinetoplasto, etc) contribuiu para a distribuição dos tripanosomatídeos em 22 gêneros diferentes. Destes, 17 são monoxênicos (ciclo de vida desenvolvido em um único hospedeiro) e 5 heteroxênicos (ciclo de vida dependente de mais de um hospedeiro) (d'Avila Levy et al., 2015; Kaufer et al., 2017), dentre os quais está o gênero *Trypanosoma*, cuja origem é monofilética (Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Stevens, 2008; Espinosa et al., 2016).

Este gênero foi dividido em duas seções (Hoare, 1972): Salivaria (parasitos inoculados pelos vetores), formada pelos subgêneros *Duttonella*, *Trypanozoon*, *Pycnomonas* e *Nannomonas*; e Stercoraria (parasitos eliminados junto das fezes dos vetores), formada pelos subgêneros *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schyzotrypanum*. Existe ainda um subgênero, *Tejera*, criado para abarcar *T. rangeli* (Añez, 1982), uma vez que este parasito apresenta características de ambas seções (Grisard, 2002).

O surgimento das ferramentas de biologia molecular, bem como o uso de marcadores moleculares, possibilitou identificar novas espécies do gênero *Trypanosoma*, nos últimos anos, que permanecem sendo descritas até hoje. Até o momento existem cerca de 10 clados contemplando o gênero *Trypanosoma* (Hamilton e Stevens, 2010). *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, faz parte do clado *T. cruzi*.

Destes parasitos, aqueles com impacto para a saúde dos seres humanos e/ou para a economia voltada ao agronegócio possuem o ciclo mais bem conhecido, a saber: *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. evansi* e *T. vivax*. Ainda assim, há lacunas de conhecimento sobre a ecologia destes parasitos, principalmente quanto aos padrões de infecção e resposta dos hospedeiros quando existem infecções mistas. Isso porque é possível que compartilhem hospedeiros, vetores e nichos ecológicos de forma concomitante e nas mais variadas combinações.

1.2.2 *Trypanosoma cruzi*: biologia, transmissão e alterações orgânicas

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae (Moreira et al., 2004; Stevens et al., 2008). O parasito apresenta grande heterogeneidade intra-específica, apesar de a estrutura da população ser clonal, estando a espécie dividida em 7 diferentes subpopulações ou genótipos, conhecidos como *Discrete Type Unit* (DTU), a saber: TcI a TcVI e TcBat (Xavier et al., 2012; Jansen et al., 2015, 2018). Até o presente momento, não é possível relacionar categoricamente as DTUs de *T. cruzi* com sintomas e/ou sinais clínicos, espécies de

hospedeiros (reservatórios ou não) e vetores, ou mesmo biomas específicos (Jansen et al., 2018).

Este é um parasito antigo de mamíferos selvagens, cuja origem parece ter ocorrido há 100 milhões de anos (Stevens et al., 1999; Hamilton e Stevens, 2010; Hamilton et al., 2012). Aves e répteis são refratários à infecção, eliminando os organismos em questão de horas (Jansen et al., 2015), a partir da ação de lise e morte do parasito, mediadas pelo sistema complemento e pelos macrófagos. Seu ciclo de transmissão é primariamente enzoótico, sem que haja qualquer dependência da presença do ser humano para sua ocorrência (Lisboa et al., 2006; Jansen et al., 2018). Do ponto de vista ecológico, seres humanos são apenas mais uma espécie de hospedeiro no ciclo de transmissão de *T. cruzi*, como qualquer outro mamífero. *Trypanosoma cruzi* pode ser considerado um parasito generalista quanto ao seu *habitat* (sul dos Estados Unidos da América e toda América Latina), aos seus hospedeiros (centenas de espécies de mamíferos), e também quanto aos órgãos, tecidos e células que pode infectar. Nas Américas, há diversos grupos de mamíferos silvestres diagnosticados com a infecção por *T. cruzi*, como marsupiais, primatas, morcegos, roedores, carnívoros e suídeos (Kocan, 2001; Marvulo, 2007; Noireau et al., 2009; Herrera, 2010). Animais das ordens Cingulata e Pilosa também parecem estar envolvidos no ciclo de transmissão de *T. cruzi* (Jansen et al., 2018). Cada um destes mamíferos se apresenta de forma única como fonte de infecção, por possuírem características biológicas e comportamentais próprias, como o uso de diferentes estratos florestais e suas diferentes posições na cadeia alimentar. Estes atributos interferem quali- e quantitativamente sobre as interações ecológicas que os organismos podem apresentar entre si, de forma que diferentes mamíferos podem sustentar ciclos distintos de transmissão, estando estes conectados ou isolados (PAHO, 2009). Assim, pode-se considerar que o reservatório é um sistema ecológico, com diversos mamíferos responsáveis pela manutenção do ciclo do parasito na natureza, e o papel de cada animal deve ser considerado em uma escala única de tempo e espaço (Roque e Jansen, 2014).

O parasito possui ciclo de vida heteroxênico, cujos vetores são invertebrados hematófagos da subfamília Triatominae e os hospedeiros vertebrados são sempre mamíferos, incluindo seres humanos (Noireau et al., 2009; Herrera, 2010; Jansen et al., 2015). A partir da hematofagia, os vetores adquirem as formas tripomastigotas sanguícolas do parasito, que na porção média do tubo digestivo diferenciam-se em formas epimastigotas (replicativas), e no reto, em formas tripomastigostas

metacíclicas infectantes, eliminadas nas fezes do vetor. Estas formas infectantes, após adentrarem o organismo do hospedeiro pela ferida deixada na pele no momento do repasto sanguíneo, ganham a circulação sanguínea e, posteriormente, o interior das células do hospedeiro, onde diferenciam-se em amastigotas (replicativas), que posteriormente vão se diferenciar em tripomastigotas sanguícolas. Estes podem permanecer no sangue ou invadir células de vários outros tecidos, como o músculo cardíaco (Oliveira, 2005; Martins et al., 2012). Apesar de a forma de infecção considerada como clássica ser a via vetorial contaminativa, Nouvellet e colaboradores (2013) demonstraram por modelagem matemática que para um ser humano se infectar pela via vetorial contaminativa de transmissão são necessários de 900 a 4000 contatos com o inseto. Para os animais a transmissão por via oral, através da ingestão de insetos ou outros mamíferos infectados é bastante comum, sendo talvez mais eficaz e importante nos ambientes naturais (Roque et al., 2008; Kribs-Zaleta, 2010; Rocha et al., 2013). A transmissão oral também é importante para os seres humanos (Pereira et al., 2009), correspondendo a 73% dos casos de infecção por *T. cruzi* entre os anos de 2012 e 2016 (MS, 2019). Dados de infecção experimental indicam que para algumas subpopulações do parasito, o contato com o ácido gástrico altera as glicoproteínas da membrana, facilitando a invasão do parasito (Covarrubias et al., 2007; Yoshida, 2008). Fatores como a degradação ambiental, especialmente quando há invasão do homem na natureza, a precariedade de habitações, o baixo grau de escolaridade e a falta de conhecimentos sobre higiene dos alimentos, são fatores que aproximam o ser humano dos ciclos enzoóticos, facilitando a transmissão para esta espécie de hospedeiro. Ademais, este hospedeiro também pode se infectar por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Dias e Coura, 1997; PAHO, 2009). Com o avanço da medicina veterinária, é possível que outros mamíferos se infectem a partir das transfusões sanguíneas, prática cada vez mais comum na clínica de animais domésticos (Davidow, 2013). Para todos os hospedeiros, essas vias de transmissão podem ser evitadas a partir de exames dos doadores (Moncayo e Silveira, 2010; Davidow 2013). Os seres humanos contam ainda com outras vias de transmissão: congênita e acidental em atividades laborais (Dias e Coura, 1997; PAHO, 2009; Hontebeyrie et al., 2010)

Ao infectar as células do hospedeiro, *T. cruzi* costuma provocar alterações orgânicas, que podem, dependendo de sua gravidade e/ou intensidade, causar prejuízo à saúde deste hospedeiro. Neste caso, o conjunto de alterações é conhecido por tripanosomíase americana ou doença de Chagas, quando os hospedeiros são

seres humanos. A gravidade dessas alterações e o possível dano à saúde depende, dentre outros fatores, da via de transmissão e da resposta imune do hospedeiro (Pereira et al., 2009). Em seres humanos, infecções pela via oral parecem provocar maior morbidade e mortalidade do que pela via vetorial contaminativa (PAHO, 2009), provocando alterações graves, como cardiopatia aguda, hepato e esplenomegalia, dispneia e meningoencefalite (Dias e Coura, 1997; Hontebeyrie et al., 2010; Rassi et al., 2010). Alguns dos sinais clínicos agudos inespecíficos observados em seres humanos (apatia, perda de apetite, febre e anemia) já foram descritos em primatas não-humanos e cães (*Canis familiaris*) (Cardoso-Brener, 1980; Barbabosa-Pliego et al., 2009; Guedes et al., 2012). Nestes hospedeiros também é comum haver alterações cardíacas em eletro e ecocardiogramas e a presença de miocardite, que pode levá-los a óbito (Bonecini-Almeida et al., 1990; Jaime-Andrade et al., 1997; Andrade et al., 2009; Mubiru et al., 2014). É possível que as alterações orgânicas iniciais provocadas por *T. cruzi* não provoquem sinais clínicos agudos. Ademais, mesmo quando estes sinais estão presentes, a infecção por *T. cruzi* pode não ser diagnosticada em virtude da ausência de sinais mais específicos, como o sinal de Romaña (edema palpebral) (Dias e Coura, 1997). O parasito pode ser eliminado na fase inicial da infecção pelo sistema imune do hospedeiro ou pela administração de fármacos. Quando isso não ocorre, o hospedeiro poderá desenvolver alterações crônicas, como: arritmias, cardiomegalia, alterações de condução elétrica no miocárdio, megaesôfago, disfagia, megacólon e alterações na motilidade gastrointestinal (Dias e Coura, 1997; Hontebeyrie et al., 2010; Rassi et al., 2010). Apesar de a infecção no ciclo silvestre parecer "benigna", por não serem comumente observadas alterações orgânicas nos animais silvestres de vida livre (Dias e Coura, 1997), há descrição de alterações cardíacas, diagnosticados por eletrocardiograma, em primatas silvestres de vida livre. Apesar de as alterações encontradas não serem tão graves quanto as observadas em humanos ou em outros primatas (sob condições experimentais), acredita-se que alguns animais podem desenvolver lesões severas. Estas lesões podem influenciar a sobrevivência de maneira direta ou indireta, tornando-os mais suscetíveis à predação (Monteiro et al., 2006).

1.2.3 Diagnóstico da Infecção por *T. cruzi* e *Trypanosoma spp.*

Dentre os métodos que podem ser aplicados para diagnosticar a infecção por *T. cruzi* e/ou outros tripanosomos temos o exame à fresco de sangue e o exame à fresco de papa leucocitária, nos quais o parasito pode ser visualizado por microscopia óptica

imediatamente após a coleta de sangue. Estes exames oferecem resultado no mesmo dia, mas costumam ter baixa sensibilidade, podendo apresentar resultados falso-negativos, especialmente quando há poucos parasitos na corrente sanguínea. No entanto, quando seu resultado é positivo, admite-se que o hospedeiro apresenta potencial de infectar o vetor.

Outro método pouco sensível, mas que também pode refletir a parasitemia do hospedeiro é o hemocultivo, a partir do qual os parasitos podem multiplicar-se, facilitando a visualização pela microscopia óptica. Este método, assim como o exame a fresco, depende da presença de parasitos na corrente sanguínea para que a infecção seja diagnosticada. Outra desvantagem é que algumas populações de parasitos não são cultiváveis. Mesmo quando as populações são cultiváveis, existe a possibilidade de haver contaminação do meio de cultivo por outros organismos, como bactérias e fungos que, ao consumirem este meio de cultivo, acabam excluindo as populações de *Trypanosoma*. Ademais, pode levar de 10 dias a 5 meses para que os resultados sejam obtidos. Por outro lado, esta técnica tem como vantagem o isolamento das populações parasitárias, possibilitando a obtenção de outras informações do parasito, como a curva de crescimento e a morfologia em diferentes momentos da replicação celular, além de possibilitar a preservação dos parasitos em coleções biológicas.

Os inquéritos sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), costumam ser bastante sensíveis, não sendo necessária a presença do parasito na corrente sanguínea para que seja feito o diagnóstico da infecção. O diagnóstico é realizado a partir da detecção de anticorpos do tipo IgG, anti-*T. cruzi* no caso de diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. Uma vantagem deste diagnóstico nas infecções causadas por *T. cruzi* é que, apesar de não detectar o parasito em si, sabemos que o hospedeiro está infectado, uma vez que o parasito não é eliminado do organismo. Outras vantagens deste método são que a quantidade de amostra biológica necessária é muito pequena (10 µL) e que o resultado é obtido no mesmo dia. Por outro lado, o compartilhamento de antígenos idênticos ou semelhantes entre tripanosomatídeos, ou mesmo envolvendo outros parasitos, pode provocar reações cruzadas. Apenas o diagnóstico sorológico da infecção não reflete a importância do hospedeiro na manutenção do parasito na natureza, apesar de ser um importante indicativo da infecção daquele mamífero (Roque et al., 2008), bem como da presença do parasito no ambiente ao qual está inserido.

Uma outra ferramenta também bastante sensível, e que pode identificar as espécies envolvidas na infecção, é o diagnóstico molecular. No entanto, esta técnica depende da presença de uma quantidade mínima de DNA íntegro do parasito na alíquota de amostra biológica para que seja feito o diagnóstico. Este fator aumenta a chance de haver falsos resultados negativos, tornando esta ferramenta menos sensível do que os inquéritos sorológicos no caso de *T. cruzi*. Atualmente existem diversos marcadores moleculares que podem ser utilizados para o diagnóstico de tripanosomatídeos, sendo os mais comumente empregados o sequenciamento de fragmentos do gene codificador da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) e do gene codificador da enzima glicossômica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH).

Os genes transcritores de RNA ribossômico (rRNA) são formados por unidades de transcrição e espaçadores intergênicos, intercalados entre si, que se repetem sequencialmente por cerca de 100 vezes ao longo de toda sequência gênica. Dentre as unidades de transcrição, estão as regiões codificadoras: (i) SSU rDNA, também conhecida como gene SSU rRNA ou 18S rRNA, por codificar a subunidade menor (SSU – *Small Subunit*, denominada também de 18S) do ribossomo; (ii) LSU rDNA, por sua vez, é responsável por codificar a subunidade maior (LSU – *Large Subunit*, denominada também de 24S) do ribossomo, e encontra-se dividida em dois fragmentos (24S α e 24S β); e (iii) 5.8S rDNA. Separando as regiões codificadoras estão os espaçadores internos transcritos (ITS – *internal transcribed spacer*). A sequência gênica abarcada no gene 18S rRNA apresenta nove regiões variáveis (V1-V9), sendo a região V7-V8 conhecida como a mais variável, margeadas por regiões conservadas (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990; Borghesan, 2013; Froeschke e Heyden, 2014).

Diferente dos genes ribossômicos, o gene codificador da enzima glicossômica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, conhecida como gGAPDH, se apresenta em apenas duas cópias ao longo de toda sequência gênica. Isso significa que, na prática, é necessária maior quantidade de amostra biológica para se realizar o diagnóstico molecular em tripanosomatídeos (Michels et al., 1986; Kendall et al., 1990; Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens, 2008).

As regiões variáveis presentes no gene ribossômico 18S rRNA apresentam taxa de evolução mais rápida do que os genes glicossômicos, sendo estes mais conservados. Além disso, em virtude da menor quantidade de amostra biológica necessária e das diversas sequências de referência depositadas em banco de dados

(GenBank®), o gene 18S rRNA acaba por ser mais utilizado na identificação das espécies de tripanosomatídeos e no estudo da diversidade destas espécies. Por sua vez, o gGAPDH vem sendo mais aplicado em análises filogenéticas das novas espécies descritas, que cada vez mais estão sendo realizadas de forma conjunta ao gene 18S (Hamilton et al., 2004, 2007; Hamilton e Stevens, 2010; Borghesan, 2013).

Portanto, quando os diferentes métodos de diagnóstico são empregados em conjunto, conseguimos compreender de maneira mais completa o contexto em que estão inseridos os parasitos (Roque et al., 2008).

1.3 Componentes da Diversidade Biológica II: Insetos

O filo Arthropoda contribui para a diversidade biológica com mais de 80% das espécies do reino Animalia, contando com cerca de 1,5 milhão de espécies, das quais estima-se que mais de 1 milhão são da classe Insecta (Zhang, 2013). Além de participarem da cadeia trófica (tanto como presas quanto como predadores), tal qual outros organismos, insetos merecem destaque no que concerne o equilíbrio dos ecossistemas, por serem abundantes e por fornecerem serviços ecossistêmicos específicos, como a polinização (Brito e Favaretto, 1997). No entanto, a conservação dos insetos é afetada por impactos antrópicos como a fragmentação do *habitat*, a poluição do ambiente e as mudanças climáticas. A falta de especificidade dos chamados "defensores agrícolas", inseticidas desenvolvidos a fim de eliminar insetos herbívoros das grandes plantações, afeta outros insetos (Samwyas, 2007). Insetos denominados vetores, por participarem do ciclo de vida de parasitos, transmitindo-os entre seus hospedeiros, também são alvos de inseticidas. O controle de vetores é uma estratégia para mitigar a infecção de seres humanos, animais domésticos e de produção por parasitos que possam provocar prejuízo à saúde. Este controle pode ser considerado como um tipo de redutor de biodiversidade (Lafferty, 2012). Além de haver perda da diversidade dos insetos, mudanças climáticas como o aumento da temperatura no globo pode alterar a área de ocorrência dos vetores, tornando possível que os insetos habitem lugares aos quais não estavam anteriormente dispersos. Desta forma, o aumento da temperatura pode facilitar a sobrevivência e, conseqüentemente, a reprodução dos insetos vetores, influenciando na transmissão dos parasitos que albergam (Cook e Karesh, 2008)

1.3.1 Triatomíneos e a Transmissão de *T. cruzi*

A classe Insecta conta com mais de 30 ordens, dentre as quais está a ordem Hemiptera, que engloba mais de 100 mil espécies (Zhang, 2013). Dentre os organismos da ordem Hemiptera, da qual faz parte a família Reduviidae, estão os insetos que participam do ciclo de vida de *T. cruzi*: os triatomíneos (subfamília Triatominae) (Bargues et al., 2010). Das 148 espécies de triatomíneos conhecidas, 65 já foram registradas no Brasil, das quais 42 são endêmicas do país (Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015). Os gêneros mais importantes para a transmissão de *T. cruzi* para os hospedeiros humanos são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Dias e Coura, 1997). No Brasil, bem como no estado de São Paulo, há registros de diversas espécies destes gêneros, a saber: 32 espécies de *Triatoma* no Brasil e sete espécies no estado de São Paulo, sendo que apenas *T. sordida* ocorre em todo o estado; *Rhodnius* conta com 12 espécies no Brasil e três espécies no estado de São Paulo; e *Panstrongylus* conta com nove espécies no país e três no estado de São Paulo (Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015).

Um dos principais vetores envolvidos na infecção de seres humanos por *T. cruzi* pela via contaminativa, *Triatoma infestans*, foi praticamente erradicado do ambiente domiciliar no Brasil (PAHO, 2009). No estado de São Paulo, por exemplo, há evidências entomológicas de que a transmissão pela via contaminativa foi interrompida há mais de 30 anos (Silva et al., 2011). No entanto, há outros vetores com competência vetorial no ambiente natural. Um desses vetores é o *Panstrongylus megistus*, espécie na qual Carlos Chagas (1909) encontrou *T. cruzi* e considerada atualmente como uma das mais importantes para transmissão no Brasil (MS, 2019). Esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica no país, mostrando grande adaptabilidade a diversas condições ecológicas (Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015), colonizando tanto matas densas quanto matas residuais (Mendes et al., 2008), podendo ser encontrada até mesmo em ambientes domiciliares (MS, 2019). É também bastante encontrada em São Paulo, deste o leste da Serra da Mantiqueira até a porção de Mata Atlântica do sul do estado (Wanderley et al., 2007). Uma ferramenta importante no que concerne a prevenção da infecção em seres humanos por *T. cruzi*, visando evitar a via vetorial contaminativa de transmissão, são os Postos de Informação de Triatomíneos (PITs). Os PITs são pontos estratégicos para a vigilância entomológica, com localização acessível, para onde a população pode encaminhar os espécimes encontrados e adquirir informações sobre os vetores e a

possibilidade de inspeção domiciliar. Do PIT, o vetor é encaminhado para laboratório de referência, municipal ou estadual, onde é identificado.

1.4 Componentes da Diversidade Biológica III: Animais de Cativeiro

Os zoológicos são espaços relevantes para a Saúde Única, seja trazendo benefícios diretos aos seres humanos, como bem-estar emocional, seja através do conhecimento gerado. Há alguns anos os zoológicos começaram a notar a importância da educação e da pesquisa para a conservação da biodiversidade (Cook e Karesh, 2008; Robinette et al., 2016). Neste contexto considera-se tanto a educação ambiental, voltada aos visitantes das instituições, proporcionando contato com animais silvestres nativos e exóticos, quanto o conhecimento voltado ao ambiente acadêmico e suas aplicações práticas para a conservação de espécies. A manutenção, o manejo e a pesquisa dos animais *ex situ* são importantes ferramentas para o conhecimento biológico, como o estudo dos comportamentos alimentar e reprodutivo, além de manutenção de variabilidade genética. Conhecer o *status* sanitário dos animais cativos é importante para garantir sua saúde, especialmente para animais ameaçados de extinção e/ou que façam parte de projetos de conservação em vida livre. Nestes casos, descendentes nascidos em cativeiro e aptos, de forma física, comportamental e sanitária, podem ser reintroduzidos à natureza. Para que estes animais possam ser utilizados no incremento da população *in situ* é essencial que o *studbook*² da espécie contenha informações claras (Rezende, 2013). Os procedimentos envolvendo a conservação de espécies ameaçadas de extinção contemplam a maneira mais direta que um ambiente de cativeiro pode contribuir com a manutenção da biodiversidade. O principal exemplo brasileiro é o caso do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), cuja população *in situ* contava com menos de 200 espécimes em 1970. Foram introduzidos na natureza, entre 1984 e 2000, 153 indivíduos trazidos de instituições nacionais e internacionais. Em 2014 a população contava com um número aproximado de 3.200 indivíduos (AMLD, 2018). Outra ferramenta de extrema relevância, que deve ser aplicada concomitantemente para a preservação da diversidade biológica, é a educação ambiental. Atividades

² Livro com todas as informações referentes à reprodução e genética de todos os espécimes cativos da espécie a ser manejada.

educativas vêm sendo cada vez mais exploradas em situações de cativeiro, seja com a participação direta de animais confinados ou não.

Ademais, as ações de pesquisa envolvendo estes animais auxiliam na compreensão e na manutenção da Saúde Única, uma vez que entender processos fisiológicos, patológicos e ecológicos em animais de zoológico possui um valor intrínseco e ajuda a compreendê-los em outros animais (domésticos e de vida livre) (Robinette et al., 2016). O parasitismo, por exemplo, pode ser intensificado a partir do confinamento de animais (Brito e Favaretto, 1997; Noireau et al., 2009), muitas vezes em virtude do estresse crônico que o cativeiro pode promover. Existe uma lacuna quanto ao conhecimento dos parasitos que infectam animais selvagens de cativeiro, sendo esse um dos motivos que dificulta o controle das parasitoses nestes ambientes (Marvulo, 2007). Podemos dizer que estas lacunas são maiores quando se trata de parasitos multi-hospedeiros (Jansen et al., 2015).

Animais de zoológico podem ser modelos das alterações orgânicas causadas por parasitos e de outros processos referentes ao parasitismo para os animais de vida livre, uma vez que: (i) em grande maioria, os indivíduos cativos são de espécies silvestres; e (ii) o ambiente de cativeiro pode simular as interações ecológicas vistas no ambiente natural, a depender de seu entorno. Marvulo (2007) reforça que, em termos epidemiológicos, zoológicos podem ser considerados como áreas naturais. Muito embora animais de cativeiro estejam mais "protegidos" do que os do meio silvestre, eles ainda podem ser infectados por tripanosomas (Santos, 2016). Apesar disso, estas infecções ainda são pouco estudadas em zoológicos, podendo estar subestimadas (Marvulo, 2007). Os primeiros relatos de infecção por *T. cruzi* em animais cativos foram em primatas (*Macaca irus*, *Macaca mulatta*, *Macaca nigra* e *Nycticebus coucang*). Contudo, os registros que datam desde 1909 até 1986, identificavam o parasito apenas através da visualização direta por microscopia óptica, salientando a dificuldade de diferenciá-lo de outros protozoários do mesmo gênero, por vezes sendo considerados indistinguíveis (Kuntz et al., 1970; Olson et al., 1986). Nos EUA os primatas cativos em criadouros científicos são diagnosticados com *T. cruzi* desde os anos 1970 (Hodo et al., 2018). No Texas, por exemplo, um estudo retrospectivo de 31 babuínos com miocardite linfocítica encontrou a infecção em 45% dos animais (Andrade et al., 2009). Uma análise molecular retrospectiva, realizada no mesmo estado, feita a partir de tecido cardíaco coletado quando do óbito de 46 primatas (babuínos, *Papio hamadryas*, e cinomolgos, *Macaca fascicularis*) identificou a infecção em 32 deles (Mubiru et al., 2014). Outro estudo no Texas diagnosticou a

infecção em 33 macacos rhesus (*Macaca mulatta*) de 41 indivíduos soropositivos (Hodo et al., 2018). Estes estudos com primatas de laboratório têm como objetivo evitar que haja prejuízo para a pesquisa biomédica em prol dos seres humanos. A infecção por *T. cruzi* nesses primatas atua como uma variável não prevista nos modelos animais, podendo interferir nos resultados das pesquisas desenvolvidas e/ou na interpretação dos mesmos. Por outro lado, pouco se sabe sobre a ecologia da transmissão de *T. cruzi* entre animais cativos e animais silvestres do entorno das instituições (Hodo et al., 2018). Um estudo no Arizona, por exemplo, diagnosticou a infecção em 145 triatomíneos silvestres (*Triatoma rubrida* e *Triatoma protracta*) capturados no zoológico Arizona-Sonora Desert Museum, dos quais 26,2% estavam infectados, mas os vertebrados não foram avaliados (Klotz et al., 2013).

O primeiro caso de identificação molecular da infecção por *T. cruzi* em um animal silvestres cativo, sem que este animal estivesse sendo criado para fins de pesquisa, foi em uma fêmea de 24 anos de urso-polar (*Ursus maritimus*). O animal veio a óbito 15 dias depois de começar a apresentar sinais clínicos de lesões em miocárdio, confirmadas pelo exame histopatológico, no Zoológico Guadalajara, no México (Jaime-Andrade et al., 1997). No Brasil, desde o primeiro relato de *T. cruzi* no macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) por Carlos Chagas, em 1924, muitos primatas de vida livre e de cativeiro foram diagnosticados com *T. cruzi* em diferentes ecossistemas (Lisboa et al., 2006). Além disso, os tripanosomatídeos estão entre os parasitos mais frequentemente encontrados em primatas não-humanos neotropicais (Ziccardi et al., 2000). Assim, dos poucos trabalhos sobre a infecção por *T. cruzi* em animais cativos, quase todos se restringem a primatas. No Brasil, um destes trabalhos também foi realizado em criadouro experimental e os animais infectados, oriundos de vida livre, possivelmente foram incorporados ao plantel já infectados, uma vez que os animais nascidos no laboratório não apresentavam infecção (Ziccardi et al., 2000). Outro trabalho encontrou resultados moleculares positivos indicando infecção por *Trypanosoma* sp., uma vez que as amostras apresentaram baixa similaridade gênica (88%) tanto com *T. cruzi*, quanto com outras espécies do gênero (Santos, 2016). Alguns trabalhos realizados em cativeiro diagnosticaram tanto mamíferos infectados (primatas e outros animais), como também vetores (*Panstrongylus megistus*) no interior das instituições (Minuzzi-Souza et al., 2016; Reis, 2018) (Quadro 1).

Quadro 1. Mamíferos cativos avaliados frente a infecção por *Trypanosoma cruzi* no Brasil e presença de triatomíneos (*Panstrongylus megistus*) no ambiente de cativeiro destes mamíferos (revisão de literatura).

Instituição Estado / País	Animais INFECTADOS/AVALIADOS (quantidade de animais) Gênero ou Espécie	Método Diagnóstico	Autoria
Centro Nacional de Primatas (PA)	4/46: 1 <i>Callithrix penicillata</i> , 1 <i>Cebuella pygmea</i> , 1 <i>Saguinus imperator imperator</i> , 1 <i>S. fuscicollis weddelli</i>	Hemocultura (todos positivos) Molecular (gêneros <i>Cebuella</i> e <i>Saguinus</i> positivos)	Ziccardi et al., 2000
Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (RJ)	2/4: 2 <i>P. megistus</i> 9/198: 1 <i>Leontopithecus rosalia</i> , 3 <i>L. chrysopygus</i> , 3 <i>L. chrysomelas</i> e 2 <i>Saguinus b. bicolor</i>	Hemocultura (primatas) e Molecular (primatas e triatomíneos)	Lisboa et al., 2004
Quatro instituições* Brasil	Presença de <i>P. megistus</i> em uma instituição (CIGS) (dados da infecção não mostrados) 7/154: 1 <i>Callicebus moloch</i> , 1 <i>Callithrix chrisoleuca</i> , 1 <i>Cebus albifrons</i> , 1 <i>C. apella apella</i> , 1 <i>Chiropotes satanas</i> e 1 <i>Saimiri sciureus</i>	Hemocultura e Molecular	Lisboa et al., 2006
Seis instituições ** (BA)	1/116: 1 <i>Cebus</i> sp.	Molecular	Liborio, 2014
Três instituições *** (SP)	3/14: 3 <i>Cerdocyon thous</i>	Hemocultura e Molecular	Zetun et al., 2014
Zoológico Municipal de Bauru (SP)	11/39: 1 <i>Alouatta caraya</i> , 1 <i>A. seniculus</i> , 2 <i>Ateles chamek</i> , 1 <i>Cebus albifrons</i> , 1 <i>Erythrocebus patas</i> , 2 <i>Lagothrix lagotricha</i> , 2 <i>Papio hamadryas</i> , 1 <i>P. papio</i>	Molecular (<i>Trypanosoma</i> sp. com 88% de similaridade a <i>T. cruzi</i>)	Santos, 2016
Fundação Jardim Zoológico de Brasília (DF)	44/50: 44 <i>P. megistus</i> 17/26: 2 <i>Aotus nigriceps</i> , 1 <i>Callithrix geoffroyi</i> , 4 <i>C. penicillata</i> , 4 <i>Leontopithecus chrysomelas</i> , 1 <i>Mico chrysoleucus</i> , 1 <i>M. argentatus</i> , 1 <i>Pithecia irrorata</i> , 3 <i>Saguinus niger</i>	Exame a fresco e Molecular	Minuzzi-Souza et al., 2016
Nove instituições**** Brasil	14/112: 1 <i>Aotus azarai infulatus</i> , 1 <i>Ateles paniscus</i> , 1 <i>Cebus olivaceus</i> , 1 <i>Lagothrix cana</i> , 1 <i>Pithecia crhysocephala</i> , 3 <i>Saguinus midas</i> , 1 <i>Saimiri sciureus</i> , 1 <i>S. ustus</i> , 3 <i>Sapajus apella</i> e 1 <i>Sapajus</i> spp.	Molecular	Bahia et al., 2016
Fundação Jardim Zoológico de Brasília (DF)	4/16: 4 <i>P. megistus</i> 50/74: <u>Primates:</u> 3 <i>Aotus nigriceps</i> , 1 <i>Ateles marginatus</i> , 1 <i>Cebus albifrons</i> , 1 <i>Chiropotes satanas</i> , 3 <i>Lagothrix cana</i> , 5 <i>Leontopithecus chrysomelas</i> , 1 <i>Saguinus bicolor</i> e 2 <i>Saguinus niger</i> . <u>Carnívora:</u> 1 <i>Cerdocyon thous</i> , 6 <i>Chrysocyon brachyurus</i> , 2 <i>Leopardus colocolo</i> , 1 <i>Leopardus tigrinus</i> , 2 <i>Lontra longicaudis</i> , 2 <i>Lycalopex vetulus</i> , 5 <i>Nasua nasua</i> , 1 <i>Panthera onca</i> , 1 <i>Procyon cancrivorus</i> , 1 <i>Puma concolor</i> , 1 <i>Puma yagouaroundi</i> , 1 <i>Speothos venaticus</i> e 1 <i>Tremarctos ornatus</i> . <u>Pilosa:</u> 6 <i>Myrmecophaga tridactyla</i> e 1 <i>Tamandua tetradactyla</i> . <u>Perissodactyla:</u> 1 <i>Tapirus terrestris</i> .	Exame a fresco (triatomíneos) e Molecular (mamíferos e triatomíneos)	Reis, 2018

* Jardim Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva do Exército Brasileiro (CIGS) (AM); Criatório Conservacionista Cariuí (AM); Centro de Triagem de Animais Silvestres do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CETAS-IBAMA) de Seropédica (RJ); e o Centro de Estudos e Manejo de Animais Silvestres (CEMAS-Horto Florestal) (SP).

** CETAS de Salvador; CETAS de Vitória da Conquista; CETAS de Barreiras; Zoológico de Itapetinga; Zoológico de Salvador; e Criadouro Conservacionista Lina Galvani.

*** Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros; Zoológico do Município de São Bernardo do Campo; e Instituto Lauro de Souza Lima.

**** CETAS Ecotel (AP); CETAS-IBAMA do Amapá (AP); Parque Zoobotânico Arivaldo Barreto (AP); CETAS-IBAMA do Amazonas (AM); Jardim Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva do Exército Brasileiro CIGS (AM); Criatório Conservacionista Cariuí (AM); Tropical Manaus EcoResort (AM); Refúgio da Vida Silvestre Sauim Castanheiras (AM); e Fundação Zoobotânica Marabá (PA).

Além dos trabalhos listados no Quadro 1, Souza Jr. e colaboradores (2004) identificaram parasitos flagelados morfologicamente indistinguíveis de *T. cruzi*, em esfregaço corado com Giemsa, a partir de tripomastigotas de hemocultivo oriundo de um macaco-prego-de-peito-amarelo (*Cebus apella xanthosternos*, atualmente *Sapajus xanthosternos*) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). No entanto, os parasitos *T. cruzi*-like não tiveram sua espécie identificada.

Além da questão intrínseca do confinamento, muitos zoológicos estão localizados próximos as áreas de mata ou fragmentos florestais. Isto pode favorecer o intercâmbio de parasitos, pela proximidade dos vetores e/ou de hospedeiros infectados (Primack & Rodrigues, 2007). Os pequenos mamíferos são exemplos de animais que podem adentrar os recintos das instituições de cativeiro, merecendo destaque por incluírem espécies comumente consideradas reservatórios de *T. cruzi* (Herrera, 2010). Estes animais costumam apresentar grandes populações em ambientes fragmentados, favorecendo a dispersão de parasitos (Mills & Childs, 1998). Ademais, para *T. cruzi*, acredita-se que a fragmentação, bem como a consequente perda de diversidade local de mamíferos, favoreça a transmissão ao menos entre os pequenos mamíferos (Vaz et al., 2007). É importante conhecer as peculiaridades de cada local para entender os fatores que influenciam na transmissão. A complexidade do ciclo silvestre de transmissão, que envolve os múltiplos genótipos de parasitos mantidos por diferentes hospedeiros silvestres, apresenta um dos maiores desafios para o controle e a prevenção da infecção por *T. cruzi* (Hodo et al., 2018).

Apesar da importância de animais em cativeiro para a manutenção da biodiversidade, ainda há lacunas no conhecimento sobre diversos parasitos nestes animais. Faz-se necessário realizar mais estudos envolvendo os animais em situação de cativeiro, buscando compreender as parasitoses e a existência ou não de impactos causados por parasitos, como *T. cruzi*, para a conservação, uma vez que a missão atual dos zoológicos é a conservação da fauna, bem como da diversidade biológica global. Além de os animais silvestres cativos serem mais acessíveis do que os de vida livre, especialmente aqueles de médio a grande porte, as parcerias entre instituições de pesquisa voltadas à saúde pública e as instituições mantenedoras de animais em cativeiro melhoram as ações direcionadas à conservação e a manutenção da Saúde Única ao redor do mundo (Robinette et al., 2016).

O Brasil conta com 106 zoológicos (SZB, 2013), mas ainda é pequena a quantidade de animais cativos que não são primatas estudados até o momento a fim de diagnosticar infecção por tripanosomatídeos.

1.5 Mata Atlântica e a Manutenção da Biodiversidade

O Bioma Mata Atlântica é constituído por diferentes ecossistemas, predominantemente florestas densas, seguidas por ilhas oceânicas, praias, costões rochosos, dunas, restingas, manguezais e campos de altitude (Haddad et al., 2013). Os dois principais tipos de vegetação dos ecossistemas florestais deste bioma são: (i) a Floresta Ombrófila Densa, cobrindo desde as planícies do litoral até elevações acima de 1.000 m nas montanhas ao leste do país; e (ii) a Floresta Estacional Semidecídua, ocupando os planaltos (acima de 600 m) do centro-oeste, sudeste e sul do país (Haddad et al., 2013). Além de haver uma gradação climática ao longo do bioma, entre os climas temperado e tropical, em virtude da ampla distribuição latitudinal, as formações florestais apresentam diferenças na distribuição dos períodos úmidos. A Floresta Ombrófila apresenta-se úmida ao longo de todo ano, enquanto a Estacional apresenta sazonalidade, com período chuvoso de outubro a março e período seco entre abril e setembro (Haddad et al., 2013).

A Mata Atlântica cobria, originalmente, cerca de 1.300.000 km² do território brasileiro, desde o Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte. No entanto, desde o período da colonização, iniciado pela costa, onde está a Mata Atlântica, vem ocorrendo uma intensa degradação. Um dos motivos desta degradação é a urbanização: cerca de 100 milhões de pessoas vivem em mais de 3.000 municípios, sendo dois deles Rio de Janeiro e São Paulo, que estão entre os maiores da América Latina e do mundo. O desmatamento do bioma ocorreu também para extração de madeira (engenharia civil, lenha e carvão vegetal) e ações agropecuárias (Haddad et al., 2013).

Apesar de ter havido regeneração e restauração do bioma em diversas áreas do país, em 2017 o desmatamento voltou a crescer. Por conta disso, atualmente a Mata Atlântica conta 12,4% de remanescentes florestais e áreas naturais (SOS Mata Atlântica, 2017). Neste cenário, o Bioma Mata Atlântica é responsável por abrigar mais de 20.000 espécies de plantas vasculares e mais de 2.000 vertebrados, dos quais 32% e 40%, respectivamente, são endêmicos deste bioma (Pinto et al., 2006; Haddad et al., 2013). Salienta-se que, em 2005, em virtude da grande fragmentação e por possuir diversas espécies endêmicas, a Mata Atlântica contribuía com mais de 60% das espécies de animais tidas como ameaçadas no Brasil até aquele momento (Pinto et al., 2006). Não há informações sobre o *status* de conservação e/ou a diversidade de parasitos. No entanto, a biodiversidade destes organismos parece acompanhar a

diversidade dos demais, sendo maior nas áreas tropicais e subtropicais (Bush et al., 2001a). Com relação ao *T. cruzi*, sabemos que no Bioma Mata Atlântica seu ciclo enzoótico está presente, como em todo Brasil, e conta com marsupiais, cingulata, pilosa, roedores, carnívoros, morcegos e primatas (Lisboa et al., 2006) como hospedeiros, tendo destaque as ordens Didelphimorphia, Carnivora e Primates (Jansen et al., 2018). Além disso, fatores como desmatamento e queda da biodiversidade favorecem a transmissão de *T. cruzi* no ambiente silvestre (Lisboa et al., 2006).

Uma medida importante para proteger esse e outros biomas é a criação, manutenção e a gestão de Unidades de Conservação (UC) como Reservas, Parques, Estações Ecológicas e Áreas de Proteção Ambiental. Atualmente existem 2.300 UCs na Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica, 2017) e apesar de elas não serem suficientes para preservar todas as espécies de plantas e animais (Haddad et al., 2013), as maiores áreas de remanescentes se encontram em UCs localizadas principalmente na região costeira (Pinto et al., 2006). Dentre as UCs presentes na Mata Atlântica, encontra-se o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI).

1.5.1 Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) está localizado na região sudeste do município de São Paulo/SP. Foi criado em 1895 e era nomeado inicialmente como Mata do Governo, Parque do Estado ou Parque da Água Funda, até 1969, quando foi finalmente instituído pela lei estadual nº 10.353/1969, regulamentada pelo decreto nº 52.281/1969. Neste decreto foram delimitados: (i) Reserva Biológica, composta pelas áreas florestadas; (ii) Jardim Botânico; (iii) Zoológico; e (iv) a área livre, formada por diversas áreas já desmatadas (SMA, 2007). O PEFI passou por desafetação de cerca de 330 ha, além da integração de cerca de 65 ha (lei estadual nº 14.944/2013), contando atualmente com uma área total aproximada de 543 ha (SILVA et al., 2014), onde está inserida a Fundação Parque Zoológico de São Paulo, o maior zoológico do Brasil.

1.5.2 Fundação Parque Zoológico de São Paulo

Em 1957 foi criado, na área do então Parque do Estado, o Zoológico de São Paulo, com pouco mais de 400 animais no plantel, sendo instituído como FPZSP pela lei estadual nº 5.116/1958 e mantido pelo decreto nº 53.338/2008. A instituição é dividida em três unidades: (i) Divisão de Produção Rural (DPR; fazenda fundada em 1982 para produção de alimentos para os animais cativos, localizada entre os municípios de Sorocaba, Araçoiaba da Serra e Salto de Pirapora), (ii) Zoo Safari (inaugurado em 2011, possui recintos inseridos no interior da mata do PEFI, com pouca ou nenhuma barreira física entre o visitante e entre a mata do entorno, e com visita realizada em veículo automotor) e o (iii) Zoológico, que possui ampla estrutura para visita, contando com banheiros e lanchonetes, e recebendo, de 2010 a 2017, mais de 1.500.000 visitantes por ano (FPZSP, 2017). Além da estrutura para o público visitante, o Zoológico conta com diversos setores, como a Divisão de Veterinária (DV) (onde os animais permanecem internados, passam por intervenções cirúrgicas, dentre outros procedimentos), os biotérios (tanto de vertebrados quanto de invertebrados, visando a produção de alimento para os animais do plantel), o Setor Extra (onde ficam alojados os animais excedentes do plantel), entre outros.

A partir da década de 1990, a FPZSP começou a voltar os olhares para a conservação de espécies ameaçadas, atualização dos procedimentos técnicos e mitigação dos impactos ambientais gerados por suas atividades, possuindo um Sistema de Gestão Integrada, a partir da obtenção das certificações ISO 14001³ (Gestão Ambiental) e ISO 9001⁴ (Gestão da Qualidade). Outra preocupação que surgiu nos anos 90 foi a educação ambiental, originando desde ações junto a professores de escolas da rede pública de ensino, até atividades internas. Um exemplo destas atividades é o discurso educativo junto da aproximação dos visitantes a animais silvestres dóceis, que participam das ações de educação ambiental, podendo ser tocados e que ficam alojados em um setor intitulado Vida de Bicho. Já nos anos 2000, a instituição consolidou seu compromisso com a pesquisa a partir da criação do Departamento de Pesquisas Aplicadas (DPA): um complexo laboratorial para pesquisas na área de conservação e exames diagnósticos de animais selvagens, que conta com três Núcleos: (i) Análises Clínicas; (ii) Biologia Molecular e

³ Certificação por seguir as normas brasileiras (NBR) com requisitos para Sistema de Gestão Ambiental da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (NBR ISO 14001: 2015).

⁴ Certificação por seguir as normas brasileiras (NBR) com requisitos para Sistema de Gestão da Qualidade da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (NBR ISO 9001: 2015).

Microbiologia; e (iii) Reprodução Assistida e Biotecnologia. Outros setores importantes da fundação são o Núcleo de Atividades *In Situ* (NAIS), a partir do qual são realizadas pesquisas com animais de vida livre, visando a conservação das espécies, e o Centro de Conservação de Fauna Silvestre do Estado de São Paulo (CECFAU), destinado a abrigar e estudar indivíduos de espécies ameaçadas, localizado em Sorocaba (SP) (FPZSP, 2015).

Atualmente, o Zoológico e o Zoo Safari juntos contam com uma área aproximada de 82 ha e abrigam 2732 animais vertebrados cativos, sendo alguns nascidos na fundação, alguns nascidos em outras instituições de cativeiro e outros oriundos da natureza. Nesse último caso, a maioria dos animais são levados para a FPZSP por munícipes, bombeiros, guarda civil metropolitana ou órgãos ambientais, devido a motivos como a morte dos pais ou ferimentos. Estes animais são mantidos em tratamento na FPZSP e são incorporados ao plantel quando não estão aptos ao retorno à vida livre, sendo exemplos comuns: (i) aves que perdem a capacidade de voo e (ii) mamíferos órfãos que ficam dóceis.

2 JUSTIFICATIVA

Em 2013, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) encaminhou ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP) tecido cardíaco e soro de dois espécimes de lobo-europeu (*Canis lupus*), além de soro de um terceiro indivíduo, para diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. Dois dos indivíduos formavam um casal, trazido do Vancouver Zoo (Canadá) em 1996. O terceiro animal, filho do casal, nasceu na FPZSP em 2003. O macho do casal veio à óbito em 2010, a fêmea em 2013 e o filho em 2018. A suspeita da infecção por *T. cruzi* surgiu em virtude de os três animais apresentarem alterações cardíacas, diagnosticadas após auscultação e/ou análise dos eletrocardiogramas. Os inquéritos sorológicos foram positivos para todos os lobos, indicando a presença da infecção nos três indivíduos, enquanto o diagnóstico molecular confirmou a infecção por *T. cruzi* no casal. Estes, mantidos na FPZSP desde sua chegada, sem histórico de deslocamentos até o momento do óbito, confirmaram a autoctonicidade dos casos. Havia ainda a suspeita de outro caso autóctone de 2016, um ouriço-cacheiro (*Sphiggurus villosus*) cujo sangue continha tripanosomatídeos flagelados, observados em exame à fresco. Além disso, há relatos de animais que, esporadicamente, predam gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) oriundos das áreas de mata do entorno, que adentram os recintos. Fazem parte deste grupo de mamíferos os próprios lobos-europeus (*C. lupus*), lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), chimpanzés (*Pan troglodytes*) e macacos-prego (*Cebus* sp.).

Considerando a relevância da tripanossomíase para a saúde única e, conseqüentemente, para a conservação, era imprescindível esclarecer como estes mamíferos cativos adquiriram a infecção. Era importante definir também quais outros mamíferos poderiam estar infectados. Ao conhecer a dinâmica dos ciclos de tripanosomatídeos na FPZSP e os principais fatores envolvidos na infecção dos mamíferos cativos, seria possível sugerir medidas que diminuam a exposição dos demais animais do plantel a estes fatores.

A hipótese levantada para essa dissertação é que há um ciclo enzoótico de transmissão de *Trypanosoma cruzi* envolvendo outros mamíferos cativos da FPZSP e que a transmissão para estes animais envolve os pequenos mamíferos de vida livre e os triatomíneos da mata do entorno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos (*ex situ*) da FPZSP e em pequenos mamíferos de vida livre (*in situ*) da área do entorno.

3.2 Objetivos Específicos

- Diagnosticar a infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos e de vida livre capturados, bem como em triatomíneos encontrados na FPZSP e áreas do entorno;

- Correlacionar a taxa de infecção e os perfis de infecção por *Trypanosoma* spp. nos mamíferos cativos com seus históricos de nascimento e deslocamento, hábitos exploratórios e predatórios, e localização dos recintos na FPZSP;

- Realizar a identificação taxonômica (e análise filogenética, quando necessário) dos parasitos encontrados em mamíferos e vetores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

Em seus 543 ha, o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é a Unidade de Conservação (UC) que contempla o maior fragmento do bioma Mata Atlântica inserido na área urbana da Região Metropolitana de São Paulo (Figura 1) e compõe a Bacia Hidrográfica do Rio Tietê (Alto Tietê), sendo considerado uma UC de Proteção Integral. O clima é considerado mesotérmico brando (média entre 10 °C e 15 °C), superúmido (sem seca/subseca) e a vegetação do PEFI é caracterizada por floresta ombrófila densa de encosta atlântica, em estágio sucessional secundário tardio e médio, com elementos de floresta estacional semidecidual e de cerrado, além de porções de campos antrópicos com presença de árvores exóticas. O grupo faunístico dos mamíferos de vida livre é representado majoritariamente por bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) e gambás (*Didelphis* sp.) (IBGE, 2002; SMA, 2007; Silva et al., 2014), havendo outras nove espécies de pequenos e médios mamíferos, dentre roedores, marsupiais e primatas (biólogo Cauê Monticelli, comunicação pessoal), além de 10 espécies de morcegos (Rossi, 2017).

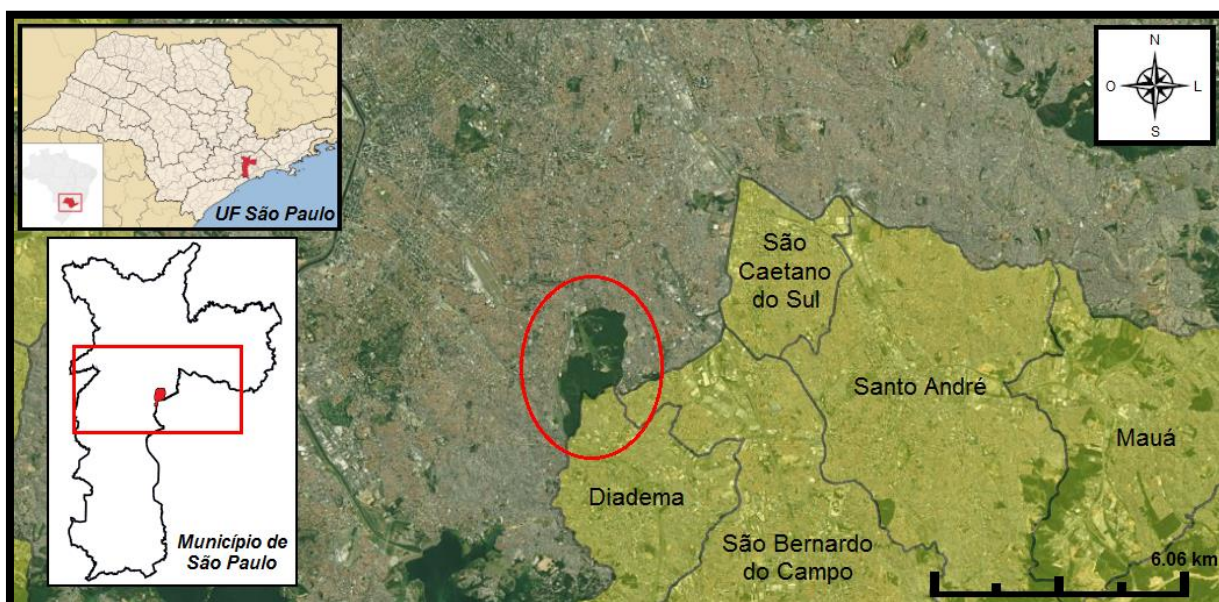


Figura 1. Localização do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (no interior do círculo vermelho): o maior fragmento de Mata Atlântica inserido na área urbana de São Paulo (SP). *Fonte: Google Earth e Prefeitura de São Paulo (adaptado).*

Dos 2732 vertebrados mantidos na FPZSP, 451 são mamíferos distribuídos nos seguintes recintos: (i) do Zoo Safari, estando todos os recintos inseridos em área densamente florestada, e (ii) do Zoológico, sendo alguns recintos adjacentes às áreas de mata e/ou aos cambeamentos⁵ dos recintos do Zoo Safari (FPZSP, 2017). Este fator facilita o contato entre os animais cativos e os de vida livre (vertebrados e invertebrados) que frequentam as dependências do Zoológico, por serem atraídos por fatores como disponibilidade de alimento e lagos e nascentes do riacho do Ipiranga (Figura 2).

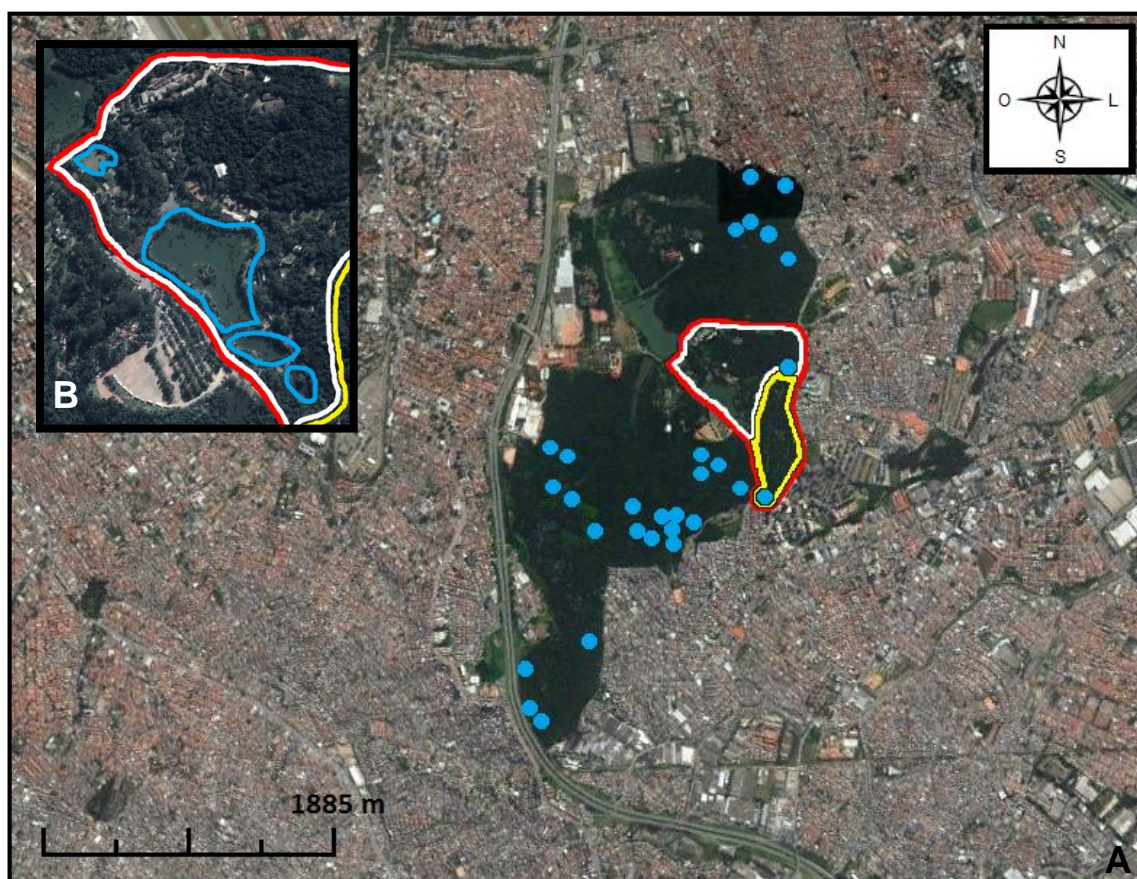


Figura 2. A. Localização do Zoológico (área em branco) e do Zoo Safari (área em amarelo), na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (área em vermelho), dentro do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Os pontos azuis indicam a localização das nascentes no interior do PEFI. *Fonte: Google Earth. B.* Imagem aproximada mostrando, nas áreas em azul, os lagos existentes no interior do Zoológico. *Fonte: Google Earth (adaptado do Plano de Manejo do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – SMA, 2007). São Paulo (SP).*

⁵Cambeamento: local do recinto destinado à contenção física dos animais visando a segurança da equipe técnica para manejo, fornecimento de alimentos, manutenção dos recintos, dentre outros procedimentos. Os cambeamentos não são acessíveis, física e visualmente, para os visitantes.

4.2 Mamíferos *ex situ*

O cronograma de coletas das amostras de mamíferos cativos foi definido junto aos Médicos Veterinários da FPZSP, priorizando o bom funcionamento da Divisão de Veterinária (DV) e o bem-estar dos animais. Considerando que a coleta de amostras de animais silvestres envolve contenção química, e que todo procedimento anestésico oferece risco à saúde dos animais, além de ser um fator estressor, a equipe da DV e o LABTRIP optaram por manejar os animais o menor número de vezes possível. Assim, em abril de 2017 a equipe do LABTRIP ofereceu um treinamento para a equipe da FPZSP, a fim de padronizar as coletas e os exames parasitológicos diretos, para quando a equipe do LABTRIP não estivesse presente. Desta forma, foi possível que a equipe da DV realizasse coletas de amostras quando os animais precisavam ser manejados para outras finalidades, como realização de acupuntura, radiografias, ultrassonografias, entre outros. Estas coletas foram classificadas como pontuais e oportunistas e ocorreram ao longo do período de maio de 2017 a setembro de 2018. Além disso, foram realizadas oito semanas de coletas sistemáticas, em oito meses diferentes: de agosto a dezembro de 2017 (compondo parte das coletas primárias), e fevereiro, maio e setembro de 2018 (compondo parte das recoletas).

As espécies de mamíferos cativos escolhidas como objeto de estudo deste trabalho foram definidas pela equipe de biólogos e veterinários da FPZSP. Posteriormente, as espécies foram categorizadas em quatro grupos de risco para coletas sistemáticas de amostras (Grupos I a IV; Quadro 2 e Figura 3), a fim de auxiliar na identificação dos fatores de risco envolvidos na infecção destes animais. A categorização dos grupos foi feita tendo-se como critérios: (i) o diagnóstico prévio de infecção por tripanosomatídeos, caracterizando os casos índice no Grupo I; (ii) a predação esporádica de gambás (*Didelphis* spp.) por animais sem diagnóstico prévio de infecção por tripanosomatídeos, no Grupo II; (iii) a proximidade com os animais infectados (do Grupo I) e/ou com os animais que apresentam histórico de predação de gambás (do Grupo II), no Grupo III; e (iv) a maior proximidade com a mata, de modo que os recintos do Grupo IV tangenciam a mata. Além destes quatro grupos, formou-se um grupo de coletas oportunistas (Grupo V; Quadro 3 e Figura 3), composto por mamíferos que não se enquadravam nos grupos de risco, mas que precisaram ser manejados pela equipe da fundação por outras razões, sendo incluídos na rotina de coleta de amostras. Os indivíduos foram contidos uma primeira vez para coleta de material, sendo contidos uma segunda vez, quando possível, após um intervalo

mínimo de quatro meses. Foi possível realizar a segunda coleta principalmente nos casos de: (i) animais de pequeno a médio porte e/ou dóceis, cuja logística para o manejo é mais simples; (ii) animais saudáveis e/ou jovens, para os quais os procedimentos anestésicos representam menor risco de morte e/ou sequelas; e (iii) animais em tratamento ou sob acompanhamento clínico, que já seriam manejados pela equipe técnica da FPZSP por outras razões. Quatro animais de diferentes espécies (*Sphiggurus villosus*, *Leopardus geoffroyi*, *Leopardus wiedii* e *Leontopithecus chrysomelas*) vieram a óbito antes que fosse realizada a segunda coleta.

Quadro 2. Grupos de risco de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo para as duas coletas sistemáticas de amostras previstas, visando o diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. (Grupos I a IV).

Grupo	DESCRIÇÃO	MAMÍFERO		Local do Recinto	Qtde. Col. I	Qtde. Col. II
		Nome Científico	Nome Comum			
I	Espécimes infectados por tripanosomatídeos	<i>Canis lupus</i>	lobo-europeu	Exposição	1	1
		<i>Sphiggurus villosus</i> ¹	ouriço-cacheiro	Vida de Bicho e DV	3	2
II	Mamíferos que esporadicamente predam gambás (<i>Didelphis</i> spp.)	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	lobo-guará	Exposição	4	4
		<i>Leopardus pardalis</i>	jaguaritica	Exposição	2	1
		<i>Pan troglodytes</i>	chimpanzé	Exposição	5	0
		<i>Sapajus apella</i>	macaco-prego	Zoo Safari	12	10
III	Mamíferos cujos recintos são próximos aos infectados por tripanosomatídeos e próximos aos mamíferos que esporadicamente predam gambás (<i>Didelphis</i> spp.)	<i>Dasyprocta azarae</i>	cutia	Vida de Bicho	1	1
		<i>Leopardus geoffroyi</i>	gato-do-mato-grande	Exposição e Extra	8	7
		<i>Leopardus wiedii</i>	gato-maracajá	Extra	2	1
		<i>Leptailurus serval</i>	serval	Exposição	3	3
		<i>Oncifelis colocolo</i>	gato-palheiro	Extra	2	2
		<i>Puma yagouaroundi</i>	gato-mourisco	Extra (planície)	3	2
		<i>Tayassu tajacu</i>	cateto	Vida de Bicho	1	1
		<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	mico-leão-de-cara-dourada	Extra (micário) e Exposição	19	12
IV	Mamíferos cujos recintos estejam adjacentes à área de mata	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	mico-leão-preto	Extra (micário)	9	3
		<i>Lycaon pictus</i>	cão-selvagem-africano	Exposição	2	1
		<i>Panthera leo</i>	leão	Exposição e Zoo Safari	5	0
		<i>Panthera tigris tigris</i>	tigre-real-de-bengala	Exposição e Zoo Safari	3	1
		<i>Ursus arctos</i>	urso-pardo	Exposição	1	1
TOTAL					86	53

Qtde.: Quantidade de animais avaliados. Col.: Coleta (I: primeira; II: segunda). Local do Recinto: recinto no qual o animal estava no dia da coleta. 1. Atualmente *Coendou spinosus* (Voss et al., 2011), mantivemos o nome científico utilizado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Quadro 3. Mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo manejados para coletas oportunistas de amostras, visando o diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. (Grupo V).

MAMÍFEROS		Local do Recinto	Qtde. Coleta I	Qtde. Coleta II
Nome Científico	Nome Comum			
<i>Ateles</i> sp.	macaco-aranha	Zoo Safari	1	0
<i>Ateles paniscus</i>	macaco-aranha-preto	Exposição (ilha)	1	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>	muriqui	Exposição (ilha)	2	0
<i>Cercopithecus thomasi</i>	cachorro-do-mato	Extra	1	0
<i>Didelphis aurita</i>	gambá-de-orelha-preta	Vida de Bicho	1	1
<i>Eira barbara</i>	irara	Extra	1	0
<i>Lama glama</i>	lhama	DV	1	0
<i>Leopardus tigrinus</i>	gato-do-mato-pequeno	Extra	4	2
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	CECFAU/DV	1	0
<i>Sapajus flavius</i>	macaco-prego-galego	Extra/DV	1	1
<i>Suricata suricatta</i>	suricata	Zoo Safari	4	0
<i>Speothos venaticus</i>	cachorro-vinagre	Extra	1	0
<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	Extra	1	0
TOTAL			20	4

Qtde.: Quantidade de animais avaliados. Coleta I: primeira coleta. Coleta II: segunda coleta). Local do Recinto: recinto no qual o animal estava alojado no dia da referida coleta.



Figura 3. Localização dos recintos do Setor Extra (extra, micário e planície), da Divisão de Veterinária (DV), do Setor Vida de Bicho e dos recintos (recintos e ilhas) de exposição dos mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo avaliados quanto à infecção por *Trypanosoma* spp. Apenas um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) avaliado habitava um recinto de exposição (sinalizado no mapa) no momento da coleta de amostras biológicas; os demais indivíduos da espécie habitavam o Setor Extra (micário). *Fonte: Google Earth.*

4.2.1 Contenção dos Mamíferos Cativos

As contenções físicas e químicas foram realizadas de acordo com os protocolos de rotina estabelecidos pela FPZSP, que forneceu os anestésicos utilizados na contenção dos animais cativos. Para os animais de pequeno a médio porte e/ou criados em cativeiro desde filhote (animais dóceis), foi feita inicialmente a contenção física de acordo com a espécie em questão (luvas de raspa de couro, puçá ou caixa de prensa), para posterior contenção química. Dependendo do porte e do temperamento do animal, a contenção química poderia ser realizada com medicação pré-anestésica injetável, pela via intramuscular (com uso de dardos ou seringa), ou diretamente com medicação anestésica inalatória. Para os animais de grande porte ou com temperamento mais agressivo, a medicação pré-anestésica era feita com uso de dardos com posterior anestesia, pela via endovenosa (propofol) ou inalatória (isofluorano).

4.3 Mamíferos *in situ*

O cronograma das capturas de pequenos mamíferos de vida livre foi definido junto dos biólogos do Setor de Mamíferos da FPZSP, que auxiliaram a equipe do LABTRIP nos trabalhos de campo. Desta forma, realizamos duas campanhas de cinco noites cada (esforço amostral de 750 armadilhas x noite), uma na estação seca (julho de 2017) e outra na estação chuvosa (fevereiro de 2018). Foram estabelecidos cinco transectos lineares (A, B, C, D e E), dispostos a uma distância máxima de 150 metros dos recintos dos mamíferos cativos dos grupos de interesse (Grupos I a IV). Utilizamos 75 armadilhas (37 Sherman⁶ e 38 Tomahawk⁷), intercaladas e dispostas a cada 10 metros, de forma que os transectos possuíam de 100 a 250 metros de comprimento cada⁸, sendo o maior deles (transecto E – com 250 m) na divisa entre a área do Zoológico e a área do Zoo Safari (Quadro 4 e Figura 4). No interior de cada armadilha foi colocado como isca uma mistura de banana, bacon, pasta de amendoim e aveia. Os transectos eram percorridos diariamente pela manhã para checagem das armadilhas e troca das iscas. Os animais silvestres capturados eram mantidos nas armadilhas e transportados ao laboratório de campo, montado em uma sala de apoio da FPZSP a uma distância máxima de 700 metros dos transectos. O transporte era

⁶H. B. Sherman Traps Inc. – Talahasee/FL (USA).

⁷Tomahawk Live Traps – Tomahawk/WI (USA).

⁸A, C e D– 100 a 120 metros; B – 170 metros; E – 250 metros.

realizado em veículo automotor da FPZSP, adequado ao transporte de animais. Quando um animal era capturado, uma armadilha do mesmo tipo era colocada no local. Quando gatos domésticos ferais eram capturados, era feita a soltura imediata do animal, a fim de manter o foco do estudo dentre os animais silvestres, bem como a reposição da isca.

Quadro 4. Disposição dos transectos lineares para captura de pequenos mamíferos de vida livre, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, com relação aos grupos de mamíferos cativos da instituição selecionados para a coleta sistemática de amostras, visando o diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp.

Transectos Lineares	Grupo de Mamíferos Cativos (Coleta Sistemática)
C e D	Grupo I: <i>Canis lupus</i> e <i>Sphiggurus villosus</i>
A, B e E	Grupo II: mamíferos que esporadicamente predam gambás (<i>Didelphis</i> spp.)
A, B, C e D	Grupo III: mamíferos cujos recintos estão próximos dos recintos dos animais dos Grupos I e II
C, D e E	Grupo IV: mamíferos cujos recintos estejam adjacentes à área de mata



Figura 4. Localização dos transectos lineares (linhas amarelas) para captura de pequenos mamíferos de vida livre dentro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (São Paulo – SP).
 Fonte: Google Earth.

Ademais, a instituição recebe esporadicamente animais de vida livre, que são atendidos, tratados e devolvidos à natureza ou incorporados ao plantel, a depender do caso. Assim, oito mamíferos silvestres de vida livre, todos oriundos da mata do

PEFI, foram incorporados ao estudo, oriundos de apenas uma coleta oportunista (Quadro 5).

Quadro 5. Mamíferos silvestres de vida livre manejados para coleta oportunista de amostras, visando diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp.

MAMÍFERO		
Nome Científico	Nome Comum	Quantidade
<i>Alouatta clamitans</i>	bugio-ruivo	1
<i>Dasyus novemcinctus</i>	tatu-galinha	1
<i>Didelphis aurita</i>	gambá-de-orelha-preta	4
<i>Sphiggurus villosus</i>	ouriço-cacheiro	2
TOTAL		8

4.3.1 Contenção e Biomarcção de Pequenos Mamíferos de Vida Livre

Os animais silvestres capturados nos transectos foram levados ao laboratório de campo, onde foram realizados exames clínicos por inspeção, pesagem (ainda no interior das armadilhas), contenção física com luvas de raspa de couro, contenção química, exame físico, coleta de material biológico, e biomarcção individual, com o uso de brinco numerados no pavilhão auricular.

Na primeira campanha, a contenção química foi realizada com o protocolo anestésico utilizado rotineiramente no LABTRIP, a saber: quetamina (20 a 30 mg/kg), xilazina (1 a 2 mg/kg) e fentanil (0,015 mg/kg a 0,03 mg/kg), sendo este último administrado 15 minutos depois dos primeiros (via intramuscular) (Malta e Luppi, 2007; Brust e Pye, 2013; Fantoni e Cortopassi, 2014). Na segunda campanha, a fim de obtermos um melhor relaxamento muscular dos animais, adotou-se o protocolo anestésico da equipe da FPZSP: quetamina (25 mg/kg), midazolam (0,05 mg/kg) e fentanil (0,02 mg/kg), também administrado posteriormente (via intramuscular). Nestes casos, ao final do procedimento era administrado flumazenil (via intramuscular a 0,01 mg/kg), a fim de reverter o efeito do midazolam. Os animais foram soltos no mesmo local da captura após completa recuperação do efeito anestésico.

Os mamíferos de vida livre manejados de forma oportunista pela equipe da FPZSP foram contidos (física e quimicamente) de acordo com os protocolos da fundação, enquanto a coleta de material biológico foi realizada de acordo com o treinamento oferecido pelo LABTRIP.

4.4 Coleta de Triatomíneos

Os triatomíneos que eram encontrados nas dependências da FPZSP foram capturados manualmente pelos técnicos do local, utilizando luvas de raspa de couro e/ou pinças anatômicas, a fim de serem identificados e examinados pelo LABTRIP. Os invertebrados vivos foram acondicionados em coletores universais plásticos, com a tampa furada para entrada de ar, e com papel filtro sanfonado em seu interior. Já os animais encontrados mortos, ou que vieram a óbito após a captura, foram acondicionados em coletores contendo etanol a 70% (Jurberg et al., 2017). Todos os animais foram encaminhados ao LABTRIP e identificados com o uso de chaves dicotômicas (Lent e Wygodzinsky, 1979).

4.5 Exame Físico e Coleta de Amostras

4.5.1 Mamíferos *ex situ* e *in situ*

Todos os animais foram examinados clinicamente por inspeção e tendo sua frequência respiratória (FR) avaliada antes da contenção química. Esses animais foram monitorados durante os procedimentos anestésicos, sendo avaliados ao menos frente aos seguintes parâmetros: hidratação, coloração das mucosas oral e/ou oculares, frequência cardíaca (FC) e FR. Para os animais cativos, também foram monitorados saturação de oxigênio, pulso e temperatura retal. Os pequenos mamíferos capturados nas campanhas realizadas pelo LABTRIP foram pesados, enquanto alguns mamíferos cativos tiveram seu peso estimado a partir do manejo anterior. A idade dos mamíferos do plantel foi obtida a partir dos dados da FPZSP, enquanto os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) *in situ* foram classificados a partir do peso, a saber: filhotes (até 400g), jovens (entre 400g e 1.100g) e adultos (a partir de 1.100g) (adaptado de Telford e Tonn, 1982, Rossi et al, 2006, Marta e Luppi, 2007 e Nascimento e Horta, 2014). A idade dos mamíferos *in situ* manejados de forma oportunista pela equipe da FPZSP foi classificada de acordo com os protocolos da fundação.

O sangue foi coletado de forma asséptica pela veia de acesso preconizada pela FPZSP, para os animais *ex situ*, e por via intracardíaca ou pela veia lateral caudal nos animais *in situ*. Foi obtido um volume total de sangue respeitando os limites máximos preconizados: até 10% do volume de sangue total do indivíduo (cerca de 1% do peso

do animal) (Almosny e Monteiro, 2007). As coletas foram realizadas sempre em uma área estéril de segurança biológica, próxima à chama de um fogareiro, e o sangue coletado foi distribuído da seguinte forma: (i) dois microcapilares, fechados ao fogo e mantidos em temperatura ambiente para aferição do valor do hematócrito (volume globular) (Almosny e Monteiro, 2007) e obtenção da papa leucocitária, posteriormente disposta entre lâmina e lamínula (exame a fresco de papa leucocitária); (ii) uma gota entre lâmina e lamínula, que após montadas foram mantidas em câmara úmida até a leitura (exame a fresco de sangue); (iii) um volume entre 600µL e 1000µL dividido entre dois tubos com meio de cultivo bifásico de NNN (fase sólida ágar-sangue NNN - Novy, McNeal e Nicolle) e LIT (fase líquida com *Liver Infusion Tryptose*, enriquecido com 10% a 20% de soro fetal bovino), com sulfato de gentamicina (140 mg/mL - Garamicina®⁹) (Lisboa et al., 2004), e mantido em temperatura ambiente até que fosse transportado ao LABTRIP; (iv) um volume mínimo de 300µL armazenado em um tubo com isotiocianato de guanidina e ácido etilenodiamino tetra-acético (guanidina 6M; EDTA 0,2M), na proporção de 1:2 (sangue:guanidina-EDTA), mantido sob refrigeração (Avila et al., 1991); e (v) o volume restante armazenado em microtubos sem anticoagulante e mantidos em temperatura ambiente até que fossem centrifugados com o protocolo de rotina da FPZSP (2.500 rotações por minuto, por 5 minutos, na centrífuga Excelsa® II 206-BL¹⁰), para separação de soro e coágulo. O soro foi transferido para outros tubos, mantidos congelados a -20 °C até sua utilização.

As amostras foram enviadas ao LABTRIP através de uma transportadora sob responsabilidade da Fiocruz. O transporte foi realizado no período máximo de 10 dias para a hemocultura, enquanto os tubos com soro e guanidina permaneceram na FPZSP até quando fosse possível transportá-los, de modo a manter a temperatura constante das amostras.

Para os mamíferos cativos, além das amostras biológicas, foram coletadas informações do banco de dados da FPZSP, como o local de origem e os hábitos dos animais. Além disso, para aqueles animais infectados por *T. cruzi* coletamos o histórico de: (i) deslocamento entre outras instituições e (ii) deslocamento entre recintos da fundação (e sua localização).

⁹Schering-Plough – Anápolis/GO (BR).

¹⁰Fanem® – São Paulo/SP (BR).

4.5.2 Triatomíneos

Já no LABTRIP, os barbeiros vivos eram imersos em álcool-iodado a 0,3% (0,3 g de iodo em 100mL de etanol a 70%) e posteriormente em etanol 70%. Na cabine de segurança biológica, a porção final do abdome dos insetos já mortos era novamente imersa nas mesmas soluções, além de solução salina (0,85%) autoclavada e suplementada com solução antibiótica e antimicótica (A5955¹¹). Com o uso de pinças e tesouras cirúrgicas autoclavadas, foi feita uma abertura lateral no abdome dos barbeiros e remoção do tubo digestivo, que foi macerado em uma lâmina de vidro escavada contendo a mesma solução salina usada anteriormente. Uma gota desta solução final era colocada entre lâmina e lamínula, enquanto o restante era acondicionado em tubos com os mesmos meios de cultivo utilizados para o hemocultivo. O remanescente do tubo digestivo dos animais foi congelado.

4.6 Processamento e Análise das Amostras

O processamento e a análise das amostras foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 5), os quais estão descritos nos subtópicos seguintes.

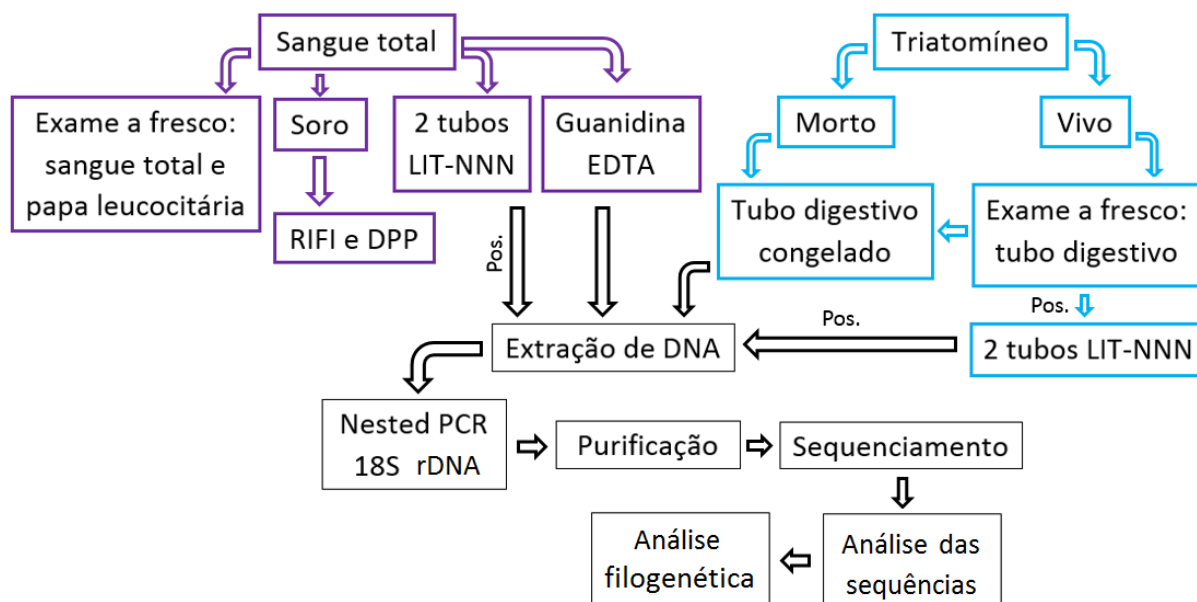


Figura 5. Fluxograma dos métodos de diagnóstico empregados a partir das diferentes amostras biológicas analisadas (sangue de mamíferos e tubo digestivo de triatomíneos). Pos.: Resultado positivo.

¹¹A solução contém: 10.000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 mg de anfotericina B por mL. Sigma-Aldrich® – St. Louis/MO (USA).

4.6.1 Diagnóstico Parasitológico

4.6.1.1 Exames Parasitológicos A Fresco

Os exames a fresco de sangue de mamíferos (*ex situ* e *in situ*) e de conteúdo de tubo digestivo (fezes) de triatomíneos foram realizados com microscópio óptico Olympus CX31¹², buscando-se o parasito em todos os campos da lâmina, em aumento de 400 vezes (Castro et al., 2000). Os dois microcapilares coletados foram centrifugados a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos, na microcentrífuga CENTRIBIO H240¹³, para obtenção da papa leucocitária. Os microcapilares foram então cortados, com auxílio de uma lixa, na altura da papa leucocitária, que era colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscopia óptica como no exame a fresco de sangue (Neto et al., 1997; Carlier et al., 2010).

4.6.1.2 Cultivos

Tanto as hemoculturas quanto as culturas de fezes de triatomíneos foram acompanhadas quinzenalmente por até quatro meses. Quando positivas, as culturas foram ampliadas a partir da suplementação com LIT sempre que necessário e da passagem para novas culturas diante do crescimento da população de parasitos. Quando a população estava na etapa final de crescimento (em erlenmayer de 100mL), atingindo uma quantidade aproximada de 10⁸ parasitos (60 parasitos/campo), um volume equivalente a 10mL foi preservado com glicerol em nitrogênio líquido e depositado na Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (COLTRYP – IOC/Fiocruz). Os 90mL restantes foram submetidos à centrifugação e lavagem, a fim de se obter as massas parasitárias para congelamento, mantidas congeladas a -20 °C, para posterior caracterização molecular.

4.6.1.3 Diagnóstico Molecular

A extração de DNA para diagnóstico e/ou caracterização molecular dos parasitos foi feita: (i) das culturas positivas (de sangue dos mamíferos e de fezes dos triatomíneos), (ii) dos tubos digestivos dos triatomíneos (congelados) e (iii) do sangue coletado com guanidina-EDTA. A extração de DNA das culturas e dos tubos digestivos dos insetos foi feita através da técnica de fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001), enquanto a extração do sangue em guanidina-EDTA foi realizada com *kit*

¹²Olympus Corporation – Waltham/MA (USA).

¹³CENTRIBIO Jiangsu Zhengji Instrumentos Co. LTD. – Jiangsu (CHN).

comercial (DNeasy® Blood & Tissue Kit¹⁴), seguindo as instruções do fabricante, sendo utilizada a proteinase K (Fungal¹⁵) nos dois protocolos. Após extraído, o DNA foi amplificado através da Nested-PCR (uma reação em cadeia da polimerase feita com dois conjuntos de *primers* diferentes), tendo como alvo uma região variável do gene 18S SSU do rRNA (Smith et al., 2008), com o uso do termociclador Swift™ MaxPro Thermal Cycler¹⁶ (modelo SWT-MXP-BLC-1). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich®¹⁷) a 2%, utilizando como tampão para o processamento do gel a solução TBE 1x (tris-borato-EDTA, composta por tris 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M, com pH 8.0), utilizando fontes modelo PW300 (PWSys¹⁸). A visualização dos produtos da PCR amplificados se deu pela revelação do corante fluorescente de ácido nucleico GelRed™ (Biotium¹⁹) sob efeito da luz ultravioleta, com o uso do fotodocumentador Carestream Gel Logic 212 PRO²⁰, tendo como referência um marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotec²¹) e controle positivo da PCR oriundo da COLTRYP (C 00565). Amostras positivas na PCR foram submetidas à purificação, através de *kit* comercial (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit²²) quando: (i) a visualização de banda em altura próxima a de interesse, 600 pb (pares de bases), sugeria presença de quantidade adequada de DNA para ser purificado e sequenciado, baseado na intensidade da banda visualizada no gel; e (ii) quando a banda era única ou as demais bandas visualizadas indicavam pouco DNA presente, de forma a não interferir na etapa de sequenciamento.

Para algumas amostras de sangue total com guanidina-EDTA que se apresentaram coaguladas no momento da extração de DNA, a etapa de digestão da membrana celular do *kit* comercial foi substituída pelo protocolo de digestão de coágulo, a saber: 0,09g de coágulo, misturado a 200µL de Digsol (EDTA a 20mM e pH 8.0, cloreto de sódio a 120mM, tris a 50mM e pH 8.0, e água deionizada e autoclavada) e 20µL de proteinase K (20mg/mL), sendo o material incubado a 55 °C por 3 horas (Bruford et al., 1998). Após a digestão, deu-se prosseguimento à extração

¹⁴QIAGEN – Valencia/CA (EUA).

¹⁵Invitrogen™ – ThermoFisher Scientific Inc. – Waltham/MA (USA).

¹⁶Esco Healthcare Pte Ltd – Changi (SG).

¹⁷Sigma-Aldrich® – St. Louis/MO (USA).

¹⁸Biosystems – Curitiba/PR (BR).

¹⁹Biotium, Inc. – Fremont/CA (USA).

²⁰Carestream Health – New Haven/CT (USA).

²¹Ludwig Biotecnologia Ltda. – Alvorada/RS (BR).

²²GE Healthcare – Buckinghamshire (UK).

do DNA com o uso do *kit* comercial (DNeasy® Blood & Tissue Kit¹⁴), seguindo as instruções do fabricante.

Após a visualização do gel, quando não era encontrada uma banda única e/ou a quantidade de DNA era pouca, dificultando a purificação do produto amplificado, outras condutas foram adotadas, a saber: (i) repetição da segunda etapa da Nested-PCR sem diluir o produto da primeira etapa, a fim de aumentar a quantidade de DNA; e (ii) realização de gel preparativo, contendo todo o produto da segunda etapa da Nested PCR, a fim de sacar a banda do gel (quando da visualização de outras bandas que pudessem atrapalhar o sequenciamento). Posteriormente, quando observada uma banda que indicasse boa quantidade de DNA, baseado na intensidade da banda no gel, o material era purificado e enviado para o sequenciamento conforme descrito anteriormente. Estas condutas passaram a ser adotadas após a obtenção de eletroferogramas de baixa qualidade, com picos duplos, a partir de amostras com bandas de baixa intensidade no gel e/ou presença de bandas inespecíficas enviadas ao sequenciamento.

Após a purificação, as amostras foram enviadas para sequenciamento de Sanger (sequenciador Applied Biosystems™ 3730 DNA Analyzer²³) na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS da Fiocruz, de acordo com as instruções da mesma e com o protocolo do *kit* BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing²³.

4.6.1.4 **Identificação Taxonômica de Tripanosomatídeos**

A análise, a edição e a construção de sequências foram realizadas com os *softwares* SeqMan²⁴ e BioEdit v. 7.2²⁵. A identificação das espécies ocorreu pela análise de similaridade das sequências obtidas, com o uso do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), comparando-as com sequências de referência do banco de dados GenBank®, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Benson et al., 2013). Foram adotados os seguintes critérios de definição de espécie: (i) cobertura de 100%; (ii) *e-value* igual a 0.0; (iii) identidade mínima de 99%. O alinhamento das sequências também foi feito com o *software* BioEdit e a construção da árvore filogenética no *software* MEGA X (Kumar et al., 2018), utilizando os métodos de Neighbour-Joining (NJ) (modelo Kimura 2 parâmetros com 1000 *bootstraps*) e de *Maximum Likelihood* (ML), empregando o melhor modelo para cada grupo de

²³Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham/MA (USA).

²⁴DNASTAR®, Inc. – Madison/WI (EUA).

²⁵ Tom Hall – Ibis Therapeutics – Carlsbad/CA (EUA).

sequências, com o menor Critério Bayesiano de Informação (BIC). Os números de acesso ao GenBank® das sequências utilizadas como referência estão dispostas no Anexo I. Quando a análise da árvore filogenética indicou que as sequências obtidas apresentavam uma topologia diferente das sequências dos isolados-tipo, foi obtida a matriz de distância genética com o uso do *software* MEGA X.

Quando o resultado do sequenciamento não garantiu a identificação da espécie de tripanosomatídeo envolvida na infecção, adotou-se como classificação o táxon seguinte, sempre buscando o táxon menos abrangente que pudesse ser identificado pelos métodos e modelos empregados no uso do *software* MEGA X.

4.6.2 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico adotado foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Foram avaliados 149 espécimes de mamíferos (cativos e de vida livre), de acordo com a ordem ou a família do animal, a depender do conjugado utilizado. Para validar a técnica, foram utilizados controles negativos e positivos.

4.6.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada para a detecção de anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi* (Camargo, 1966). A preparação da lâmina com antígeno bruto (célula íntegra) foi realizada com lâminas fornecidas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/Fiocruz (Bio-Manguinhos) e parasitos oriundos da COLTRYP. O antígeno foi preparado a partir de uma mistura de culturas de *T. cruzi* DTUsTcl (I00/BR/00F) e TcII (MHOM/BR/1957/Y), e fixado em todos os poços das lâminas (Rodrigues et al., 2019). Para análise do complexo antígeno-anticorpo foram utilizados os conjugados anticorpo-fluoresceína mais próximos filogeneticamente dos animais examinados, a saber: anti-coelho (Sigma-Aldrich®¹⁷) para os anticorpos intermediários anti-gambás produzidos, utilizado para os marsupiais (Lisboa et al., 2015); anti-cão para os canídeos (Sigma-Aldrich®¹⁷); anti-gato para os felídeos (Sigma-Aldrich®¹⁷); e anti-humano para os primatas (desenvolvido e fornecido por Bio-Manguinhos). Para avaliar as amostras de soro, estas foram diluídas em série, nas proporções de 1:10 até 1:320, com solução PBS (fosfato-salino tamponado com ph 7,2) a 0,15M. Posteriormente à reação entre os conjugados e os antígenos, as lâminas foram analisadas em microscópio com

incidência de luz fluorescente (Axioplan Universal Microscope²⁶). Considerou-se que a reação ocorreu quando a fluorescência estava presente em pelo menos 50% do poço em questão, adotando como valor de corte a diluição de 1:10 para roedores e primatas e de 1:40 para marsupiais e carnívoros (Lisboa et al., 2004; Herrera et al., 2005; Herrera et al., 2011). Quando os resultados indicavam presença de anticorpos até a diluição de 1:320, o soro era novamente examinado, com diluição em série de 1:10 até 1:20.480, a fim de determinar a titulação exata de anticorpos.

Em virtude das possíveis reações cruzadas com antígenos de *Leishmania* spp., também foi feita RIFI utilizando lâminas fixadas com uma mistura de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os conjugados utilizados foram os mesmos e a interpretação dos resultados ocorreu da mesma forma.

Quando a titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* era igual ao ponto de corte, adotou-se o seguinte critério: (i) se a titulação de anticorpos anti-*Leishmania* sp. fosse maior, consideramos como presença de reação cruzada e ausência de infecção por *T. cruzi*; ou (ii) se ambos apresentassem a mesma titulação, a reação foi considerada como indeterminada e o resultado apresentado como inconclusivo.

4.6.2.2 **TR/DPP**

O teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform (TR/DPP®) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina, de Bio-Manguinhos, foi realizado apenas para o soro de canídeos, a fim de corroborar o diagnóstico diferencial de infecção por *Leishmania* sp. e a existência ou não de reação cruzada com os anticorpos anti-*T. cruzi*. Este teste detecta anticorpos contra antígenos recombinantes de *L. infantum*, a partir da combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e a antígenos recombinantes ligados a uma membrana. Os procedimentos para realização deste teste e da interpretação dos resultados foram feitos de acordo com a orientação do fabricante.

4.7 **Análise dos Resultados de Infecção por Tripanosomos**

A taxa das infecções foi determinada pelo número de indivíduos que apresentaram pelo menos um resultado positivo em qualquer teste parasitológico e/ou sorológico. As taxas de infecção por *T. cruzi* e a proporção de cada genótipo de *T.*

²⁶Carl Zeiss Microscopy – Thornwood/NY (USA).

cruzi foram comparadas entre os animais *in situ* e *ex situ*. As taxas dos animais *in situ* foram comparadas também entre eles, de acordo com o sexo e a idade. Já dentre os mamíferos *ex situ*, foi feita a comparação entre os grupos de risco (I a V) e entre os diferentes táxons (ordens, famílias e espécies). Essas análises foram feitas utilizando o teste qui-quadrado de Pearson, adotando-se o nível de significância de 5%.

Além disso, para os mamíferos *ex situ*, foi elaborada uma matriz para representar a rede de interação entre mamíferos e parasitos. Nesta matriz, os mamíferos foram representados nas linhas (i), os parasitos nas colunas (j) e as interações entre elas foram produzidas pelos elementos a_{ij} (Jordano, 1987). Elaborou-se uma matriz ponderada (quantitativa), considerando quantas vezes cada parasito foi diagnosticado infectando um determinado mamífero. A partir dessa matriz foi construída a rede de interações mamíferos-parasitos, com projeção bipartida (*two-mode network*). Esta projeção analisou apenas as interações mamíferos-parasitos, sem considerar as interações mamíferos-mamíferos ou parasitos-parasitos. A rede bipartida foi construída utilizando os pacotes 'bipartite' (Dormann et al., 2008), 'sna' (Butts, 2008) e 'statnet.common' (Krivitsky, 2015) no *software* R (R Development Core Team, 2019). Utilizando como parâmetro a quantidade de registros de cada interação, foi possível identificar interações com "forças" diferentes, pelas arestas de espessuras diferentes: quanto maior o número de interações, maior a espessura das arestas.

4.8 Licenças e Aspectos Éticos

Tanto para os animais cativos quanto para os animais de vida livre, o manejo, a coleta e o processamento das amostras foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz (BIBio/IOC), os critérios aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) (Licença L-050/2016 e Licença Aditiva LA-009/2017) e as normas estabelecidas pela FPZSP.

As autorizações para captura e manejo dos animais e coleta de material biológico foram providenciadas de acordo com a Instrução Normativa (IN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) nº 03/2014 (Autorização para Atividades com Finalidade Científica nº 58262-1), contando também com a aprovação formal do projeto pela FPZSP (Ofício 52/2017/FPZSP/DTC – Projeto de Pesquisa nº423).

5 RESULTADOS

5.1 Mamíferos *ex situ*

Foram avaliados 106 mamíferos pertencentes a seis ordens e 15 famílias. Destes, 57 passaram pelo segundo manejo, totalizando 163 procedimentos de coleta de amostras para este trabalho. No entanto, para quatro indivíduos não foi possível coletar todas as alíquotas necessárias para cada técnica de diagnóstico da infecção por *Trypanosoma* spp., uma vez que o volume de sangue coletado foi dividido também para análises de patologia clínica feitas rotineiramente pela equipe da FPZSP. Assim, priorizou-se o hemocultivo, coletado para todos os espécimes, mas descartado para uma lhama (*Lama glama*) em virtude de contaminação.

As informações gerais dos animais infectados por tripanosomatídeos, bem como as técnicas empregadas que diagnosticaram cada uma das infecções, constam no Anexo II.

5.1.1 Diagnóstico Parasitológico

Realizamos os exames a fresco de sangue de 104 animais e todos apresentaram resultado negativo. Já no exame à fresco de papa leucocitária, realizado para 105 espécimes, três micos-leões-da-cara-dourada (*L. chrysomelas*) (2,8%), apresentaram resultado positivo na primeira coleta (Quadro 6). Apenas para um desses animais foi realizada a segunda coleta, mas o exame à fresco de papa leucocitária não foi realizado e o de sangue foi novamente negativo.

Foi feito o cultivo de sangue de 105 animais, sendo que destes 57 tiveram uma nova coleta. Dos 105 indivíduos, foram obtidas cinco (4,7%) hemoculturas positivas. Destas, três foram positivas apenas na primeira coleta, todas de mico-leões-de-cara-dourada, sendo que dois destes primatas obtiveram diagnóstico positivo no exame à fresco. Os outros dois cultivos com crescimento de parasitos, foram positivos apenas na segunda coleta, a saber: uma do gambá-de-orelha-preta (*D. aurita*) e a outra de ouriço-cacheiro (*S. villosus*). Dos cinco indivíduos com cultivo positivo, três culturas foram estabelecidas, resultando massa parasitária para caracterização molecular. Destes três, foi possível identificar o parasito envolvido na infecção de um mico e de um gambá, sendo ambas por *T. cruzi* DTU TcI (Quadro 6).

Quadro 6. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos dos exames parasitológicos a fresco e dos hemocultivos para diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Grupo	Mamíferos Nome Científico	Resultados Positivos / Indivíduos Avaliados			Total (Grupo)
		Exame à Fresco	Cultivo	Caracterização Molecular	
I	<i>Canis lupus</i>	0/1	0/1	-	25%
	<i>Sphiggurus villosus</i>	0/3	1/3	<i>Trypanosoma</i> sp.	(1/4)
II	Todos os animais do Grupo II	0/23	0/23	-	0/23
III	Todos os animais do Grupo III	0/20	0/20	-	0/20
IV	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	3/18	3/19	<i>T. cruzi</i> DTU TcI (n=1) e CNE (n=2)	7,7% (3/39)
	Demais animais do Grupo IV	0/19	0/20	-	
V	<i>Didelphis aurita</i>	0/1	1/1	<i>T. cruzi</i> DTU TcI	5%
	Demais animais do Grupo V	0/19	0/18	-	(1/20)
Total		3/105	5/105		

CNE: Cultivo não estabelecido.

O diagnóstico molecular em sangue com guanidina-EDTA foi realizado para todos os 106 mamíferos, sendo que 54 animais foram avaliados em dois momentos diferentes. Dos 106 indivíduos, 34 (32%) foram positivos e em 18 (53%) desses foi possível identificar as espécies dos parasitos envolvidos nas infecções. Destes, oito espécimes estão infectados por *T. cruzi* DTU TcI, sendo dois micos com infecção mista (um por *T. cruzi marinkellei* e outro por *T. dionisii*). Além disso, outros oito estão infectados por diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, sendo 10 por *Trypanosoma* sp. e cinco por tripanosomatídeos cujos gêneros não foram identificados (Quadro 7). Dos 34 indivíduos infectados, 17 foram diagnosticados já na primeira coleta, sete apenas na segunda e 10 apresentaram produtos de PCR amplificados nos dois momentos, sendo um deles o mico com infecção mista por *T. dionisii* (primeira coleta) e *T. cruzi* DTU TcI (segunda coleta).

Quadro 7. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos no diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA para detectar a infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Grupo	Mamíferos Nome Científico	Positivos / Avaliados	Caracterização Molecular	Total (Grupo)
I	<i>Canis lupus</i>	<u>1/1</u>	<i>T. cruzi marinkellei</i>	50% (2/4)
	<i>Sphiggurus villosus</i>	<u>1/3</u>	<i>T. cruzi</i> Tcl	
II	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	<u>1/4</u>	<i>Trypanosoma</i> sp.	17,4% (4/23)
	<i>Leopardus pardalis</i>	<u>1/2</u>	<i>T. terrestris</i> -like	
	<i>Pan troglodytes</i>	0/5	-	
	<i>Sapajus apella</i>	<u>2/12</u>	<i>T. cruzi</i> Tcl (n=1) e <i>Trypanosoma</i> sp. (n=1)	
III	<i>Leopardus geoffroyi</i>	<u>7/8</u>	<i>T. rangeli</i> (n=1), <i>T. terrestris</i> -like (n=2), <i>Trypanosoma</i> sp. (n=3) e tripanosomatídeo (n=1)	50% (10/20)
	<i>Leptailurus serval</i>	<u>1/3</u>	<i>T. cruzi</i> Tcl	
	<i>Puma yagouaroundi</i>	<u>2/3</u>	<i>Trypanosoma</i> sp. (n=2)	
	Demais animais do Grupo III	0/6	-	
IV	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	<u>12/19</u>	<i>T. cruzi</i> Tcl (n=3), <i>T. dionisii</i> (n=1), <i>T. cruzi</i> Tcl & <i>T. dionisii</i> (n=1), <i>T. minasense</i> (n=1), <i>T. cruzi marinkellei</i> (n=1), <i>T. janseni</i> (n=1), <i>Trypanosoma</i> sp. (n=3), tripanosomatídeo (n=1)	38,5% (15/39)
	<i>Lycaon pictus</i>	<u>1/2</u>	tripanosomatídeo	
	<i>Panthera leo</i>	<u>1/5</u>	<i>T. terrestris</i> -like	
	<i>Panthera tigris tigris</i>	<u>1/3</u>	<i>T. cruzi</i> Tcl	
	Demais animais grupo IV	0/10	-	
V	<i>Brachyteles arachnoides</i>	<u>2/2</u>	tripanosomatídeos (n=2)	15% (3/20)
	<i>Leopardus tigrinus</i>	<u>1/4</u>	<i>Trypanosoma</i> sp.	
	Demais animais do Grupo V	0/14	-	
Total		34/106		

Os três micos com resultado positivo no exame à fresco obtiveram o resultado positivo também na análise do sangue com guanidina-EDTA. Apenas um deles, cuja infecção era por *T. minasense*, mostrou resultado negativo no hemocultivo. Dos dois micos com resultados positivos em todos os exames parasitológicos, um teve a cultura estabelecida e o outro não. Para o primeiro indivíduo, o parasito identificado a partir do cultivo estabelecido foi *T. cruzi* DTU Tcl, enquanto o diagnóstico molecular feito a partir do sangue com guanidina-EDTA identificou outro parasito (*T. cruzi marinkellei*). Desta forma, foi possível diagnosticar a infecção mista. Já o animal cujo cultivo não foi estabelecido apresentou infecção por *Trypanosoma* sp. na primeira coleta, com eletroferograma sugestivo de infecção mista (Figura 6), e por *T. cruzi* DTU Tcl na segunda coleta. Além disso, um quarto mico, cujo exame a fresco foi negativo e o cultivo da primeira coleta foi positivo, mas não se estabeleceu, apresentou resultado positivo no diagnóstico do sangue com guanidina-EDTA, em ambas coletas, a saber:

T. dionisii na primeira coleta, com eletroferograma indicativo de infecção mista, e *T. cruzi* DTU TcI na segunda coleta.

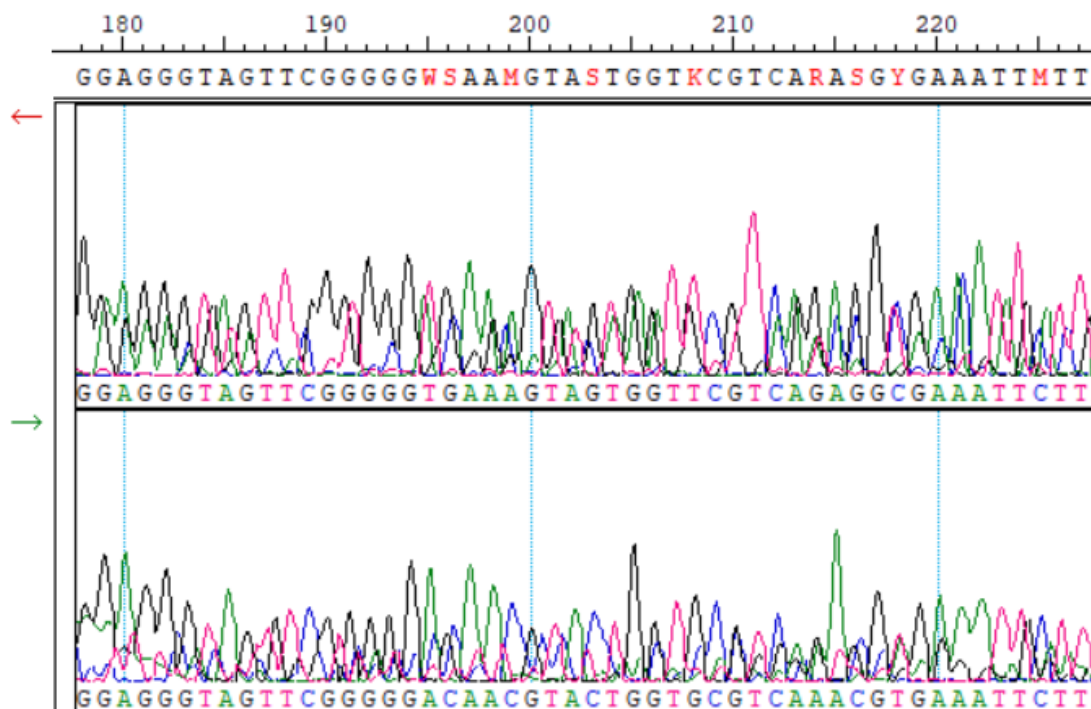


Figura 6. Eletroferograma gerado pelo software SeqMan a partir das sequências de DNA de parasitos presentes na infecção de um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (LBT 9120 – primeira coleta), antes de ser editado, sugerindo presença de infecção mista (picos duplos).

Assim, a análise do sangue com guanidina-EDTA mostrou-se mais sensível do que os demais diagnósticos parasitológicos. Além dos 34 animais com resultado positivo nesta análise, outros 20 indivíduos apresentaram pouca quantidade de DNA no gel de agarose (banda fraca), não sendo possível confirmar sua infecção. Para os outros 52 mamíferos, não houve amplificação de DNA de tripanosomatídeos na PCR (Figura 7).

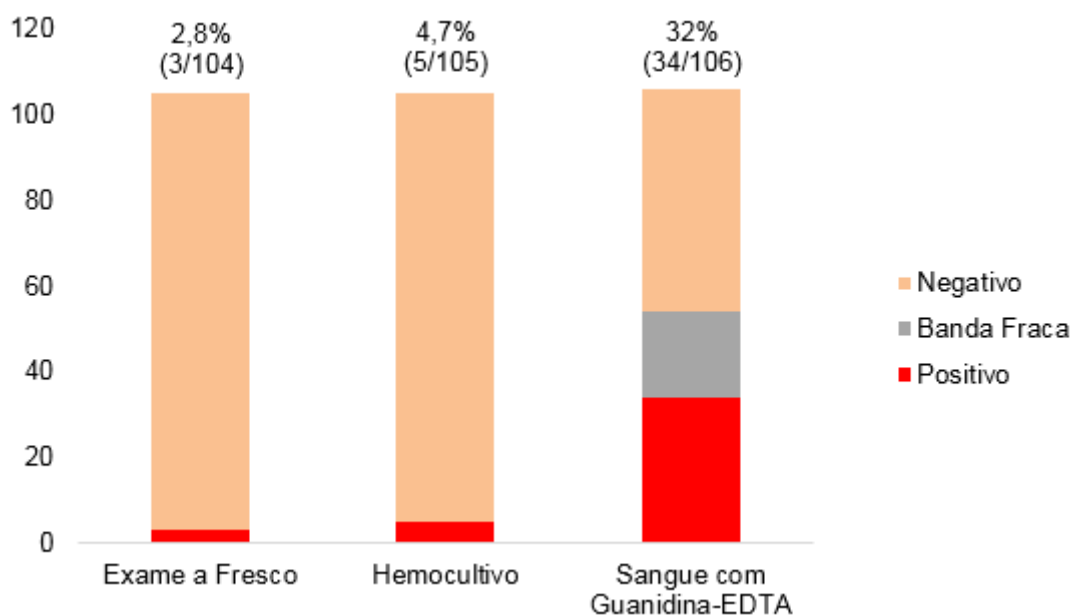


Figura 7. Histograma ilustrando o percentual de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos (Positivo) ou não (Negativo), frente aos diagnósticos parasitológicos: Exame a Fresco (de sangue e de papa leucocitária), Hemocultivo (seguido de caracterização molecular) e diagnóstico molecular a partir de Sangue com Guanidina-EDTA.

Após a identificação das espécies dos parasitos envolvidos nas infecções foram realizadas as análises filogenéticas, a partir das quais foi possível confirmar as infecções de: (i) lobo-europeu (*Canis lupus*) e mico-leão-de-cara-dourada por *T. cruzi marinkellei*; (ii) mico-leão-de-cara-dourada por *T. dionisii*; (iii) mico-leão-de-cara-dourada por *T. janseni*; e (iv) mico-leão-dourada com infecção mista por *T. cruzi* e *T. dionisii* e também por *T. cruzi* e *T. marinkellei* (Figuras 8 e 9). Além disso, para quatro felinos de diferentes espécies (dois *Leopardus geoffroyi*, um *L. pardalis* e um *Panthera leo*) diagnosticou-se infecção por *T. terrestris*, a partir da análise de identidade com as sequências de referência do GenBank®. No entanto, a topologia diferente dos dois isolados-tipo observada na análise filogenética, nos levou a classificar os parasitos envolvidos na infecção destes quatro felinos como *T. terrestris*-like (Figura 10). A matriz de distância genética indicou que não havia diferenças entre as sequências dos dois isolados-tipo de *T. terrestris*, assim como não havia diferenças entre as quatro sequências de *T. terrestris*-like. Já as sequências de *T. terrestris* e de *T. terrestris*-like eram 0,5% diferentes entre si, correspondendo a seis nucleotídeos neste caso.

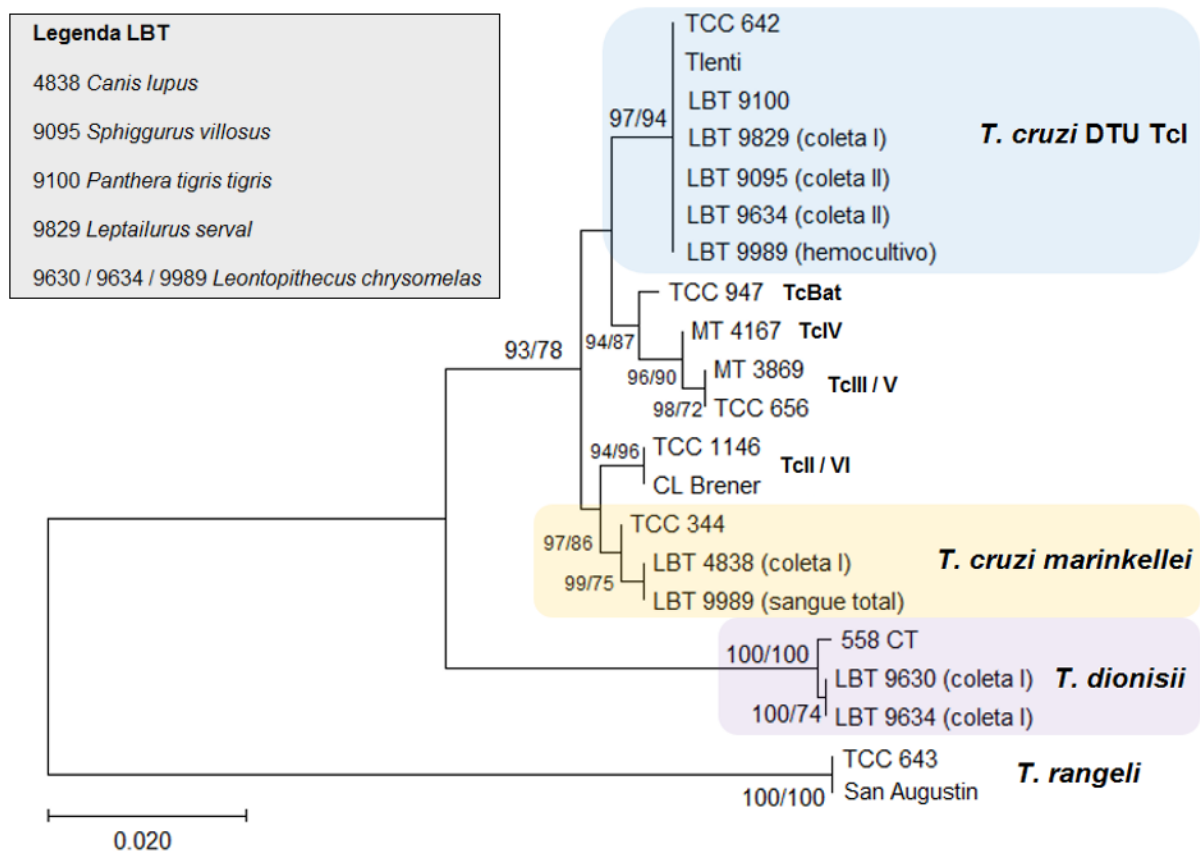


Figura 8. Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA de parasitos do gênero *Trypanosoma*, pertencentes ao clado *T. cruzi*, oriundos de sete mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 21 sequências nucleotídicas na análise, sendo 12 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo 2 parâmetros de Kimura) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*.

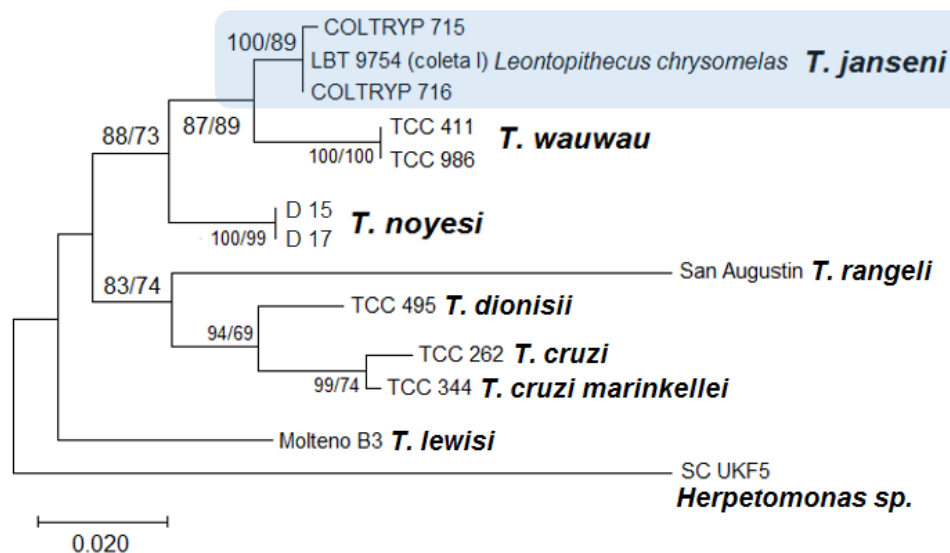


Figura 9. Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA de parasitos da espécie *T. janseni*, pertencentes ao clado *T. cruzi*, oriundos de um mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) cativo, da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 13 sequências nucleotídicas na análise, sendo 12 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo 2 parâmetros de Kimura) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*.

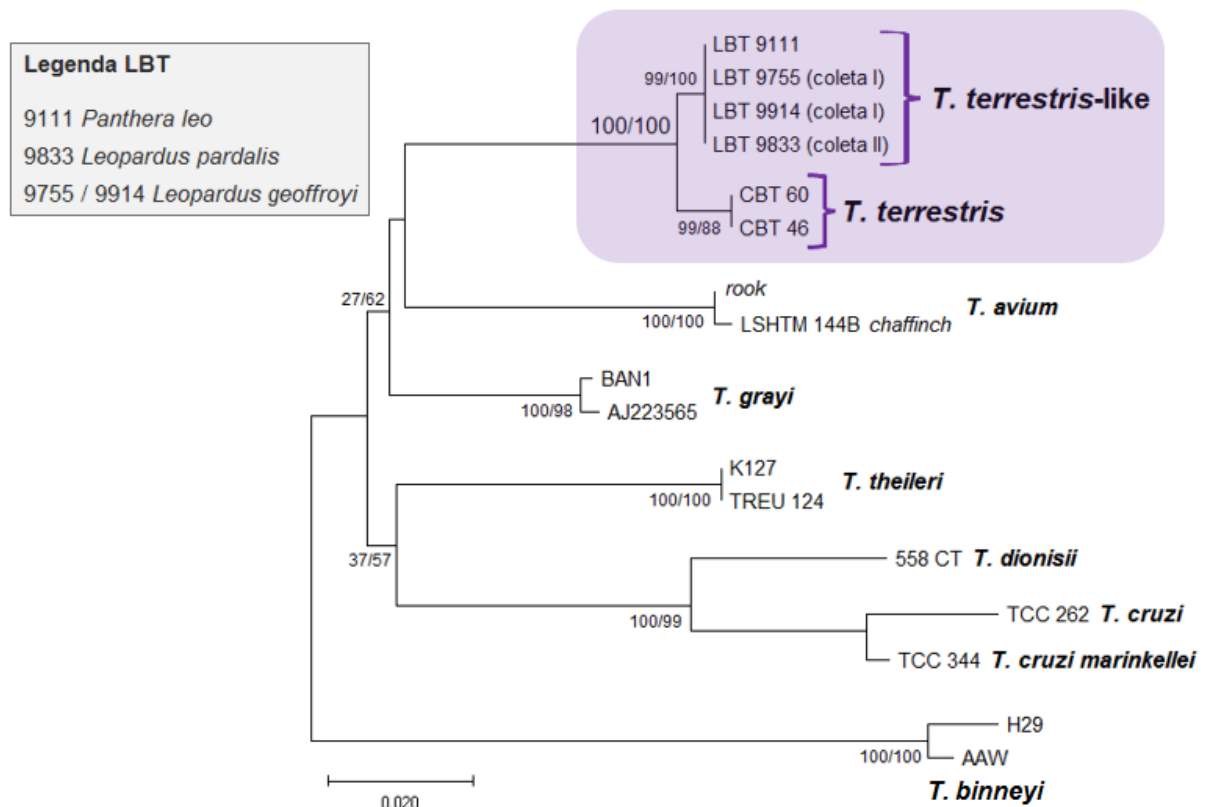


Figura 10. Árvore filogenética reconstruída a partir de seqüências do gene 18S SSU rDNA de parasitos identificados como *T. terrestris*-like, pertencentes ao clado *T. terrestris*, oriundos de quatro felinos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram utilizadas 17 seqüências nucleotídicas na análise, sendo 13 previamente publicadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências, respectivamente, pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) (modelo Kimura 2 parâmetros) e de Máxima Verossimilhança (ML) (modelo 2 parâmetros de Kimura e distribuição Gamma de quatro categorias), ambos derivados de 1000 replicações de *bootstrap*.

5.1.2 Diagnóstico Sorológico

Foi realizada a RIFI com soro de 91 indivíduos, dos quais 29 (31,8%) apresentaram infecção por *T. cruzi*, sendo quatro canídeos (44,5%; 4/9), 13 felinos (41%; 13/32), 11 primatas (22,5%; 11/49) e um marsupial (1/1) (Quadro 8). Vale ressaltar que dos 29 espécimes infectados, quatro demonstraram soroconversão durante o estudo, apresentando resultado positivo apenas na segunda coleta, a saber: dois gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) e dois macacos-prego (*Sapajus apella*). Além disso, dois primatas (um chimpanzé e um macaco-aranha-preto) apresentaram reação indeterminada. Com relação ao DPP, todos os nove canídeos apresentaram resultados negativos.

Quadro 8. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos da reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico de infecção por *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Mamíferos			Resultados Positivos na RIFI / Indivíduos Avaliados	Total (Grupo)
Grupo	Nome Científico	Nome Comum		
I	<i>Canis lupus</i>	lobo-europeu	<u>1/1</u>	100% (1/1)
II	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	lobo-guará	0/4	26% (6/23)
	<i>Leopardus pardalis</i>	jaguaritica	<u>1/2</u>	
	<i>Pan troglodytes</i>	chimpanzé	<u>3/5</u>	
	<i>Sapajus apella</i>	macaco-prego	<u>2/12</u>	
III	<i>Leopardus geoffroyi</i>	gato-do-mato-grande	<u>7/8</u>	44,5% (8/18)
	<i>Leptailurus serval</i>	serval	<u>1/3</u>	
	Demais animais do Grupo III	-	0/7	
	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	mico-leão-de-cara-dourada	<u>6/18</u>	
IV	<i>Lycaon pictus</i>	cão-selvagem-africano	<u>2/2</u>	32,4% (12/37)
	<i>Panthera leo</i>	leão	<u>1/5</u>	
	<i>Panthera tigris tigris</i>	tigre-real-de-bengala	<u>3/3</u>	
	Demais animais grupo IV	-	0/9	
V	<i>Cerdocyon thous</i>	cachorro-do-mato	<u>1/1</u>	16,7% (2/12)
	<i>Didelphis aurita</i>	gambá-de-orelha-preta	<u>1/1</u>	
	Demais animais do Grupo V	-	0/10	
Total			29/91	

5.1.3 Diagnósticos Parasitológico e Sorológico

Dos 29 animais com resultado positivo na RIFI, 20 apresentaram resultado positivo em pelo menos um exame parasitológico, oito apresentaram resultado negativo em todos eles e um apresentou pouca quantidade de DNA no gel de agarose. Por outro lado, 13 animais com resultado positivo em alguma análise parasitológica obtiveram resultado negativo na RIFI. Dos 20 mamíferos positivos tanto em algum diagnóstico parasitológico quanto sorológico, foi possível identificar as espécies de parasitos envolvidos nas infecções de 19 indivíduos, sendo dois os micos que obtiveram resultado positivo em todas as análises parasitológicas (estando ambos infectados por *T. cruzi* DTU Tc1, e um deles infectado também por *T. cruzi marinkellei*) (Quadro 9 e Anexo II).

Quadro 9. Relação entre os resultados das análises parasitológicas e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregados para o diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. e *T. cruzi*, respectivamente, em todos os mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo que foram examinados.

		RIFI				TOTAL Examinados Parasitológico	
		Positiv o	Negativo	Inconclusivo	Não Realizado		
Parasitológico	Negativo	8	30	2	11	51	
	Banda Fraca	1	17	-	2	20	
	Positivo	<i>T. cruzi</i>	6	-	-	2	8
		<i>T. cruzi marinkellei</i>	1	-	-	-	1
		<i>T. cruzi</i> e <i>T. cruzi marinkellei</i>	1	-	-	-	1
		<i>T. dionisii</i>	-	1	-	-	1
		<i>T. cruzi</i> e <i>T. dionisii</i>	1	-	-	-	1
		<i>T. janseni</i>	-	1	-	-	1
		<i>T. minasense</i>	-	1	-	-	1
		<i>T. rangeli</i>	1	-	-	-	1
		<i>T. terrestris-like</i>	4	-	-	-	4
		<i>Trypanosoma</i> sp.	4	7	-	-	11
tripanosomatídeo	2	3	-	-	5		
TOTAL Examinados RIFI		29	60	2	15	106	

Dos 106 indivíduos cativos avaliados, 33% (n=35) obtiveram resultado positivo em algum teste parasitológico e 31,8% (n=29) na RIFI. A partir da análise conjunta e complementar dos diferentes diagnósticos, detectou-se infecção por algum tripanosomatídeo em 41,5% (n=44) dos animais (Figura 11 e Anexo II).

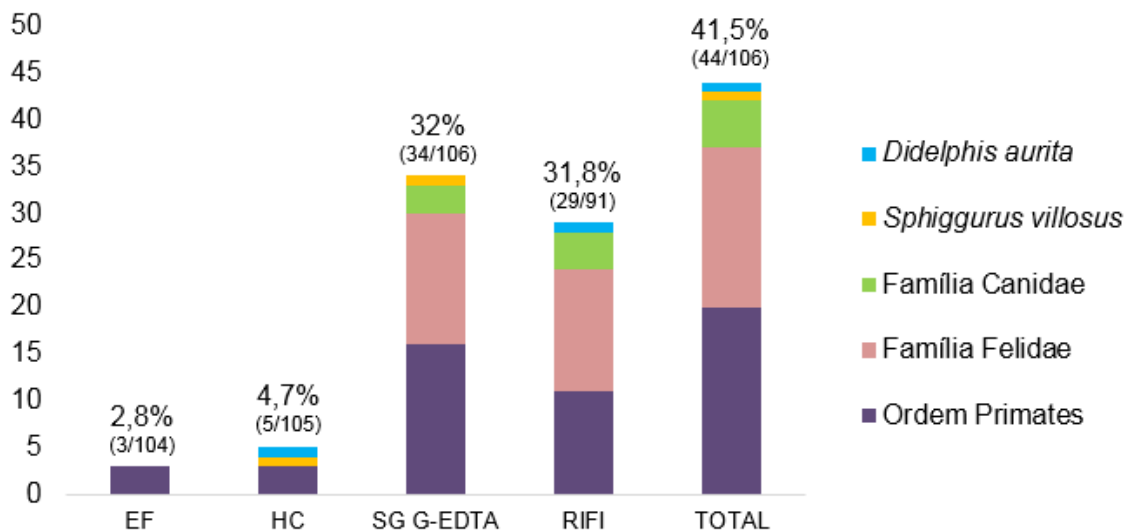


Figura 11. Representação percentual da quantidade de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos, frente aos diagnósticos parasitológicos (EF: exame a fresco; HC: hemocultivo; SG G-EDTA: a partir de sangue com guanidina-EDTA) e por *Trypanosoma cruzi* frente à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), agrupados de acordo com o táxon adotado para a realização da RIFI. A barra *TOTAL* representa todos os indivíduos infectados por algum tripanosomatídeo, frente a todos os métodos de diagnóstico realizados.

Dos 44 mamíferos cativos infectados, consideramos que animais que apresentaram soroconversão estavam infectados por *T. cruzi*, com exceção do gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) infectado por *T. rangeli*. Animais que apresentaram titulação 1:40 frente à infecção por *T. cruzi* na primeira coleta e 1:20 na segunda coleta, tiveram seus diagnósticos validados de acordo com os resultados dos diagnósticos parasitológicos, sendo um gato-do-mato-grande infectado por *Trypanosoma* sp. e o outro por tripanosomatídeo (Anexo II). A partir da consolidação desses resultados em uma matriz quantitativa (Quadro 10) foi possível representar a quantidade de interações entre os mamíferos infectados e as espécies de parasitos envolvidos em cada infecção (Figura 12).

Quadro 10. Matriz quantitativa de interação entre as espécies de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados (hospedeiros) e as espécies de tripanosomatídeos envolvidas na referida infecção (parasitos).

		PARASITO										
		<i>T. cruzi cruzi</i>	<i>T. c. cruzi</i> e <i>T. c. marinkellei</i>	<i>T. cruzi</i> e <i>T. dionisii</i>	<i>T. dionisii</i>	<i>T. janseni</i>	<i>T. minasense</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>T. terrestris</i> -like	<i>Trypanosoma</i> sp. tripanosomatídeo	TOTAL	
MAMÍFEROS CATIVOS	<i>Brachyteles arachnoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
	<i>Canis lupus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Cerdocyon thous</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	<i>Didelphis aurita</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	5	1	1	1	1	1	-	-	1	1	12
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	2	-	-	-	-	-	1	2	2	1	8
	<i>Leopardus pardalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	<i>Leopardus tigrinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	<i>Leptailurus serval</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Lycaon pictus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	<i>Pan troglodytes</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Panthera leo</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	<i>Panthera tigris tigris</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Puma yagouaroundi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
	<i>Sapajus apella</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3
	<i>Sphiggurus villosus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	21	2	1	1	1	1	1	4	8	4	44	

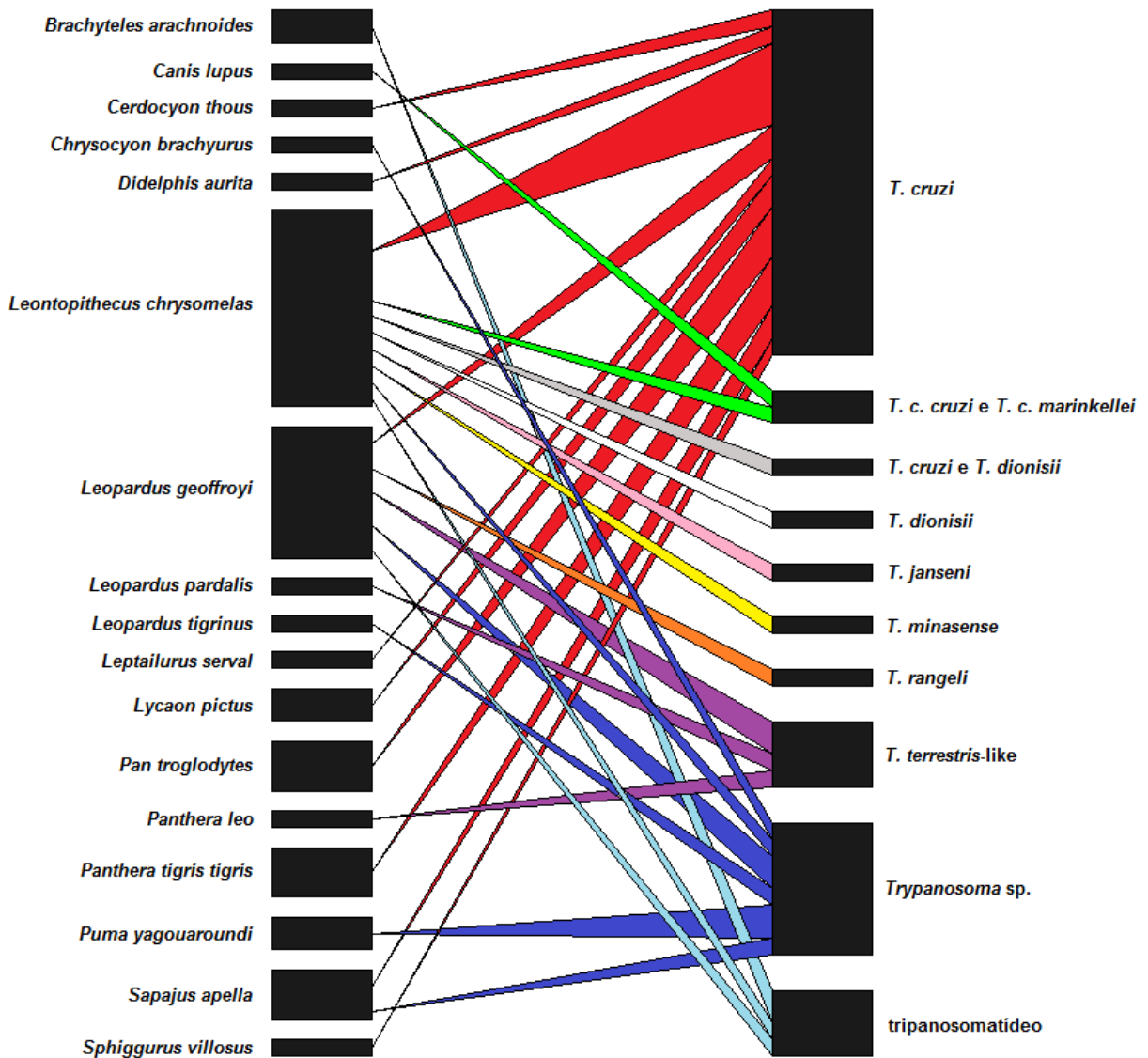


Figura 12. Rede quantitativa de interações entre mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos e os parasitos envolvidos em cada infecção. As barras à esquerda representam as espécies de mamíferos infectados e à direita as espécies de parasitos (ordenadas por ordem alfabética das espécies, seguida pelo gênero *Trypanosoma* e pela família dos tripanosomatídeos). O comprimento das barras ilustra a frequência de interação de cada mamífero e/ou de cada parasito. As ligações representam as interações encontradas e a espessura é proporcional à sua frequência.

A partir dos diagnósticos parasitológicos e sorológicos, foram encontrados 25 animais infectados por *T. cruzi* (taxa de infecção de 23,5%), dos quais 64% (n=16) são comprovadamente autóctones. Todos os grupos de risco dos mamíferos cativos (I a V) apresentaram pelo menos um indivíduo infectado por *T. cruzi*, sendo mais predominante no Grupo IV (mamíferos com recintos adjacentes à área de mata), equivalente a 30,8% dos mamíferos infectados por *T. cruzi* (Quadro 11). Este grupo também foi o mais amostrado. No entanto, não houve diferença estatística entre as

taxas de infecção dos diferentes grupos de risco ($p < 0,05$). Todas as infecções por *T. cruzi* com caracterização molecular tratavam-se do genótipo DTU TcI. Dos táxons de mamíferos avaliados, quando comparadas as taxas de infecção dentre as duas ordens mais avaliadas e infectadas (Primates e Carnívora) e dentre as famílias mais representativas de cada ordem (Callitrichidae e Felidae), nota-se que não há diferença nas taxas de infecção ($p < 0,05$) (Quadro 12).

Quadro 11. Espécies de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectadas por *Trypanosoma cruzi*, de acordo com os grupos de risco (I a V), a partir de diagnósticos parasitológicos e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Grupo	Mamíferos Nome Científico	Parasitológico	RIFI	Parasitológico e RIFI	Total	Infectados por <i>T. cruzi</i> / Examinados por Grupo
I	<i>Sphiggurus villosus</i> (n=3)	1	-	-	1	25% (1/4)
II	<i>Pan troglodytes</i> (n=5)	-	3	-	3	21,7% (5/23)
	<i>Sapajus apella</i> (n=12)	-	1	1	2	
III	<i>Leopardus geoffroyi</i> (n=8)	-	4	-	4	25% (5/20)
	<i>Leptailurus serval</i> (n=3)	-	-	1	1	
IV	<i>Leontopithecus chrysomelas</i> (n=19)	1	2	4	7	30,8% (12/39)
	<i>Lycaon pictus</i> (n=3)	-	2	-	2	
	<i>Panthera tigris tigris</i> (n=3)	-	2	1	3	
V	<i>Cerdocyon thous</i> (n=1)	-	1	-	1	10% (2/20)
	<i>Didelphis aurita</i> (n=1)	-	-	1	1	
Total		2	1	8	2	
			5		5	

Quadro 12. Ordens e famílias de mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo examinados e infectados por *Trypanosoma cruzi*, a partir de diagnósticos parasitológicos e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Ordem	Examinados		N	Infectados <i>T. cruzi</i>
	N	Família		
Carnívora	47	Canidae	9	3 (33,4%)
		Felidae	32	8 (25%)
		Herpestidae	4	0
		Mustelidae	1	0
		Ursidae	1	0
Cetardiodactyla	2	Camelidae	1	0
		Tayassuidae	1	0
Didelphimorphia	1	Didelphidae	1	1 (100%)
Pilosa	2	Myrmecophagidae	2	0
Primates	50	Atelidae	4	0
		Callitrichidae	28	7 (25%)
		Cebidae	13	2 (15,4%)
		Hominidae	5	3 (60%)
Rodentia	4	Erethizontidae	3	1 (33,4%)

N: Quantidade de animais avaliados.

5.2 Mamíferos *in situ*

O sucesso de captura dos pequenos mamíferos de vida livre foi de 7%, sendo todos de uma mesma espécie, totalizando 54 gambás-de-orelha-preta. Além disso, ocorreram oito coletas oportunistas: quatro gambás, dois ouriços, um bugio-ruivo (*Alouatta clamitans*) e um tatu-galinha (*Dasyus novemcinctus*), totalizando 62 animais examinados.

5.2.1 Diagnóstico Parasitológico

No exame a fresco de papa leucocitária, realizado para 60 animais, 16 (26,6%) apresentaram resultado positivo, sendo que nove destes também foram positivos no exame a fresco de sangue, todos gambás. Dos 62 animais amostrados, 21 (33,8%) foram positivos nas hemoculturas, todos gambás, incluindo 12 dos animais com resultado positivo no exame a fresco. Destas 21 culturas, cinco não foram estabelecidas e 16 resultaram em isolados submetidos à caracterização molecular. Destes 16, onze foram caracterizados como *T. cruzi* (oito DTU TcI e três DTU TcII) e cinco foram identificados como *Trypanosoma* sp. As cinco culturas não estabelecidas tiveram os parasitos considerados como tripanosomatídeos. Com relação aos mamíferos das outras espécies, todos apresentaram resultados negativos (Quadro 13).

Quadro 13. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos dos exames parasitológicos a fresco e dos hemocultivos para diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Mamíferos	Resultados Positivos / Indivíduos Avaliados		
	Exame a Fresco	Cultivo	Caracterização Molecular
<i>Alouatta clamitans</i>	0/1	0/1	-
<i>Dasyus novemcinctus</i>	0/1	0/1	-
<i>Didelphis aurita</i>	16/58	21/58	<i>T. cruzi</i> DTU TcI (n=8), <i>T. cruzi</i> DTU TcII (n=3), <i>Trypanosoma</i> sp. (n=5) e CNE (n=5)
<i>Sphiggurus villosus</i>	0/2	0/2	-
Total	16/62	21/62	

CNE: Cultivo não estabelecido.

O diagnóstico molecular em sangue total com guanidina-EDTA foi realizado para 60 espécimes de vida livre, dos quais 24 (40%) foram positivos. Dezenove indivíduos

demonstraram presença de boa quantidade de DNA no gel de agarose a 2%, sendo preparados para a reação de sequenciamento gênico (Figura 13).

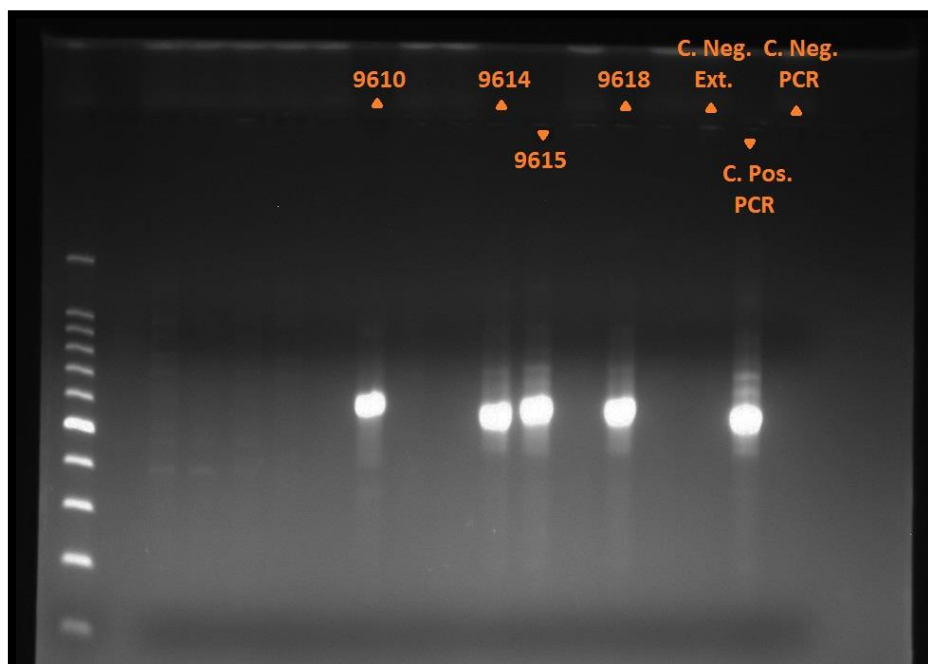


Figura 13. Amostras LBT 9610, 9614, 9615 e 9618 (produtos amplificados de DNA extraído de sangue total com guanidina-EDTA de espécimes de *Didelphis aurita*) como exemplo de bandas em gel de agarose a 2%, próximas da altura de interesse (600 pb), sugerindo quantidade suficiente de DNA para ser purificada e sequenciada, sendo única (9610) ou havendo também bandas inespecíficas (9614, 9615 e 9618).

Foi possível identificar a espécie do parasito envolvido na infecção de 19 animais e o gênero do parasito nas demais cinco infecções, a saber: 16 gambás e um ouriço infectados por *T. cruzi* DTU TcI, um bugio infectado por *T. minasense* e seis gambás por *Trypanosoma* sp. (Quadro 14).

Quadro 14. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados positivos no diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA para detectar a infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Mamíferos		Resultados Positivos / Indivíduos Avaliados	
N	Nome Científico	Sangue com Guanidina-EDTA	Caracterização Molecular
1	<i>Alouatta clamitans</i>	1/1	<i>T. minasense</i>
1	<i>Dasyus novemcinctus</i>	0/1	-
58	<i>Didelphis aurita</i>	<u>22/57</u>	<i>T. cruzi</i> DTU TcI (n=16) e <i>Trypanosoma</i> sp. (n=6)
2	<i>Sphiggurus villosus</i>	1/1	<i>T. cruzi</i> DTU TcI
Total		24/60	

N: Quantidade de animais avaliados.

Dos 24 animais com resultado positivo no diagnóstico molecular a partir de sangue total, 21 foram positivos em outro (s) teste (s) parasitológico (s), sendo 11 no exame a fresco e no hemocultivo, sete apenas no hemocultivo e três apenas no exame a fresco. Quatro animais com resultado negativo na análise molecular de sangue total foram positivos em pelo menos um dos outros métodos empregados (Quadro 15).

Quadro 15. Relação entre os resultados dos diagnósticos parasitológicos (exame a fresco, hemocultivo e diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA) observados para os mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Exame a Fresco e Hemocultivo		Sangue com Guanidina-EDTA	
		Positivo	Negativo
Positivo	Exame a Fresco	3	1
	Hemocultivo	7	2
	Exame a Fresco e Hemocultivo	11	1
Negativo	Exame a Fresco e Hemocultivo	3	32
TOTAL		24	36

5.2.2 Diagnóstico Sorológico

A RIFI foi realizada para 58 mamíferos de vida livre, sendo 57 gambás e um bugio. Destes animais, 38% (n=22, todos gambás) estavam infectados por *T. cruzi*. Dos 22 indivíduos com resultado positivo na RIFI, 17 animais foram positivos também em algum diagnóstico parasitológico, sendo possível identificar as espécies de parasitos envolvidos nas infecções de 10 indivíduos, sendo todas por *T. cruzi*. Cinco indivíduos com resultado positivo na RIFI apresentaram resultado negativo nos exames parasitológicos. Por outro lado, 10 animais com resultado positivo em alguma análise parasitológica, sendo 8 por *T. cruzi*, um por *T. minasense* e um por *Trypanosoma* sp., obtiveram resultado negativo na RIFI (Quadro 16).

Quadro 16. Relação entre os resultados das análises parasitológicas e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregados para o diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp e *T. cruzi*, respectivamente, em mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

		RIFI			TOTAL Parasitológico	
		Positivo	Negativo	Não Realizado		
Parasitológico	Negativo	5	26	3	34	
	Positivo	<i>T. cruzi</i>	10	8	1	28
		<i>T. minasense</i>	-	1	-	
		<i>Trypanosoma</i> sp.	4	1	-	
		triptanosomatídeo	3	-	-	
TOTAL RIFI		22	36	4	62	

5.2.3 Diagnósticos Parasitológico e Sorológico

Os métodos parasitológicos detectaram a infecção em 45,2% (n=28) dos 62 animais avaliados, dos quais um gambá apresentou infecção mista por diferentes genótipos de *T. cruzi*, a saber: DTU TcI (a partir da análise de sangue total) e DTU TcII (a partir de hemocultivo). A partir da análise conjunta e complementar dos diagnósticos parasitológicos e sorológicos, detectou-se infecção por algum tripanosomatídeo em 53,2% (n=33) dos animais (Figura 14).

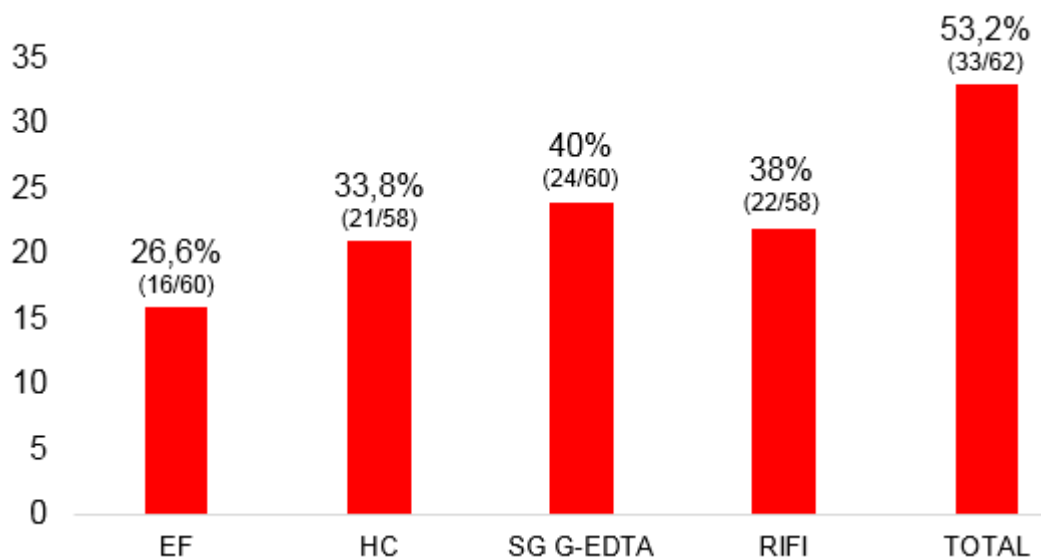


Figura 14. Histograma ilustrando o percentual de mamíferos silvestres de vida livre da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos, frente aos diagnósticos parasitológicos (EF: exame a fresco; HC: hemocultivo, seguido de caracterização molecular para os cultivos estabelecidos; SG G-EDTA: diagnóstico molecular a partir de sangue com guanidina-EDTA), e por *Trypanosoma cruzi*, frente à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A barra TOTAL representa todos os indivíduos infectados por algum tripanosomatídeo, frente a todos os métodos de diagnóstico realizados.

A taxa de infecção por *T. cruzi* dentre os animais de vida livre foi de 50% (31/62), sendo 28 por DTU TcI, dois por DTU TcII e um mista de ambos genótipos. Dos outros dois animais infectados por algum tripanosomatídeo, um bugio apresentou infecção por *T. minasense* e um gambá por *Trypanosoma* sp., com resultado negativo na RIFI.

Dentre os gambás, não houve diferença na proporção de indivíduos infectados de acordo com o sexo do animal, mas houve diferença com relação à idade estimada dos animais, uma vez que os adultos (68%; 17/25) e os jovens (65%; 13/20) estavam mais infectados do que os filhotes (15,4%; n=2/13) ($p < 0,05$). Além disso, dos 31 gambás infectados por algum tripanosomatídeo, 28 foram capturados nas armadilhas, sendo que a maioria dos animais infectados (50%; n=14; $p < 0,05$) foi capturada na

Trilha E, situada mais próxima ao Zoo Safari e à área de mata densa do entorno, onde foi capturado o animal com infecção mista de genótipos, seguido pela Trilha D (25%; n=7).

Dos 168 mamíferos examinados, 106 cativos e 62 de vida livre, a taxa de infecção por *T. cruzi* foi maior dentre os de vida livre (50%) do que dentre os mamíferos cativos (23,5%). Para os animais cativos cujos parasitos foram caracterizados pelas técnicas moleculares, todos *T. cruzi* eram do genótipo DTU TcI, enquanto os mamíferos de vida livre apresentaram três indivíduos com o genótipo DTU TcII, um deles apresentando infecção mista com o outro genótipo.

5.3 Triatomíneos

Foram examinados 11 insetos, todos da espécie *Panstrongylus megistus*, sendo que 10 foram capturados no recinto dos ouriços (*S. villosus*) e um no recinto do cão-selvagem-africano (*L. pictus*).

5.3.1 Diagnóstico Parasitológico

Dos sete insetos que chegaram vivos ao LABTRIP, todos apresentaram tripanosomatídeos flagelados em fezes, além de um oitavo inseto que chegou morto, mas havia sido examinado na FPZSP. Dos sete indivíduos vivos, foram estabelecidas cinco culturas positivas, das quais quatro foram caracterizadas como *T. cruzi* DTU TcI e uma como *Trypanosoma* sp. Já no diagnóstico molecular realizado a partir do tubo digestivo congelado dos triatomíneos, nove dos 11 animais (81,8%) estavam infectados, sendo identificado *T. cruzi* DTU TcI em três dos casos e *T. cruzi* DTU TcI em infecção mista com *T. cruzi marinkellei* em dois insetos (Quadro 17).

Quadro 17. Relação entre o número de indivíduos avaliados e os resultados dos exames parasitológicos diretos, dos cultivos de conteúdo intestinal e de diagnóstico molecular a partir de tubo digestivo congelado para diagnóstico de infecção por *Trypanosoma* spp. em triatomíneos da mata do entorno da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Resultados Positivos/ Amostras Avaliadas		Caracterização Molecular		
Exame a Fresco (n=8)	Cultivo (n=7)	Cultivo (n=7)	Tubo Digestivo Congelado (n=11)	Cultivo + Tubo Digestivo Congelado
8/8	5/7	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl (n=4) <i>Trypanosoma</i> sp. (n=1) CNE (n=2)	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl (n=2) <i>T. cruzi marinkellei</i> (n=2) <i>Trypanosoma</i> sp. (n=5) Negativos (n=2)	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl (n=4) <i>T. cruzi</i> DTU Tcl e <i>T.</i> <i>cruzi marinkellei</i> (n=2) <i>Trypanosoma</i> sp. (n=4) Negativos (n=1)

CNE: cultivo não estabelecido.

Da mesma forma que ocorreu para os mamíferos, aqueles insetos cujos parasitos não foram classificados de acordo com a espécie geralmente apresentavam pouca quantidade de DNA no gel de agarose a 2% (Figura 15).

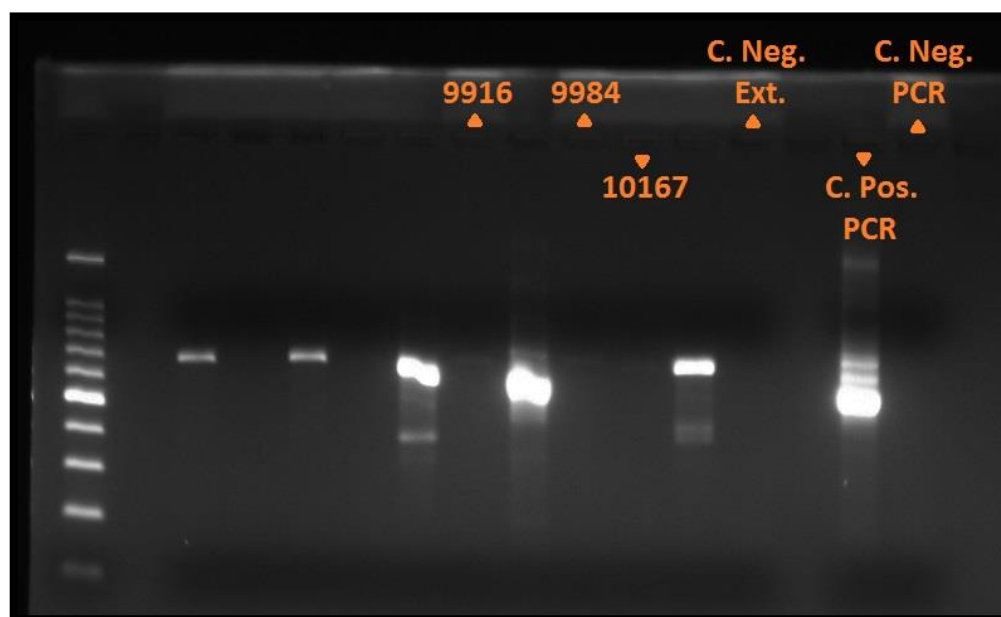


Figura 15. A. Amostras LBT 9916, 9984 e 10167 (produtos amplificados de DNA extraído de tubo digestivo de triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus*) como exemplo de bandas em gel de agarose a 2%, próximas da altura de interesse (600 pb), com pouca quantidade de DNA para ser purificada e sequenciada, mesmo sendo bandas únicas. Os parasitos das três amostras foram classificados como *Trypanosoma* sp.

A taxa de infecção foi de 90,9% (10/11), sendo que o indivíduo que não estava infectado obteve resultado negativo no diagnóstico molecular a partir de tubo

digestivo, mas não foi submetido às demais análises, pois foi recebido morto em etanol absoluto.

5.4 Mamíferos *ex situ* e *in situ* e Triatomíneos

A partir de uma análise espacial foi possível observar a relação entre os locais de captura dos gambás (aqueles capturados em armadilhas dispostas nos transectos lineares), os locais onde os triatomíneos foram encontrados e a disposição dos recintos dos mamíferos cativos. A partir destes dados, foram elaborados dois mapas. O primeiro mostra a disposição dos animais infectados (vertebrados e invertebrados), bem como o parasito envolvido na infecção, a saber: *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, infecções mistas com *T. cruzi*, *Trypanosoma* spp. (englobando os parasitos deste gênero, inclusive as espécies *T. rangeli*, *T. minasense*, *T. dionisii*, *T. janseni*, e *T. terrestris-like*) (Figura 16). O outro mapa ilustra a disposição dos animais infectados e dos animais cativos não-infectados (Figura 17).

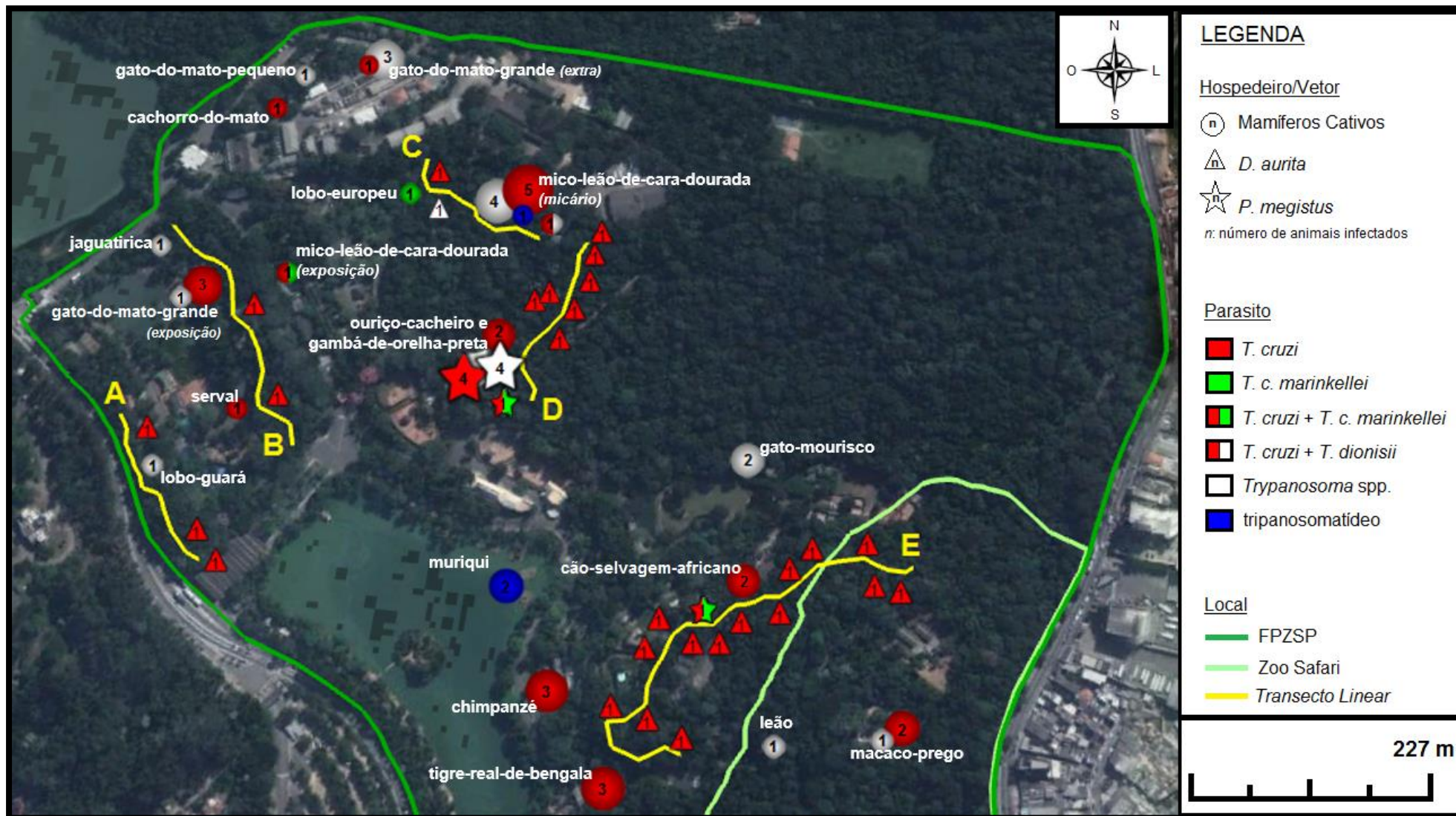


Figura 16. Representação da localização geográfica dos animais (vertebrados e invertebrados) infectados por tripanosomatídeos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Estão representados no mapa: os mamíferos cativos, os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) de vida livre e os triatomíneos (*Panstrongylus megistus*), de acordo com o local em que estavam no momento em que foram examinados. O mapa mostra a proximidade dos animais em relação aos transectos lineares (A a E) utilizados para captura dos pequenos mamíferos de vida livre. *Fonte: Google Earth.*

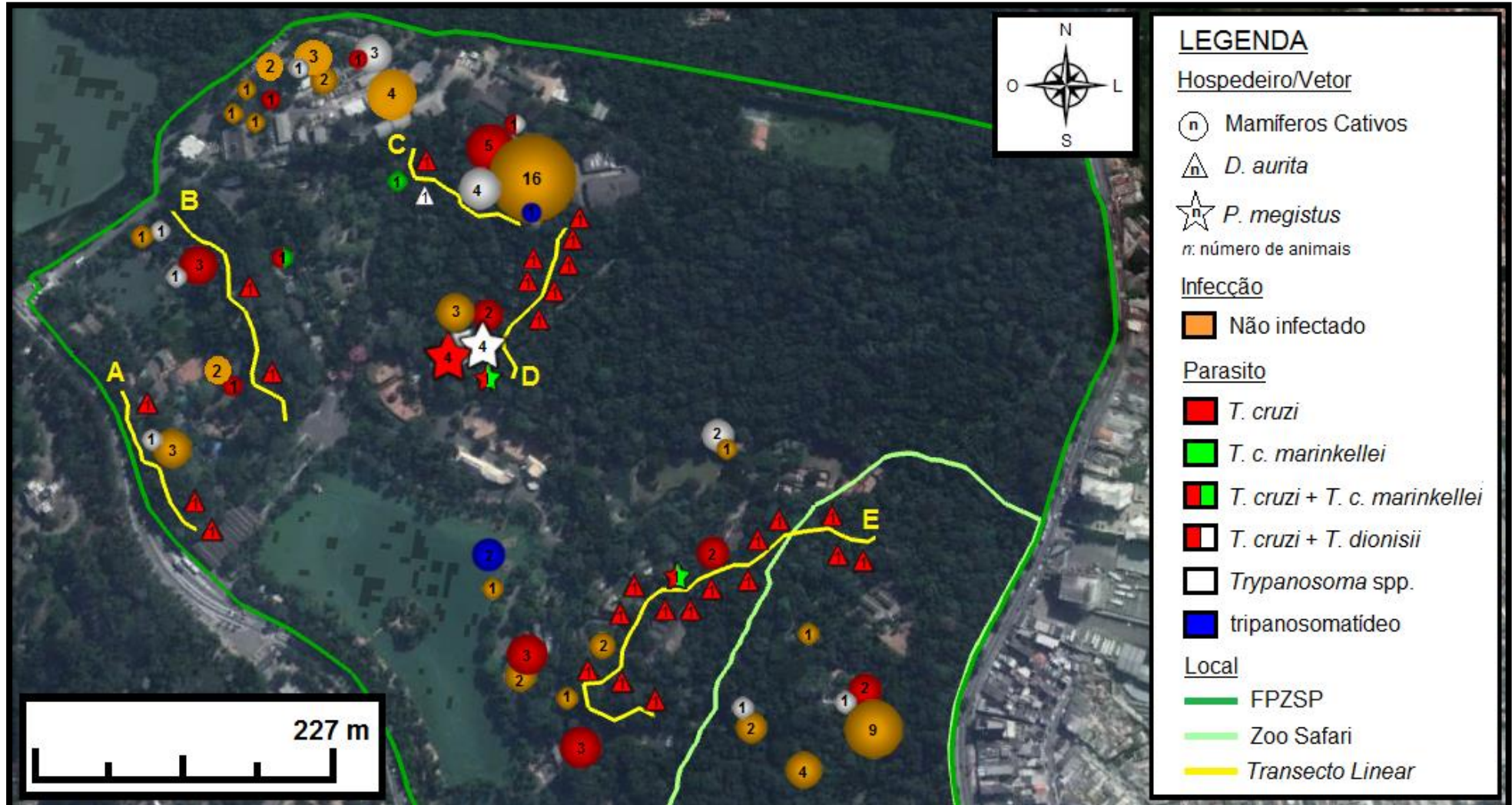


Figura 17. Representação da localização geográfica dos animais (vertebrados e invertebrados) infectados por tripanosomatídeos e dos mamíferos cativos não infectados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Estão representados no mapa: os mamíferos cativos, os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) de vida livre e os triatomíneos (*Panstrongylus megistus*), de acordo com o local em que estavam no momento em que foram examinados. O mapa mostra a proximidade dos animais em relação aos transectos lineares (A a E) utilizados para captura dos pequenos mamíferos de vida livre. *Fonte: Google Earth.*

6 DISCUSSÃO

6.1 Infecção por *T. cruzi* em vertebrados e insetos

Após análise de 106 mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), os resultados demonstraram a infecção por *Trypanosoma cruzi* em 23,5% dos animais, dos quais 64% nasceram na instituição, comprovando a autoctonicidade dos casos e a existência de um ciclo local de transmissão do parasito. Os demais animais infectados nasceram em outros locais (36%), mas é possível que a origem de infecção de alguns deles também seja a FPZSP, dado o ciclo de transmissão observado no local. Um inquérito sorológico utilizando amostras destes animais coletadas em diferentes momentos, desde sua chegada na FPZSP, está previsto para confirmar a autoctonicidade dos casos. Além disso, a maior taxa de infecção por *T. cruzi* nos mamíferos cativos (30,8%) foi diagnosticada entre os animais do Grupo IV, cujos recintos são adjacentes à área de mata. Apesar da diferença numérica na taxa de infecção, não houve diferença estatística entre a taxa de infecção com os demais grupos de risco (Grupos II e III), de forma que todos os fatores de risco considerados neste trabalho possuem o mesmo impacto sobre a transmissão de *T. cruzi*, sendo eles: proximidade com a área de mata, predação de gambás e proximidade com os mamíferos sabidamente infectados por tripanosomatídeos e/ou com os mamíferos que predam gambás.

Os gambás de vida livre frequentam diversas dependências da FPZSP, tendo sido capturados em diferentes pontos, de forma dispersa. No entanto, dos gambás de vida livre infectados oriundos de capturas em armadilhas (28/30), 75% foram capturados nas trilhas situadas no interior das bordas da mata (50% na Trilha E e 25% na Trilha D), a uma distância máxima de 150 m dos recintos de todos os animais cativos inseridos neste trabalho; uma distância extremamente curta para um gambá. Em estudos realizados em áreas fragmentadas, observou-se que os machos de gambás possuem capacidade de deslocamento maior que as fêmeas, tanto para os gambás-de-orelha-preta (*D. aurita*), cuja área de vida pode ser de até 27 km² (Cáceres, 2003), quanto para os gambás-de-orelha-branca (*D. albiventris*), cujo deslocamento diário pode atingir distâncias de até 2,9 km (Almeida et al., 2008).

Todos os triatomíneos (*Panstrongylus megistus*) infectados (90,9% dos examinados) foram encontrados em recintos adjacentes às áreas de mata. Nove dos

10 triatomíneos infectados estavam no interior ou nos arredores do recinto do ouriço infectado. Este recinto fica ≈ 10 m do recinto do gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*), cativo infectado, e a 110 m dos recintos dos micos-leões-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), cuja taxa de infecção foi de 36,8%. O décimo triatomíneo, por sua vez, estava no recinto dos cães-selvagens-africanos (*Lycaon pictus*), também encontrados infectados neste trabalho. Estudos sobre a dispersão dos triatomíneos demonstram que indivíduos da espécie *Triatoma infestans*, por exemplo, podem caminhar por cerca de 40 m (Vazquez-Prokopec et al., 2006), mas que costumam voar para novos ambientes (Minoli e Lazzari, 2006), podendo atingir distâncias de até 1 km do ponto de soltura (Schweigmann et al., 1988 apud Galvão et al., 2001²⁷). No entanto, estas distâncias podem variar de acordo com a espécie do inseto. Um estudo envolvendo a marcação e a recaptura de *Triatoma sordida*, a fim de avaliar sua capacidade de dispersão, partindo de diferentes pontos de soltura e seguindo para estruturas do peridomicílio de uma área rural (galinheiros e estábulos de cavalos), identificou um deslocamento de até 56 m. Baseado nos resultados encontrados, uma análise matemática revelou que a probabilidade de os machos se deslocarem por uma distância 100 m era $\approx 10\%$, sendo ainda menor para fêmeas (Dantas et al., 2018). Há relatos, inclusive, de ninfas de espécies de *Rhodnius* que realizam sua dispersão através do voo de aves, sendo transportadas entre as penas (Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015). No que se refere a *P. megistus*, um experimento demonstrou que esse triatomíneo pode permanecer em voo estacionário (batendo as asas ativamente, não causando um deslocamento em virtude das condições experimentais) por um período superior a uma hora (Canavoso et al., 2003). Ademais, em colônias que surgiram de maneira espontânea em ecótopos artificiais (galinheiros experimentais), dispostos em diferentes ambientes (desde regiões peridomiliares a áreas de mata residual), *P. megistus* apresentou um deslocamento de até 400 m (Forattini et al., 1977).

A partir dos resultados obtidos, observamos que a mata do entorno da FPZSP conta com uma população de triatomíneos e gambás bastante infectados. Ademais, a proximidade entre a mata e os recintos possivelmente facilita o encontro entre os

²⁷ Schweigmann N, Vallvé S, Muscio O, Ghillini M, Alberti A, Wisnivesky-Colli C 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Med Vet Ent* 2: 401-404.

insetos e/ou mamíferos de vida livre infectados e os animais cativos, resultando na infecção de mamíferos do plantel.

6.1.1 Transmissão de *T. cruzi* na FPZSP

A importância da proximidade das áreas de mata e da presença de vetores nos arredores dos recintos foi observada por diversos autores. Já no primeiro caso de infecção por *T. cruzi* descrito em um animal de zoológico, no México, os autores relacionaram o caso aos triatomíneos infectados (*Triatoma longipennis*), encontrados a cerca de 5 m do recinto do urso-polar (*Ursus maritimus*) acometido. Além disso, os autores destacaram que o local mantinha "sua vegetação e condições praticamente naturais". Por fim, sugeriram que em um animal com pelagem tão densa, a infecção pela via contaminativa não deve ter ocorrido, e que o mais provável seria o urso ter se infectado pela ingestão de triatomíneos (Jaime-Andrade et al., 1997). Triatomíneos infectados (*P. megistus*), oriundos do entorno (boa parte composta por mata preservada) e possivelmente ingeridos, parecem ter sido a fonte de infecção de primatas cativos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (Lisboa et al., 2004). *Panstrongylus megistus* foi encontrado também em recintos de primatas infectados do Jardim Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva do Exército Brasileiro, no estado do Amazonas (Lisboa et al., 2006). Já na Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB) os autores afirmam que a proximidade com a mata foi um fator crucial para a transmissão de *T. cruzi* em primatas e outros animais de quatro diferentes ordens (Minuzzi-Souza et al., 2016; Reis, 2018). Isto porque foram encontrados na FJZB triatomíneos (*P. megistus*) infectados em 2016 (88%; 44/50) e em 2018 (25%; 4/16), oriundos da mata adjacente à FJZB, na qual se mantém um ciclo enzoótico de *T. cruzi*, comprovado pela presença gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) de vida livre infectados (Minuzzi-Souza et al., 2016; Reis, 2018). Enquanto a taxa de infecção dos gambás (*D. aurita*) da FPZSP (51,7%; 30/58) foi maior do que dos gambás (*D. albiventris*) do entorno da FJZB (33,3%; 6/18), o potencial infectivo variou pouco: 36,2% dos *D. aurita* da FPZSP apresentaram hemocultivo positivo, enquanto 33,3% dos *D. albiventris* da FJZB tiveram xenodiagnóstico positivo (Gurgel-Gonçalves et al., 2004). Um estudo semelhante ao nosso, realizado com 41 macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) do MD Anderson Cancer Center Michale E. Keeling Center for Comparative Medicine and Research (KCCMR), diagnosticou infecção por *T. cruzi* em 80% (n=41) dos animais cativos, 21% (n=47) dos de vida livre e 16% (n=6) de triatomíneos. O KCCMR fica em uma das regiões mais arborizadas do Texas central,

e os primatas ficavam abrigados em recintos parcialmente abertos. Os autores consideraram a taxa de infecção nos insetos baixa, atribuindo a isso o baixo n amostral (Hodo et al., 2018). No entanto, nós observamos uma elevada taxa de infecção (90,9%) mesmo com um n amostral também baixo ($n=11$). A diferença entre as taxas de infecção observadas entre os dois trabalhos demonstra que o n amostral baixo é um viés nos estudos, não sendo adequado utilizá-lo a fim de explicar os resultados obtidos.

A via oral de transmissão é considerada hoje como a principal via na natureza (Roque et al., 2008). Acreditamos que a predação de pequenos mamíferos e de invertebrados, oriundos da mata, seja um fator relevante para a transmissão de *T. cruzi* para os animais do plantel. Isso porque dos animais cativos alocados no Grupo II, que apresentam histórico de predação de gambás, foi encontrada infecção por *T. cruzi* em duas espécies (taxa de infecção de 20%). Além disso, das 9 espécies de mamíferos potencialmente predadoras presentes nos Grupos III e IV, 4 estavam infectadas (2 de cada grupo). Embora a ausência de relatos de predação de gambás na FPZSP pelos cães, tigres e outros predadores os tenha levado à inclusão nos Grupos III ou IV, estes animais podem preda pequenos e médios vertebrados. Assim, dentre os 25 animais cativos infectados por *T. cruzi*, apenas o ouriço-cacheiro (*Sphiggurus villosus*) não possui potencial predatório. No entanto, isso não impede que o animal leve um inseto vetor à boca, como consequência de comportamentos sensoriais e exploratórios (Felippe e Adania, 2014). Todos os demais animais infectados ($n=24$) podem preda tanto pequenos mamíferos quanto triatomíneos. Além dos hábitos predatórios naturais destes animais, eles habitam recintos que possibilitam o contato com triatomíneos oriundos da mata, em quaisquer circunstâncias, e com mamíferos de vida livre a depender da estrutura do recinto. Chimpanzés (*Pan troglodytes*) e cães-selvagens-africanos possuem recintos com paredes de alvenaria, mas com ausência de cobertura superior, possibilitando a entrada dos mamíferos oriundos da mata. Os chimpanzés possuem hábitos diurnos e dormem presos nosambeamentos, o que dificulta o contato com os gambás, pelos hábitos noturnos desses marsupiais (Rossi et al., 2006). No entanto, quando um gambá de vida livre cai dentro do recinto é impossível que saia sem ajuda dos funcionários da FPZSP. Quando estes marsupiais são encontrados pelos tratadores, são retirados antes que os chimpanzés sejam soltos dosambeamentos, mas quando os gambás estão escondidos e os tratadores não os avistam, acabam por ser predados pelos chimpanzés. Os recintos dos felinos de pequeno e médio porte e do

cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) são completamente gradeados, mas possuem malhas que permitem a entrada de pequenos vertebrados, especialmente quando são flexíveis como os gambás (Nascimento e Horta, 2014). No caso dos felinos, que possuem hábito predominantemente noturno (Cheida et al., 2006) e não dormem cambeados, existe a possibilidade de predação pelas grades quando estas permitem a passagem de seus membros torácicos. Quanto aos grandes felinos, os tigres-reais-de-bengala (*Panthera tigris tigris*) que passam o dia em ilhas circundadas por fossos, durante a noite ficam nos cambeados, podendo ter contato com pequenos mamíferos de vida livre, desde que a presa adentre o recinto através das grades, o que muitas vezes ocorre por conta da disponibilidade de alimento nos recintos.

A infecção por *T. cruzi* decorrente da ingestão de barbeiros infectados é outra importante via que foi considerada neste trabalho. Primeiro porque os animais onívoros, como micos e gambás (Rossi et al., 2006) podem preda barbeiros infectados (Verona e Pissinatti, 2007; Jansen e Roque, 2015). Segundo porque a vida em cativeiro pode favorecer este comportamento, em virtude do maior tempo ocioso quando comparada à vida livre, chamado por alguns autores de "vazio ocupacional" (Felippe e Adania, 2014). Mesmo primatas que sejam mantidos em grupos, apresentando comportamentos normais como a catação²⁸ e a reprodução, e ausência de comportamentos estereotipados²⁹, contam com mais tempo ocioso uma vez que não precisam fugir de predadores, forragear³⁰, tampouco procurar por parceiros ou novos grupos (Felippe e Adania, 2014). Desta forma, a presença de potenciais presas vivas nos recintos pode atuar como enriquecimento alimentar e/ou sensorial, estimulando os comportamentos predatórios e/ou exploratórios dos animais cativos. O comportamento exploratório, por exemplo, é relatado pela FPZSP como sendo mais provável do que o predatório no caso dos chimpanzés, uma vez que há relatos de carcaças de gambás encontradas inteiras em seus recintos.

Outra forma de infecção pela via oral, apesar de menos citada entre os autores, é a ocorrência de brigas envolvendo mordidas entre os animais (Lisboa et al., 2004). O simples contato da mucosa oral com o sangue de um indivíduo infectado com parasitemia poderia infectá-lo, da mesma forma que ocorre durante o abate de animais de vida livre quando não é seguido de predação, comportamento comum

²⁸ Comum entre os primatas, é o ato de procurar e remover ectoparasitos e higienizar os pelos de outro espécime do mesmo grupo, muitas vezes estreitando laços afiliativos entre os indivíduos.

²⁹ Comportamentos repetitivos, do corpo todo ou parte dele, em virtude de estresse que pode ser em um ambiente adverso, como o cativeiro.

³⁰ Buscar por fontes alimentares e/ou hídricas.

entre os chimpanzés da FPZSP, que também apresentam casos eventuais de brigas entre si.

A via vetorial contaminativa também deve ocorrer na FPZSP, embora acreditemos que seja menos frequente do que a via oral. Em seres humanos, a probabilidade de transmissão por esta via, envolvendo triatomíneos do gênero *Triatoma*, é de aproximadamente 6×10^{-4} , considerada baixa (Nouvellet et al., 2013). Esta probabilidade é até 100 vezes maior em gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) (6×10^{-2}), sendo semelhante à probabilidade de infecção pela ingestão de espécimes de *Triatoma infestans* (Rabinovich et al., 2001). Os autores acreditam que estas probabilidades sejam semelhantes porque os gambás lambem o local da picada, podendo ingerir as fezes do inseto ao invés de carregá-las até o local da picada. Em animais de pelagem densa, que pode dificultar o contato das fezes do inseto com o local da picada, a probabilidade de transmissão pela via vetorial contaminativa também tende a ser baixa (Jansen et al., 2015).

Cabe ressaltar que barbeiros não eram encontrados com frequência nas dependências da FPZSP antes do início deste trabalho. Isto porque os técnicos não sabiam como identificar os espécimes, por vezes confundindo os barbeiros com outros insetos ou mesmo ignorando os insetos encontrados. Reconhecer os triatomíneos é importante para auxiliar na vigilância entomológica. Em 2004, o governo estadual de São Paulo restringiu a vigilância à notificação dos insetos pela comunidade, utilizando as redes de ensino e de saúde municipais em ações educativas (Wanderley et al., 2007). Das 9.683 notificações entre 2004 e 2006, a população foi capaz de reconhecer os triatomíneos em 71,3% dos casos. Além disso, o número de notificações aumentou em 2005, após o surto decorrente do consumo de caldo-de-cana contaminado em Navegantes/SC (Wanderley et al., 2007). Observamos que após o fornecimento de material didático pelo LABTRIP, com chaves e pranchas de identificação dos triatomíneos, e após a identificação do primeiro espécime, os funcionários se tornaram mais capacitados e passaram a reconhecer os insetos. Isto reflete a importância de parcerias entre instituições de saúde pública e zoológicos com foco em medidas educativas (Robinette et al, 2017) e o fortalecimento de Postos de Informação de Triatomíneos (PIT), como funciona hoje o Departamento de Análises Clínicas (DPA) da FPZSP. Esta ação possibilitou o encontro de 37 espécimes de *P. megistus* na FPZSP até janeiro de 2019, dos quais os 11 primeiros insetos encontrados compuseram o n amostral deste trabalho. Além disso, entre novembro de 2018 e

janeiro de 2019 (quando já havíamos finalizado as coletas), foram encontrados outros 26 triatomíneos nas proximidades do recinto do ouriço.

Panstrongylus megistus ocorre em grande parte do estado de São Paulo, e entre os anos de 2004 e 2006 foi a segunda espécie mais coletada (n = 2.262) e examinada (n = 1.968), apresentando uma taxa de infecção natural de 9,1%. A espécie mais coletada, *Triatoma sordida*, contou com 29.320 indivíduos examinados, dos quais apenas 0,2% estavam infectados (Wanderley et al., 2007). Este fato se deve, principalmente, aos hábitos de *Triatoma sordida*, que costuma habitar galinheiros (Forattini et al., 1979), sendo as galinhas refratárias à infecção. A elevada taxa de infecção natural em *P. megistus* explica o fato de esta ser a espécie mais importante na transmissão de *T. cruzi* no estado de São Paulo (Silva et al., 2011).

Dos 11 insetos examinados na FPZSP, apenas um obteve resultado negativo em todos os diagnósticos, sendo que este indivíduo era uma ninfa e chegou morto ao LABTRIP, impossibilitando a realização do exame a fresco e do cultivo de conteúdo digestivo. Há poucos trabalhos comparando a infecção entre ninfas e adultos na natureza, sendo mais comum a descrição da fonte alimentar dos insetos ou a comparação entre a taxa de infecção de insetos encontrados no peridomicílio e no domicílio (Teixeira et al., 2001; Pineda et al., 2008; Medina-Torres et al., 2010; Bacigalupo et al., 2012). Dos 10 triatomíneos infectados por *T. cruzi*, seis estavam a uma distância máxima de 10 m do recinto dos ouriços-cacheiros (*Sphiggurus villosus*) e três foram encontrados no interior deste recinto (um dos insetos estava realizando repasto sanguíneo no animal). Possivelmente esse indivíduo só foi encontrado alimentando-se sobre o ouriço porque: (i) cinco insetos já haviam sido encontrados no recinto deste mamífero (quatro deles em um intervalo de 10 dias), deixando os técnicos atentos para a busca de insetos; e (ii) porque este ouriço é um animal dócil, que tolera manipulação diária sem ficar estressado, facilitando o encontro do inseto. Considerando a importância de *P. megistus* no estado de São Paulo e o elevado número de insetos no recinto dos ouriços, realizamos uma busca por colônias no recinto, onde havia troncos e frestas nas quais os insetos poderiam estar abrigados. Todo material do recinto foi removido e não foram encontradas colônias no local, apenas algumas ecsúvias³¹. Desta forma, concluiu-se que os insetos eram, de fato, oriundos da mata do entorno, onde podem se abrigar em diferentes ambientes, tais como ocos de árvores ou ninhos de outros roedores e de gambás (Carcavallo et al.,

³¹ Exoesqueleto deixado no ambiente após processo de ecdise (muda).

1998). Um dos fatores que explica a grande movimentação destes insetos para o interior dos recintos, independentemente da questão da busca por alimento, que pode ser encontrado também na mata, é o período em que foram encontrados. Todos os indivíduos foram encontrados na estação chuvosa, na qual já foi observada uma maior ocorrência de *P. megistus* em ambiente domiciliar no estado de Minas Gerais (Mendes et al., 2008; Maeda, 2011). Este fato possivelmente tem relação com o período de dispersão dos indivíduos adultos desta espécie, que costuma ocorrer entre os meses de outubro e dezembro, ao menos na região sudeste do país (Forattini et al., 1979).

Com relação aos animais de vida livre, foram capturados apenas gambás nas armadilhas, possivelmente em virtude de o PEFI ser, além de um fragmento florestal, um fragmento antropizado. Além disso, existem muitos gatos ferais ao redor da FPZSP, que podem afastar os outros pequenos mamíferos de vida livre presentes no PEFI, como outros marsupiais e roedores, dos recintos do zoológico. Observamos uma influência do período reprodutivo da espécie, de outubro a janeiro (Rossi et al., 2006), na proporção da idade de animais capturados. Indivíduos filhotes foram capturados exclusivamente no verão (estação chuvosa), quando encontramos também um maior número de animais jovens (n=14) se comparado ao inverno (estação seca) (n=6), bem como um número menor de animais adultos (7 animais *versus* 17 no inverno). Já com relação à taxa de infecção por *T. cruzi*, apenas 2 filhotes estavam infectados, possivelmente por terem menos tempo de exposição ao ambiente. A relação entre a taxa de infecção dos animais e a sua idade também foi observada para *Didelphis albiventris* (Schweigmann et al., 1999) e *D. marsupialis* (Telford e Tonn, 1982), sendo menor em filhotes em ambos os casos.

6.1.2 Reservatórios de *T. cruzi* na FPZSP

Diversos autores apontam os marsupiais do gênero *Didelphis* como alguns dos mais importantes reservatórios de *T. cruzi* em diferentes ambientes (Jansen e Roque, 2015). Na FPZSP não parece ser diferente, uma vez que, dentre os animais de vida livre, apenas gambás foram capturados. Nestes animais, a taxa de infecção por *T. cruzi* foi de 51,7% (30/58), sendo 36,2% (21/58) com hemocultivo positivo, reflexo de uma alta parasitemia e, conseqüentemente, elevado potencial infectivo. Nesse cenário e levando em consideração o conceito de reservatório como um sistema ecológico formado pelas espécies que mantém o parasito no local de estudo, em um determinado período de tempo (Jansen et al., 2015), podemos afirmar que os gambás *D. aurita* são reservatórios de *T. cruzi* nas áreas do entorno da FPZSP. No que se

refere aos roedores, apesar de o grupo apresentar um papel secundário como reservatório na natureza, o cenário pode ser diferente a depender da espécie e/ou do bioma. *Rattus rattus* na Caatinga, por exemplo, demonstrou potencial infectivo em 21% dos animais estudados (Jansen et al., 2018). Dentre o heterogêneo grupo dos roedores, temos os ouriços, que apresentaram características semelhantes às aquelas encontradas em potenciais reservatórios (Jansen e Roque, 2015), como a adaptação a diferentes nichos ecológicos, desde o nível do mar a 900 m de altitude (Voss, 2015), e a ampla distribuição (do estado do ES até RS, incluindo MG) (Oliveira e Bonvicino, 2006; Voss, 2015). Porém, até finalizarmos este estudo, apenas 10 ouriços haviam sido estudados no Brasil frente a infecção por *T. cruzi*, incluindo diferentes gêneros e/ou espécies: sete *Coendou prehensilis* (seis do bioma Amazônia e um no bioma Cerrado), um *Coendou* sp. (do bioma Mata Atlântica), um *Sphiggurus villosus* (do bioma Mata Atlântica) e um *Sphiggurus* sp. (do bioma Cerrado), dos quais seis (60%; 6/10) exemplares de *C. prehensilis* estavam infectados (Jansen et al., 2018; Reis, 2018). Além disso, há descrição de *Coendou insidiosus* (estado de São Paulo) e *Coendou* spp. (estado do Pará) infectados por flagelados semelhantes ao *T. cruzi* (Siqueira, 1967; Lainson et al., 1979), sendo que no Pará 16% dos 25 espécimes do gênero *Coendou* avaliados demonstraram presença de potencial infectivo (Lainson et al., 1979). Nosso trabalho contribuiu com a avaliação de mais cinco indivíduos de *S. villosus* (dois cativos e três de vida livre), dos quais dois (40%) estavam infectados. Se somarmos estes cinco ouriços examinados com os outros 10 avaliados no Brasil até o momento, temos uma taxa de infecção por *T. cruzi* de 53,3% (8/15) em ouriços brasileiros. Apesar de ser uma alta taxa de infecção, o *n* amostral ainda é baixo. Dos animais infectados da FPZSP, um era de vida livre (vindo do PEFI e atendido na FPZSP em 2017) e um era cativo (LBT 9095, oriundo do PEFI e incorporado ao plantel em 2008). Um terceiro ouriço (LBT 9096), também cativo (oriundo do PEFI e incorporado ao plantel em 2012), veio à óbito em 2017, entre a primeira e a segunda coleta. Os resultados dos diagnósticos realizados com as amostras da primeira coleta foram negativos, mas no exame histopatológico foram encontrados parasitos flagelados no baço (intra e extracelular) e no citoplasma de histiócitos pulmonares. Este animal (LBT 9096) dividia recinto com o indivíduo cativo infectado (LBT 9095). O ouriço LBT 9095 apresenta tripanosomatídeos flagelados no sangue desde 2016 e sua infecção se comporta de forma semelhante à descrita para os potenciais reservatórios, com potencial infectivo em diferentes momentos, viabilizando inclusive o cultivo e o isolamento de parasitos, além de ser fonte alimentar para os triatomíneos

da mata, como observado. Um aspecto exclusivo desta espécie, que não é necessariamente atrativo para os insetos, é que a pelagem dos ouriços pode facilitar o repasto sanguíneo. Composta por uma mistura de pelos-guarda aculeiformes cilíndricos (conhecidos como espinhos), que podem dificultar a remoção dos insetos, e sobrepelos finos e longos (Oliveira e Bonvicino, 2006), a pelagem recobre pouco a superfície cutânea do ouriço, facilitando o contato das fezes com o local da picada. Além disso, a metade distal da cauda do animal não possui pelos, e na metade proximal os pelos presentes são curtos. Apesar de a via contaminativa de transmissão ser a mais provável para esta espécie, em virtude de não possuírem hábitos insetívoros em sua dieta (Voss, 2015), o comportamento exploratório presente em animais cativos pode fazer com que os animais coloquem os insetos na boca e até mesmo mordam. Ademais, ambos possuem hábitos noturnos, o que facilitaria este comportamento por parte dos ouriços. É importante que seja feito o acompanhamento dos ouriços cativos, a fim de detectar os diferentes momentos de parasitemia e a captura de outros vetores no recinto e arredores, visando compreender melhor o padrão de infecção na espécie. Assim, estes roedores podem se apresentar como potenciais reservatórios na natureza, como parece ser o papel exercido por eles na FPZSP.

6.1.3 *Trypanosoma cruzi* e as Ordens de Mamíferos Infectados na FPZSP

Quando comparamos o número de animais infectados por *T. cruzi* dentre as ordens dos animais cativos, as ordens Primates (n=12; taxa de infecção de 24%) e Carnívora (n=11; taxa de infecção de 23,5%) contam com mais animais infectados. De todos os trabalhos brasileiros realizados com mamíferos em cativeiros, apenas 2 trabalhos anteriores ao nosso abordaram ordens que não apenas a ordem Primates, sendo elas: Carnívora, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Cetartiodactyla, Perissodactyla e Rodentia. No primeiro destes trabalhos, dentre os animais de três diferentes instituições de São Paulo, apenas cachorros-do-mato estavam infectados (Zetun et al., 2014). No segundo estudo, assim como em nosso trabalho, muitos dos animais cativos infectados na Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB) eram das ordens Primates (n=17; taxa de infecção de 60,7%) e Carnívora (n=25; taxa de infecção de 89,3%) (Reis, 2018). Já com relação às ordens dos mamíferos de vida livre, um trabalho do nosso grupo avaliou em maior quantidade as ordens Rodentia e Didelphimorphia, seguidas por Primates, Carnívora, das quais apenas a ordem Rodentia apresentou baixo potencial infectivo (Jansen et al., 2018). Mesmo dentre as

ordens com mais indivíduos analisados, como os carnívoros ($n > 500$) e os roedores ($n > 3.500$), as espécies de maior porte foram pouco representadas, contando apenas com 2 suçuaranas (*Puma concolor*) e 25 roedores com peso superior a 1 kg. Dois fatores que explicam a subamostragem de determinadas espécies em vida livre são o custo das expedições e a dificuldade de encontrar, capturar e manejar certas espécies (Jansen et al., 2015), o que pode em parte ser perpassado com o estudo de animais em cativeiro. Um exemplo em nosso trabalho é que observamos, pela primeira vez, a infecção por *T. cruzi* em gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), com uma taxa de infecção de 50% (4/8), enquanto os outros 50% estavam infectados por outros tripanosomatídeos. Outro exemplo da colaboração dos estudos em animais cativos tem relação com a variação da soroprevalência observada entre diferentes espécies de micos. Em vida livre, micos-leões-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) mostraram-se mais infectados do que micos-leões-dourados (*L. rosalia*) (Monteiro et al., 2006). Na FPZSP a soroprevalência dos micos-leões-de-cara-dourada (*L. chrysomelas*) foi de 31,5% (sendo que para um indivíduo sabidamente infectado por *T. cruzi*, a partir do diagnóstico molecular, não havia soro para realizarmos a RIFI). Enquanto isso, nenhum dos micos-leões-pretos (*L. chrysopygus*) apresentou qualquer indício de infecção por *T. cruzi*. Monteiro e colaboradores (2006) acreditam que a diferença entre as espécies ocorreu em virtude do contato que cada espécie possuía com triatomíneos, uma vez que *L. chrysomelas* forrageia mais em palmeiras. No entanto, na FPZSP os animais passam pelo mesmo manejo e habitam a mesma estrutura de recintos, de modo que ambas espécies possuem a mesma possibilidade de contato com os insetos. Desta forma, acreditamos que possa haver um fator (ou um conjunto de fatores) espécie-específico e ainda desconhecido que favoreça: (i) a infecção propriamente dita por *T. cruzi* em *L. chrysomelas*; e/ou (ii) a elevada parasitemia usualmente observada nesta espécie. Corroborando estes dados, apesar do baixo n amostral, de 6 *L. chrysomelas* avaliados na FJZB, 5 estavam infectados; ao passo que o único exemplar de *L. rosalia* avaliado obteve resultado negativo (Reis, 2018).

Um dos fatores que dificultam a avaliação do potencial infectivo dos mamíferos silvestres, por exemplo, é a necessidade de acompanhamento por longos períodos, seja em infecções experimentais ou naturais. No entanto, as condições em laboratório não mimetizam as condições da natureza (Jansen et al., 2018). Diante desse aspecto, animais silvestres cativos podem representar infecções naturais de forma mais fidedigna do que os animais de laboratório. Isto porque quando estão inseridos em um

ambiente natural, estão suscetíveis a fatores ambientais e interações ecológicas mais semelhantes às encontradas na natureza do que animais de laboratório. Além disso, mamíferos cativos podem ser manipulados diversas vezes e de forma programada, de acordo com os intervalos de interesse. Animais de vida livre, por outro lado, são recapturados com frequência apenas quando inseridos em programas de conservação. Uma vez que o Brasil conta com 106 zoológicos distribuídos por todo território nacional, além dos Centros de Triagem de Animais Silvestres e/ou Centros de Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS / CRAS), criadouros conservacionistas, dentre outras instituições mantenedoras de mamíferos silvestres, estando muitas delas inseridas em áreas de mata, estes animais podem ser bons modelos para estudo de relações de parasitismo e avaliação de medidas de prevenção e controle.

6.2 Infecção por *Trypanosoma* spp. em vertebrados e insetos

A diversidade de espécies do gênero *Trypanosoma* encontrada na FPZSP sugere que a manutenção de uma grande diversidade de mamíferos cativos favorece a existência da diversidade de parasitos desta família. Dos mamíferos infectados por tripanosomatídeos no plantel, 43,2% apresentaram parasitos diferentes de *T. cruzi*, distribuídos em ao menos outras seis espécies do gênero *Trypanosoma*. Acreditamos que essa riqueza de parasitos ocorra em virtude da grande diversidade de mamíferos (451 indivíduos de 75 espécies diferentes) mantidos na FPZSP. A partir da hipótese da heterogeneidade do *habitat* (Hechinger e Lafferty, 2005; Johnson et al., 2015), por exemplo, considera-se que quanto maior a disponibilidade de recursos (oriunda da diversidade de hospedeiros), maior a gama de nichos ecológicos disponíveis aos parasitos, diminuindo a competição interespecífica e possibilitando a existência concomitante de diferentes espécies (Johnson et al., 2016). Isso porque a maior heterogeneidade do habitat possibilita a colonização por espécies de parasitos e hospedeiros, com características ecológicas distintas. Porém, apesar de haver uma correlação positiva entre a diversidade de hospedeiros e parasitos (Kamiya et al., 2014), os mecanismos ecológicos que guiam esta relação ainda não foram completamente elucidados e compreendidos (Johnson et al., 2016), podendo haver diversos fatores relacionados. Um levantamento feito a partir de 38 estudos sobre a relação entre a diversidade de hospedeiros e parasitos demonstrou haver pouca interferência do tamanho da área nesta relação (Kamiya et al., 2014). Neste sentido,

a existência de uma riqueza de hospedeiros e parasitos na FPZSP corrobora estes estudos, uma vez que a área ocupada pelos hospedeiros da FPZSP não é variável. No entanto, até o presente momento, o único estudo realizado com diversas espécies de mamíferos cativos buscou a infecção apenas por *T. cruzi* (Reis, 2018), não sendo possível avaliar se a diversidade de mamíferos também refletiria uma diversidade de parasitos do gênero *Trypanosoma*.

Outro fator que parece colaborar com o aumento da riqueza de parasitos é a "oportunidade de colonização", em virtude da proximidade do hospedeiro à fonte de infecção (Kamiya et al., 2014) e/ou do crescimento populacional do hospedeiro (Johnson et al., 2013). Considerando a inserção da FPZSP no ambiente natural (PEFI), o confinamento dos mamíferos cativos e ainda animais de vida livre como "fontes de infecção", podemos assumir que os hospedeiros da FPZSP apresentam oportunidades favoráveis à colonização, mesmo que não haja grande densidade populacional dos animais cativos. Neste sentido, cabe ressaltar que insetos vetores "facilitam" o encontro entre hospedeiros e parasitos, mesmo em situações de baixa densidade populacional (Halliday et al., 2017). Assim, *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos descritos em vetores alcançam novos hospedeiros mesmo em áreas com baixa densidade populacional, como a FPZSP.

6.2.1 *Trypanosoma cruzi marinkellei*

Trypanosoma cruzi marinkellei é uma subespécie de *T. cruzi* que não é capaz de infectar animais de laboratório (Baker et al., 1978). Pouco estudado, tem sua transmissão vetorial comprovada apenas entre os barbeiros do gênero *Cavernicola* (Marinkelle, 1982; Ramírez et al., 2014), mas pode infectar barbeiros do gênero *Rhodnius* quando estes são utilizados em xenodiagnóstico (García et al., 2012) e foi recentemente encontrado em *Triatoma vitticeps* (Dario et al., 2017). Em nosso trabalho, diagnosticamos pela primeira vez a infecção em dois exemplares de *Panstrongylus megistus*. Considerado como parasito exclusivo de morcegos (Acosta et al., 2014), foi encontrado em nosso estudo infectando mamíferos não quirópteros pela primeira vez, a saber: um canídeo (lobo-europeu) e um primata não-humano (mico-leão-de-cara-dourada), estando neste animal em uma infecção concomitante a *T. cruzi* DTU TcI. O mico habita recintos a poucos metros de distância do recinto dos ouriços, onde a maior parte dos insetos foi encontrada. Este animal provavelmente se infectou através da predação dos triatomíneos, uma vez que, os recintos pelos quais

já passou o mico infectado não são facilmente acessados por morcegos, mas o são por triatomíneos.

O caso do lobo-europeu da FPZSP merece destaque. Este espécime foi um dos primeiros casos autóctones de infecção por um tripanosomatídeo na FPZSP, diagnosticado em 2013 pelo LABTRIP. Na ocasião, o diagnóstico foi realizado por RIFI (titulação 1:5120) e confirmado pelo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), considerando-se, portanto, infecção por *T. cruzi*. Como o animal costumava predar gambás, sendo inclusive alocado no Grupo I deste estudo, acreditávamos que a via oral de transmissão era a mais provável neste caso. Em 2018 a titulação na RIFI permanecia alta ($1 \geq 320$) e a sequência nucleotídica obtida apresentou identidade de 99% com *T. cruzi marinkellei* e 97% com *T. cruzi* (DTU TcIV). O diagnóstico molecular foi repetido utilizando como alvo o gene gGAPDH (codificador da enzima glicossômica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), a fim de confirmar a identificação do parasito, mas não obtivemos sequência de qualidade que permitisse isso (dados não mostrados). Assim, a confirmação da infecção por *T. cruzi marinkellei* ocorreu a partir da análise da árvore filogenética. Após o resultado do diagnóstico molecular, consideramos duas hipóteses para os resultados dos inquéritos sorológicos: (i) infecção mista com *T. cruzi*, sendo esta hipótese bastante provável em virtude do histórico de predação de gambás e também de ouriços de vida livre; ou (ii) reação cruzada, por se tratar de subespécie de *T. cruzi*. Por haver vetores infectados com este parasito na FPZSP, o animal pode ter sido infectado por *T. cruzi marinkellei* pela via vetorial contaminativa. Além disso, apesar de remota, existe a possibilidade de o lobo ter predado ou ter tido acesso a carcaças de morcegos, uma vez que o recinto onde o animal passou boa parte da sua vida não possuía cobertura superior, contava com árvores em seu interior e estava na borda da mata. O fato de o lobo passar a noite solto no recinto e apresentar hábitos noturnos (Smith, 2002) facilita o encontro e a predação de barbeiros e morcegos. Apesar dos poucos estudos e da ausência de relatos sobre alterações clínicas causadas por *T. cruzi marinkellei*, nosso grupo acredita que sendo uma subespécie de *T. cruzi* e podendo diferenciar-se em formas amastigotas replicativas, ao menos em morcegos (Marinkelle, 1982), possa provocar alterações similares. Algumas das alterações observadas em primatas humanos e não-humanos infectados por *T. cruzi* (Dias e Coura, 1997; Monteiro et al., 2006; Guedes et al., 2012), foram encontradas no histórico do lobo, a saber: (i) bradicardia e arritmia; (ii) cardiomegalia (em mediastino e átrio), com coração deslocado para direita; (iii) alterações eletrocardiográficas (bloqueio do ramo direito sem síncope); e

(iv) sopro. Ademais, trabalhos demonstram que cães domésticos (*Canis familiaris*), que são do mesmo gênero que os lobos-europeus, quando infectados por *T. cruzi* desenvolvem alterações como: cardiomegalia, miocardite, desordens de condução no miocárdio e perda de apetite (Barbabosa-Pliego et al., 2009; Pavarini et al., 2009). Além disso, cães na fase aguda da infecção podem apresentar letargia, anemia, linfadenomegalia (Guedes et al., 2012), hepato e esplenomegalia (Pavarini et al., 2009). As alterações diagnosticadas no lobo podem ser fruto da infecção por *T. c. marinkellei* ou de uma infecção mista por *T. cruzi*, como sugerido pela titulação alta do animal e do histórico de predação dos mamíferos de vida livre. Outro fator que corrobora a possibilidade de infecção neste animal por *T. cruzi*, concomitantemente ao *T. cruzi marinkellei*, é que seus pais, eram casos autóctones de infecção por *T. cruzi*.

6.2.2 *Trypanosoma dionisii*

Considerada até pouco tempo como restrita a morcegos (Cavazzana et al., 2010), mas que vem sendo cada vez mais diagnosticada em outros mamíferos é *T. dionisii*. Este parasito já foi encontrado no marsupial *Monodelphis americana* e no tecido cardíaco de um ser humano (Dario et al., 2016; Dario et al, 2017). Descrevemos pela primeira vez a infecção de um primata não-humano (mico-leão-de-cara-dourada) infectado por *T. dionisii*. Quando foi detectado em um humano, *T. dionisii* apresentava infecção mista com *T. cruzi* (Dario et al., 2016). O primata não-humano da FPZSP infectado por *T. dionisii* também apresentava coinfeção com *T. cruzi*, sugerindo que este pode ser um evento mais comum em primatas do que o observado até o momento. Apesar de a infecção por *T. cruzi* só ter sido confirmada na segunda coleta, a partir de diagnóstico molecular, a alta titulação na RIFI na primeira coleta (1:80) já sugeria a presença de *T. cruzi* desde o primeiro momento. Por outro lado, o eletroferograma da infecção por *T. dionisii* apresentava picos bem definidos, o que nos faz pensar em uma segunda possibilidade. O animal pode ter tido uma elevada produção de anticorpos frente à infecção por *T. dionisii* (1:80) em um primeiro momento, seguida de um declínio (1:20). Esta queda na titulação pode ter acontecido devido: (i) a um não estabelecimento da infecção; ou (ii) às relações hospedeiro-parasito ainda desconhecidas, que façam com com que os títulos diminuam. Assim, a segunda possibilidade para a infecção por *T. cruzi* é que o animal não estaria infectado por este parasito desde o primeiro momento, mas sim adquirido posteriormente esta infecção. Diante deste cenário, no momento da segunda coleta, essa infecção poderia

ser ainda tão recente de forma que a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* ainda não tivesse atingido níveis elevados, como o esperado diante do observado para a maioria dos micos neste trabalho.

A transmissão de *T. dionisii* está vinculada a cimicídeos no Velho Mundo (Molyneaux, 1991), mas o parasito já foi encontrado em *Triatoma vitticeps* (Dario et al., 2017), na Mata Atlântica do Espírito santo, indicando que a diversidade de vetores pode ser ainda maior do que a atualmente conhecida. Não há relatos de alterações clínicas em morcegos infectados por *T. dionisii*, porém o parasito já foi detectado no interior de células (Glauert et al., 1982; Baker, 1985; Oliveira et al., 2009) e pode formar cistos em musculatura lisa e cardíaca (Gardner e Molyneux, 1988). Além disso, não se pode descartar o possível envolvimento de *T. dionisii* junto de *T. cruzi*, como agente causal das lesões cardíacas severas e agudas em um ser humano (Dario et al., 2016).

6.2.3 *Trypanosoma rangeli*

Multi-hospedeiro tal qual *T. cruzi*, *T. rangeli* já foi descrito infectando as ordens Carnivora, Didelphimorphia, Primates, Pilosa e Rodentia e foi encontrado infectando um gato-do-mato-grande na FPZSP. Apesar de *T. rangeli* possuir ampla distribuição nas Américas Central e do Sul e do gato infectado ter vindo de um criadouro conservacionista no Uruguai, o animal apresentou soroconversão entre a primeira e a segunda coleta, sugerindo tratar-se de um caso autóctone. *Trypanosoma rangeli* conta com 5 linhagens genéticas (TrA a TrE) (Maia da Silva et al., 2009; Caballero et al., 2015) e um ciclo definido, sendo transmitido, comprovadamente, pela saliva de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Cuba Cuba, 1998). No entanto, os resultados obtidos por Dario e colaboradores (2017), no Espírito Santo, sugerem que *T. rangeli* possa infectar *Triatoma vitticeps*. Além disso, o parasito já foi encontrado em conteúdo intestinal de *P. megistus*, em infecções mistas com *T. cruzi*, no estado de Santa Catarina (Steindel et al., 1994). Talvez por apresentar um ciclo de vida extracelular (Bradwell et al., 2018), *T. rangeli* não foi associado, até o momento, a quaisquer alterações clínicas em seus hospedeiros. Já nos vetores, *T. rangeli* pode provocar deformidades que podem causar o óbito dos insetos (Guhl e Vallejo, 2003). No entanto, aspectos como a manutenção da parasitemia por longos períodos, apesar de terem sido descritos apenas tripomastigotas não-replicativos no sangue de mamíferos, permanecem desconhecidos. Há relatos de pacientes humanos com diagnóstico de doença de Chagas onde se isolou *T. rangeli* muito tempo depois que o

paciente saiu de áreas possíveis de transmissão (De Sousa et al., 2008). Outro ponto é que o parasito, normalmente detectado no sangue, já foi encontrado na medula óssea de um tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) no Pará (Araújo et al., 2013), exemplificando como a relação entre *T. rangeli* e os hospedeiros ainda é pouco conhecida (Bradwell et al., 2018).

6.2.4 *Trypanosoma minasense*

Descrito por Carlos Chagas após ser encontrado em um sagui da espécie *Callithrix penicillata* (syn *Hapalle penicillata*), *T. minasense* é um parasito restrito a primatas e diagnosticado em mais de 30 espécies diferentes, sendo muito comum do Panamá até o sudeste do Brasil. Não há informações sobre quais são os vetores na natureza e não há relatos de alterações clínicas em primatas infectados por este parasito (Ziccardi et al., 1999, 2000). Hoare (1972) tentou infectar roedores e cães de laboratório sem sucesso. Na FPZSP, este parasito foi encontrado infectando duas espécies de primatas: um mico cativo, mas nascido na natureza, oriundo de Cotia (SP) e um bugio de vida livre da mata anexa à FPZSP.

6.2.5 *Trypanosoma janseni*

Recentemente descoberta, *T. janseni* foi descrito em gambás (*D. aurita*) oriundos da Mata Atlântica do Rio de Janeiro (Lopes et al., 2018). Filogeneticamente agrupada a *T. wauwau*, a espécie apresenta muita similaridade com tripanossomos isolados de marsupiais australianos, como *T. noyesi*, da qual se separou há cerca de 26 milhões de anos. Por conta disso, e sem conhecer o vetor envolvido na transmissão, foi proposto que o vetor seja associado a marsupiais ou que o parasito seja monogenético e ainda esteja se adaptando a um hospedeiro mamífero (Lopes et al., 2018). No entanto, em nosso trabalho, encontramos o parasito infectando um mico-leão-de-cara-dourada da FPZSP e recentemente nosso grupo encontrou esta espécie de parasito em cães da região Amazônica (dados não publicados), sugerindo uma maior diversidade de hospedeiros e de biomas além da Mata Atlântica. Outra consideração feita por Lopes e colaboradores (2018) é que a espécie não foi identificada antes, pois a maioria dos trabalhos busca por parasitos do gênero *Trypanosoma* apenas no sangue, e os parasitos foram diagnosticados em cultura de baço e fígado. Contudo, em nosso estudo encontramos o parasito em amostras de sangue total com guanidina-EDTA, mostrando que esta espécie também pode estar presente no sangue. Os parasitos encontrados na FPZSP não se desenvolveram no

hemocultivo, talvez porque usamos LIT-NNN, enquanto Lopes e colaboradores (2018) isolaram este parasito em meio Schneider-NNN. Ressaltamos que a identificação do parasito ocorreu na primeira coleta e o animal apresentou resultado negativo na RIFI em ambas coletas, indicando que esta espécie possivelmente não apresenta reação cruzada com *T. cruzi* em testes sorológicos. Além disso, observamos banda de intensidade fraca no gel referente à segunda coleta, inviabilizando a identificação da espécie do parasito. Na primeira coleta houve consenso entre as fitas de sequências nucleotídicas e os critérios de identificação no GenBank®, pelo Programa Megablast foram: identidade 100%, *e-value* 0.0 e cobertura 100%. Na segunda coleta não houve formação de consenso entre as fitas, mas ambas as fitas, analisadas individualmente, indicaram similaridade com *T. janseni*. No entanto, os critérios de identificação não foram satisfatórios (fita *Forward* analisada pelo Programa Blastn obteve identidade 83%, *e-value* 0.056 e cobertura 14%; fita *Reverse* analisada pelo Programa Discontiguous Megablast obteve identidade 75%, *e-value* 7e-20 e cobertura 49%). Desta forma, foi possível identificar o gênero do parasito encontrado na segunda coleta, sendo *Trypanosoma*. Como o animal estava infectado por *T. janseni* na primeira coleta e a quantidade de DNA na segunda coleta era bem menor, acreditamos que o mesmo parasito foi detectado na segunda coleta, sugerindo a manutenção da parasitemia por ao menos 7 meses.

6.2.6 *Trypanosoma terrestris-like*

Em quatro diferentes espécies de felinos foi diagnosticada infecção por tripanossomos que denominamos de *T. terrestris-like*, uma vez que possuem grande identidade com *T. terrestris* (99%), fazendo parte do mesmo clado, mas em outro ramo. *Trypanosoma terrestris* foi descrito em 2013 e ainda não se sabe praticamente nada sobre o parasito, além do hospedeiro-tipo (anta, *Tapirus terrestris*) e o local onde foi encontrado (Mata Atlântica do Espírito Santo) (Acosta et al., 2013). Não podemos afirmar se os parasitos identificados no presente trabalho são uma espécie nova ou uma linhagem diferente de *T. terrestris*, mesmo sabendo que a distância genética entre as sequências de *T. terrestris* e *T. terrestris-like* é de 0,5%. Isto porque não há trabalhos publicados sobre *T. terrestris* além de sua descrição e não sabemos se essa espécie é ou não heterogênea. Não houve crescimento em hemocultivo dos parasitos encontrados na FPZSP, o que inviabilizou o estudo morfológico e de padrões de crescimento. Acreditamos que uma análise utilizando como alvo o gene gGAPDH e a realização de futuros cultivos de sangue dos felinos infectados, bem como de tecidos

de animais que por ventura venham a óbito, possam auxiliar na identificação destes parasitos. Três animais infectados por este parasito são casos autóctones, mas o quarto animal (uma jaguatirica) não nasceu na FPZSP, e sim no ambiente natural, oriundo de Tefé (AM).

6.3 Métodos de Diagnóstico e Infecções Mistas

As diferentes espécies encontradas e, principalmente, as infecções mistas, sejam entre diferentes genótipos de *T. cruzi*, sejam entre diferentes espécies, só foram detectadas em virtude dos diferentes métodos diagnósticos empregados. As coinfeções, por exemplo, só foram detectadas em virtude das diferentes amostras utilizadas para a caracterização molecular (hemocultivo e sangue total) e/ou das recoletas. Em estudo semelhante ao nosso, foram amostrados 41 macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) cativos de 1 a 4 vezes, a cada 1 ou 2 meses, e também ocorreram oscilações no diagnóstico molecular: animais positivos em alguma das coletas, não obtinham o mesmo resultado em outras coletas (Hodo et al, 2018).

As infecções mistas ainda são subestimadas, mesmo sendo a maioria na natureza. Dentre o gênero *Trypanosoma*, por exemplo, as coinfeções foram demonstradas a partir do hemocultivo, que é pouco sensível e muito seletivo (Jansen e Roque, 2017), sugerindo que representem dados ainda subestimados. Infecções concomitantes entre os diferentes genótipos de *T. cruzi* são bastante comuns em marsupiais, sendo a coinfeção entre DTU TcI e DTU TcII a mais encontrada no Brasil e no bioma Mata Atlântica (Jansen et al., 2015). Neste bioma, macacos-prego (syn *Cebus apella*) mostraram ser capazes de manter a infecção por ambos genótipos mesmo após um ano de diagnosticada a coinfeção (Lisboa et al., 2006). Na FPZSP, onde encontramos um gambá de vida livre mantendo a infecção destes dois genótipos, a população de *T. cruzi* DTU TcII apresentou crescimento e se estabeleceu no hemocultivo, provavelmente suprimindo o crescimento da população de DTU TcI que também deveria estar presente no cultivo, mas foi diagnosticada apenas a partir do sangue total. Salienta-se que a infecção mista entre diferentes genótipos de *T. cruzi* foi encontrada apenas neste gambá na FPZSP, mas este mamífero é considerado um bioacumulador de DTUs (Jansen e Roque, 2017).

Com relação às infecções mistas entre diferentes espécies, o mico infectado por *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei* apresentou, num primeiro momento, quantidade

satisfatória de DNA no gel, mas eletroferograma com aspecto de infecção mista, sendo caracterizada apenas como *Trypanosoma* sp. Como a quantidade de DNA estava adequada, a PCR foi repetida nas mesmas condições, e desta vez o gel mostrou bandas de 500pb e de 400pb. Assim, a banda de 500pb foi sacada e o material enviado ao sequenciamento deu origem a um eletroferograma de boa qualidade. A infecção por *T. cruzi marinkellei* foi identificada e posteriormente confirmada pela análise da árvore filogenética. No entanto, a infecção por *T. cruzi* DTU TcI encontrada a partir do hemocultivo corrobora a presença de infecção mista, sugerida pelo primeiro eletroferograma oriundo de DNA extraído a partir de sangue com guanidina-EDTA.

Além de possibilitar o diagnóstico de coinfeções e de diversos parasitos do gênero *Trypanosoma*, os resultados das diferentes técnicas empregadas nos permitiram encontrar mais animais infectados. A RIFI e o diagnóstico molecular a partir de sangue total mostraram ser bastante sensíveis e ter, quantitativamente, sensibilidade semelhante. Qualitativamente, eles foram complementares, diagnosticando infecções em indivíduos diferentes, tornando maior o número de animais diagnosticados com infecção. Apesar da alta sensibilidade do diagnóstico molecular a partir de sangue em detectar os animais infectados, por diversas vezes nos deparamos com amostras cuja quantidade de DNA era baixa, deixando dúvidas sobre a existência da infecção. Em 18 casos como esses, optamos pela confecção do gel de poliacrilamida a 8% corado por prata (dados não mostrados), por ser descrito como mais sensível do que o gel de agarose (Filgueiras et al., 2019). No entanto, mesmo com bandas mais nítidas de acordo com o esperado para tripanosomatídeos (600 pb), os sequenciamentos voltavam ainda sem similaridade com as sequências depositadas no GenBank®, possivelmente pela pouca quantidade de DNA em si, pela baixa qualidade das amostras, ou mesmo por possíveis presenças de infecções mistas. Outra possibilidade é que essas amplificações, mesmo estando na altura de interesse (600pb), possam se tratar de bandas inespecíficas, como o observado em 13 amostras de sangue com guanidina-EDTA de gambás (*D. aurita*). Estas amostras não tiveram amplificação de DNA na altura de interesse, mas apareceram amplificações nas alturas de 400 e/ou 500 pb. Destas 13 amostras, cinco mostraram bandas semelhantes nas duas alturas (400 e 500 pb) e outras oito mostraram mais destaque nas bandas de 400pb. Uma destas 8 amostras (400 pb) foi enviada para o sequenciamento e indicou similaridade com as sequências de referência de um gambá norte-americano (*Didelphis virginiana*), apesar dos critérios de identificação da

espécie terem sido baixos (cobertura 95%, *e-value* 6e-96 e identidade 99%). Este fato indica que apesar de os *primers* (internos e externos) utilizados na Nested PCR serem elaborados para o reconhecimento da região conservada do gene 18S de tripanosomatídeos, eles puderam reconhecer uma região do gene do hospedeiro, de forma a permitir a amplificação desta região. Vale dizer que fato semelhante já foi observado pelo nosso grupo, com amostras de *Marmosops incanus*, outro marsupial, após uma PCR para o alvo kDNA de *Leishmania* sp. (dados não publicados).

Quatro gambás de vida livre infectados por *T. cruzi* apresentaram resultados positivos no exame a fresco e/ou no hemocultivo, mas surpreendentemente os resultados do diagnóstico molecular a partir de sangue total foram negativos. Um desses indivíduos apresentou crescimento no hemocultivo, que não se estabeleceu, sugerindo uma baixa parasitemia o que, em partes, poderia justificar o resultado negativo do diagnóstico molecular. O mesmo pensamento pode ser estendido a um segundo animal, com resultado positivo no exame a fresco, mas negativo no hemocultivo e no diagnóstico molecular a partir de sangue. Isto pode acontecer quando a amostra utilizada para confecção das lâminas era a única alíquota da amostra coletada onde havia parasitos, uma vez que eles não ficam distribuídos de forma homogênea no sangue. Outro fator que pode ter influenciado é que a amostra de sangue total deste animal, bem como dos outros dois gambás (ambos com resultado positivo apenas no hemocultivo, mas apenas um com cultivo estabelecido), estava coagulada. Isso pode ter interferido no resultado do diagnóstico molecular a partir de sangue, uma vez que tivemos que adaptar a técnica de extração de DNA destes materiais. Vale ressaltar que a infecção por *T. cruzi* em três destes quatro indivíduos foi confirmada na RIFI, com titulações que variaram de 1:40 até 1:160. O quarto animal, cujo cultivo foi estabelecido, apresentou-se infectado por *T. cruzi* DTU TcII e titulação 1:2560.

Em um cenário com diferentes espécies de *Trypanosoma*, infectando os animais cativos, era esperado o encontro de reações cruzadas na RIFI, que ocorrem até mesmo quando há infecção por tripanosomatídeos de outro gênero, como *Leishmania*. Reações cruzadas podem ser encontradas até mesmo com relação a outros kinetoplastídeos, como descrito em cabras infectadas (58%; 14/24) por parasitos do gênero *Phytomonas*, que apresentaram resultado positivo em diagnóstico sorológico para *T. cruzi* (2%; 1/56) (Herrera et al., 2005). Mesmo quando não se sabe qual parasito possivelmente está provocando a reação cruzada, é possível inferir que este efeito esteja ocorrendo, especialmente quando o resultado apresenta titulação

igual ou próxima ao corte. Em Belém, por exemplo, apenas um cão doméstico dentre 14 animais mostrou resultado positivo, estando seu título de anticorpos igual ao valor de corte (1:40). Devido ao fato de não ter sido encontrada presença de ciclo enzoótico no local, assumiu-se a existência de reação cruzada (Xavier et al., 2014). Assim, havendo parasitos do mesmo gênero na FPZSP, os anticorpos produzidos pelo hospedeiro para combater estes parasitos podem reagir com *T. cruzi* fixado às lâminas de leitura da RIFI. Em seres humanos, há relatos de reações cruzadas diante das infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli*, em virtude da semelhança entre os epítomos (O'Daly et al., 1994; Moraes et al., 2008). Estes parasitos compartilham o mesmo nicho ecológico, facilitando que as reações cruzadas ocorram, como é esperado que ocorra com *Leishmania* em locais onde sua ocorrência é elevada (Herrera et al., 2005). Na FPZSP, o animal infectado por *T. rangeli* apresentou titulação na RIFI de 1:40, sugerindo uma possível reação cruzada e a existência apenas da infecção por *T. rangeli*, sem haver infecção por *T. cruzi* (como seria interpretado o resultado da RIFI), especialmente pelo título ser igual ao valor de corte. Outra possibilidade seria uma coinfeção recente por *T. cruzi*. Não há relatos quanto às demais reações cruzadas, mas estudos antigos demonstram semelhança entre os epítomos de *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* (Petry et al., 1986, 1987). Desta forma, pode ser difícil diferenciar uma reação cruzada de uma possível infecção mista. O lobo-europeu infectado por *T. c. marinkellei* possivelmente apresenta uma infecção mista com *T. cruzi*, uma vez que os títulos encontrados são muito altos (7 títulos acima do corte em 2013, estando a 1:5120, e pelo menos 3 títulos acima em 2018, estando a $1 \geq 320$, sendo o corte 1:40). Exemplos desta possível ocorrência foram observados também a partir do resultado diagnóstico de três primatas. Um primeiro animal, comprovadamente infectado por *T. cruzi* e *T. c. marinkellei*, apresentou resultado positivo com 3 títulos acima do corte (1:320; corte 1:40). Outro mico, infectado apenas por *T. dionisii*, obteve resultado negativo na RIFI, enquanto um terceiro primata com coinfeção de *T. dionisii* e *T. cruzi* apresentou 3 títulos superior ao corte (1:80, sendo o corte 1:10). Enquanto isso, outros indivíduos cativos infectados por *T. cruzi* e/ou *T. cruzi marinkellei* (de acordo com os diagnósticos parasitológicos), apresentaram na RIFI titulação no mínimo 2 títulos superior ao título de corte (1:160 em carnívoros, cujo corte é de 1:40, e 1:40 em primatas, cujo corte é 1:10), especialmente dentre os micos (*L. chrysomelas*). Este padrão não foi visto apenas em um macaco-prego (*S. apella*), que apresentou soroconversão durante o trabalho, com titulação igual ao valor de corte (1:10), não sendo realizada uma terceira coleta. Além desses animais, três dos

quatro felinos infectados por *T. terrestris*-like também apresentaram títulos relativamente altos (até 1:160, sendo o corte 1:40), podendo ser fruto de infecções mistas com *T. cruzi* ou mesmo reação cruzada. No caso de *T. terrestris*, não se sabe nada a respeito da resposta imunológica que pode decorrer de animais infectados, dificultando qualquer inferência sobre reações cruzadas na infecção destes felinos.

Pelo fato de a RIFI ser um método diagnóstico interpretativo, pode haver variações nas leituras mostrando diferença de uma titulação. Situações assim podem ter acontecido em alguns casos na FPZSP. Três gatos-do-mato-grande obtiveram resultado positivo na RIFI, igual ao valor de corte, em ao menos uma das coletas, mas apresentaram resultados parasitológicos inconclusivos: (i) para 2 gatos, com relação a espécie envolvida na infecção, sendo um infectado por *Trypanosoma* sp. e outro por tripanosomatídeo; e (ii) para 1 indivíduo quanto a existência da infecção (banda fraca). Por apresentarem um dos resultados da RIFI com título 1:40, estes animais foram contabilizados como infectados por *T. cruzi*. O animal cuja existência da infecção não foi confirmada pelos métodos diagnósticos (banda fraca), parece ter apresentado uma soroconversão. Por outro lado, os outros dois animais apresentaram título de corte na primeira coleta, e resultado negativo (1:20) na segunda coleta. Entendemos esses 3 casos como sendo variações esperadas nas leituras, mas ressaltamos que novos inquéritos sorológicos devam ser realizados. Tivemos também dois casos semelhantes, envolvendo um mico-leão-de-cara-dourada e um cão-selvagem-africano. No caso do mico, cuja primeira leitura apresentou valores de 1:80 e a segunda 1:20, possivelmente a diferença se deu em virtude dos diferentes parasitos envolvidos na infecção (*T. dionisii* e *T. cruzi*), como supracitado em exemplo anterior sobre as infecções mistas. No entanto, apesar desta variação, o resultado da RIFI para este mico permaneceu positivo, o que não aconteceu no caso do cão-selvagem-africano. Este indivíduo obteve titulação 1:80 na primeira coleta e 1:20 (negativo) na segunda coleta, além dos resultados negativos em todos os diagnósticos parasitológicos. É possível que tenha havido reação cruzada a partir de uma infecção por outro parasito que não estabeleceu infecção e apresentou queda de produção de anticorpos posteriormente. No entanto, em virtude da primeira titulação de 1:80 na RIFI, e por não sabermos como os animais do gênero *Lycaon* respondem à infecção por *T. cruzi*, o mamífero foi considerado infectado por *T. cruzi*. Há relatos da ocorrência de soroconversão em primatas e carnívoros, mas não parecem ter sido observadas quedas de títulos entre uma coleta e outra (Monteiro et al., 2006; Rocha et al., 2013).

6.4 Parasitismo, Zoológicos e Programas de Conservação

Com relação à compreensão da dinâmica dos ciclos de tripanossomos presentes na FPZSP, vale lembrar que parasitismo é uma relação ecológica frequentemente observada pelo médico veterinário, que em muitos casos não resulta em prejuízo aos indivíduos parasitados (Nunes e Catão-Dias, 2007). No entanto, o confinamento intensifica a resposta aos fatores estressores, pois o animal não tem outra opção que não se adaptar. O estresse, associado ou não à imunossupressão que pode ser causada por ele e/ou a coinfeções, pode quebrar o equilíbrio pré-estabelecido entre hospedeiro e parasito, prejudicando a saúde de animais cativos infectados (Orsini e Bondan, 2014). Monitorar a saúde destes animais pode ampliar o conhecimento acerca: (i) do possível impacto destas parasitoses à saúde das diferentes espécies de mamíferos silvestres; (ii) de padrões de infecção dos diferentes parasitos diagnosticados; (iii) de padrões diferentes de parasitemia de parasitos já conhecidos em espécies de hospedeiros ainda não estudadas.

Ademais, animais de cativeiro são frequentemente submetidos a diversas formas de deslocamento, sejam eles internos ou externos. Quando realizamos o deslocamento de um animal, movimentamos todo um "pacote biológico", pois os hospedeiros são considerados como um verdadeiro ecossistema para os parasitos, por apresentarem diversas infecções concomitantes. Além disso, é muito difícil sabermos quais parasitos estão presentes em cada indivíduo e como esses parasitos interagem entre si e entre o hospedeiro, especialmente em translocações de fauna (Northover et al., 2018). Neste contexto, pode ocorrer um "intercâmbio" de parasitos, em diferentes direções: de uma instituição de cativeiro para outra, do cativeiro para a natureza ou da natureza para o cativeiro.

No que concerne os deslocamentos internos, temos que a maioria dos animais, nascidos ou não na FPZSP, já trocaram de recinto ao menos uma vez durante sua estadia na instituição. Os deslocamentos internos ocorrem por diversas razões, como: (i) troca de recinto; (ii) em virtude de obras; (iii) manejos reprodutivos; e (iv) animais que necessitem ficar internados na Divisão de Veterinária (DV). Durante estes deslocamentos, animais que costumam habitar recintos mais próximos à área de mata podem habitar recintos mais distantes temporariamente, e vice-versa. Um exemplo é o serval (*Leptailurus serval*), que apesar de ter nascido na FPZSP já sofreu diversos deslocamentos internos. No momento das coletas para este trabalho o serval estava no recinto de exposição próximo à Trilha B de captura dos pequenos mamíferos.

Porém, o animal já habitou uma ilha circundada com fosso (próxima ao Zoo Safari), o Setor Extra e também já permaneceu internado na DV. Outros animais infectados que sofreram deslocamentos internos são os tigres-reais-de-bengala (*P. tigris tigris*), que passaram pelas ilhas com fosso, pelo Zoo Safari e pela DV, e os macacos-prego (*S. apella*) que, apesar de sempre habitarem o Zoo Safari, já precisaram permanecer na DV. Todos os recintos da FPZSP permitem a entrada de pequenos mamíferos de vida livre e/ou triatomíneos, com menor ou maior acessibilidade e estão a menos de 500m das bordas da mata (em linha reta). No entanto, o deslocamento dos animais entre recintos adjacentes à mata, ou mesmo inseridos nela (como o Zoo Safari), e recintos mais distantes da mata podem favorecer a circulação, e até mesmo a dispersão, dos parasitos pela FPZSP. Neste sentido, os animais cativos podem atuar como fonte de infecção para triatomíneos, que podem, por sua vez, podem infectar outros animais cativos.

Outros exemplos de movimentações que podem ocorrer dentro dos ambientes de cativeiro são a permuta, o empréstimo e a guarda temporária. Nestes casos, há deslocamento de indivíduos entre instituições, de modo que o animal possa ou não entrar em contato direto com a natureza, caso a instituição de destino esteja inserida no ambiente natural. É interessante observar, por exemplo, que dentre os 6 micos-leões-de-cara-dourada infectados por *T. cruzi* na FJZB, 5 são oriundos da FPZSP e foram introduzidos ao plantel da FJZB em 2013. É possível que os animais tenham carregado os parasitos consigo, mas também podem ter adquirido a infecção no próprio FJZB, uma vez que também há *P. megistus* infestando recintos de primatas e ouriços, que os locais de estadia estão em proximidade com a mata adjacente e ainda já foram encontrados gambás (*D. albiventris*) infectados no entorno (Gurgel-Gonçalves, 2004; Reis, 2018). Na FPZSP também há diversos animais oriundos de outras instituições, sendo que dos 44 mamíferos infectados por tripanosomatídeos, 11 (25%) vieram de outras instituições (cinco brasileiras e seis estrangeiras, lembrando que não confirmamos a autoctonicidade desses 11 casos).

As movimentações de parasitos do ambiente natural para o ambiente de cativeiro, além das transmissões observadas por nós (envolvendo mamíferos de vida livre e insetos vetores), podem ocorrer também quando animais de vida livre são incorporados ao plantel de uma instituição. Há dois principais motivos para isso ocorrer: (i) animais inaptos ao retorno para a natureza; e (ii) animais incorporados a programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Em nosso trabalho, dentre os animais infectados por tripanosomatídeos, 25% (11/44) nasceram na

natureza, em diferentes regiões do Brasil: 2 animais oriundos do próprio PEFI, 4 animais do interior de São Paulo, 1 de Tocantins, 1 do Amazonas e 1 de origem desconhecida (Anexo II). Além disso, daqueles 11 animais oriundos de outras instituições, 2 nasceram na natureza e foram doados por um zoológico do interior de São Paulo. Estes animais podem ter carreado consigo os parasitos para dentro da FPZSP, ou podem ter se infectado no local. Ziccardi e colaboradores (2000) observaram que os primatas de vida livre do Bioma Amazônia carregam *T. cruzi* para o cativeiro. Da mesma forma, no CPRJ os primatas de vida livre incorporados ao plantel da instituição carregam o parasito para o cativeiro, possivelmente atuando como fonte de infecção para os animais nascidos na instituição, que também podem ter adquirido a infecção a partir dos primatas de vida livre da mata do entorno (Lisboa et al, 2004).

Os deslocamentos que envolvem a introdução (ou reintrodução) de animais silvestres na natureza, quando ocorrem a partir de zoológicos ou criadouros conservacionistas, estão relacionados às espécies ameaçadas de extinção. Dos mamíferos cativos da FPZSP infectados por tripanosomatídeos, há indivíduos de espécies exóticas e nativas ameaçadas de extinção. Quanto às exóticas, além de estarem ameaçadas, suas populações estão diminuindo, de acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2018), a saber: chimpanzé, tigre e cão-selvagem-africano. O mesmo ocorre para uma das espécies nativas, os micos-leões-de-cara-dourada (MMA, 2014; IUCN, 2018). Já o macaco-aranha-preto (*A. paniscus*) e os gatos-do-mato-grandes são considerados em situação vulnerável. E apesar de o ouriço e o macaco-prego (*Sapajus apella*) não estarem ameaçados, suas populações estão diminuindo (IUCN, 2018).

Quando animais que integram programas de conservação são submetidos a translocações, passam por condições estressantes, além daquelas intrínsecas ao cativeiro, podendo desencadear o desequilíbrio entre o hospedeiro e a comunidade de parasitos que abrigam (Nunes e Catão-Dias, 2007; Odiño e Bondan, 2014). Por outro lado, a importância da diversidade de parasitos vem ganhando notoriedade, de modo que atualmente os parasitos são considerados importantes para a conservação. A Comissão de Sobrevivência das Espécies (SSC-IUCN) recomenda que os parasitos, especialmente espécie-específicos, sejam cointroduzidos durante as translocações de fauna (IUCN-SSC, 2013). É importante que tanto as coinfeções, ainda pouco compreendidas, quanto o intercâmbio de parasitos entre os animais introduzidos e aqueles presentes no ambiente sejam previstos. Uma recente revisão

sobre a relação entre as translocações de vertebrados e os diversos parasitos concomitantemente hospedados (Northover et al., 2018) abordou diversas questões que devem ser analisadas frente a cada situação, sendo algumas delas: (i) animais em situação de cativeiro "perderam contato" com parasitos presentes na natureza, de modo que não temos como prever as consequências de cada "reencontro"; (ii) efeitos negativos, oriundos das infecções e/ou do estresse do translocamento, podem ser exacerbados em populações de espécies ameaçadas de extinção, quando estas apresentam imunocompetência reduzida e/ou baixa variabilidade genética; (iii) pressões seletivas durante ou após as translocações podem levar à extinção de parasitos, podendo haver impacto nas coinfeções, especialmente quando um parasito pode regular outro.

Exemplos sobre os possíveis benefícios das coinfeções para o hospedeiro nos fazem questionar a real necessidade de tratar animais parasitados. Os marsupiais australianos *Bettongia penicillata*, por exemplo, quando estão infectados concomitantemente mista por *Trypanosoma copemani* e *T. vegrandis*, apresentam uma moderação de *T. vegrandis* sobre o estabelecimento de *T. copemani*, que pode ser potencialmente patogênico para o marsupial (Thompson et al., 2014). Northover e colaboradores (2018) levantaram pontos interessantes sobre o uso de fármacos em cativeiro, visando erradicar as parasitoses antes de realizar as translocações. Primeiramente, não temos certeza sobre quais parasitos serão afetados, direta ou indiretamente, seja por um tratamento ou por uma vacina. Por conta disso, o benefício do tratamento deve ser maior do que o custo que pode ter a perda daquele parasito. Um dos fatores que torna o tratamento benéfico, de acordo com os autores, é quando o parasito pode oferecer risco à saúde do animal. Considerando *T. cruzi*, sabemos que o parasito pode provocar danos à saúde de indivíduos, mas provavelmente sem causar danos à conservação de uma espécie. Este fato pode ser comprovado por estudos realizados pelo nosso grupo, que diagnosticou infecção por *T. cruzi* em micos-leões-dourados de vida livre há mais de 10 anos, tendo encontrado alterações cardíacas em 45% dos indivíduos infectados por *T. cruzi* em 2003 (Monteiro et al., 2006). No entanto, a população da espécie se mantém crescendo: no início dos anos 2000 havia 1.000 indivíduos na natureza, número que atingiu a marca dos 3.200 indivíduos em 2014 (AMLD, 2018).

Apesar da importância dos parasitos na manutenção da diversidade, há pesquisadores que concordam que animais infectados por determinados parasitos não devam ser introduzidos na natureza, como *T. cruzi*, por haver lacunas sobre a sua

epidemiologia e os impactos que possa causar em diferentes ecossistemas (Lisboa et al., 2004, 2006). Apesar de ser um parasito encontrado em todos os biomas brasileiros e em diversos mamíferos, em ambientes com baixa prevalência os animais infectados introduzidos podem contribuir com a dispersão do parasito. Além disso, animais infectados e introduzidos no ambiente natural podem ter chances menores de sobrevivência (Minuzzi e Souza et al., 2016), inclusive por haver o estresse da reintrodução. A SSC da IUCN, por sua vez, afirma que quando adotamos medidas preventivas e os animais são submetidos ao mínimo estresse possível, raramente as translocações deixam de ser realizadas em virtude de um parasito ou de uma doença (IUCN-SSC, 2013). Considerando estes aspectos, ressalta-se a importância do monitoramento das populações às quais foram incorporados os animais translocados, bem como da comunidade como um todo.

6.4.1 Medidas Preventivas de Transmissão de *T. cruzi*

Para que sejam propostas medidas visando mitigar a transmissão dos parasitos encontrados, é preciso conhecer o ciclo e as vias de transmissão dos mesmos. Desta forma, pensando nas alterações clínicas observadas em primatas e canídeos, propomos, ao final destes subtópico, medidas voltadas para prevenir a transmissão de *T. cruzi*. Algumas destas medidas funcionarão para outros parasitos que envolvam insetos vetores em seus ciclos. No entanto, a prevenção da transmissão de todos estes parasitos deve ser analisada, considerando a importância da conservação e da biodiversidade dos parasitos na FPZSP. Vale lembrar que o ciclo enzoótico de *T. cruzi* não ocorre apenas na FPZSP, fazendo parte da natureza e do bioma Mata Atlântica (Lisboa et al., 2006; Jansen et al., 2018), com diferentes padrões de distribuição ao longo do Brasil, havendo áreas ainda pouco estudadas.

No trabalho com os macacos-rhesus do KCCMR, por exemplo, os autores sugeriram aumentar a distância entre os recintos e a mata do entorno, sem citar como isso seria feito (Hodo et al., 2018). Acreditamos que isso não seria viável na FPZSP, primeiramente porque o PEFI é uma Unidade de Conservação, o que pode dificultar a obtenção de autorização para o corte de árvores a fim de distanciar a mata dos recintos. Além disso, diversos recintos da instituição são patrimônios históricos, não podendo ser alterados. Ademais, mesmo que as alterações supracitadas pudessem ser realizadas, os triatomíneos e, principalmente, os gambás podem se deslocar por longas distâncias. Medidas mais acessíveis são a mudança de animais de recintos; juntamente à instalação de telas em recintos estratégicos (como do ouriço e do

gambá), que não façam parte da exposição ao público. Estas alternativas visam diminuir o encontro de animais cativos com pequenos mamíferos de vida livre e/ou triatomíneos. Além disso, ambientes que não abriguem animais podem ser dedetizados. Esta medida já começou a ser empregada e alguns dos insetos encaminhados ao LABTRIP em janeiro de 2019 foram encontrados após o procedimento. Para os mamíferos que possuem no interior dos recintos itens como troncos e caixas de madeira (utilizadas como toca) ou qualquer material que possa servir de abrigo para triatomíneos, devem ser constantemente monitorados. Os barbeiros encontrados devem ser coletados, a fim de compreendermos melhor os ciclos existentes na FPZSP, uma vez que pode haver outras espécies de barbeiros na região ou mesmo outros parasitos infectando estes insetos. Tal monitoramento pode ser feito concomitantemente aos acompanhamentos clínicos supracitados.

Além das medidas mitigatórias para evitar a transmissão de *T. cruzi* entre os animais, todos os autores dos trabalhos com animais em cativeiro ressaltaram categoricamente a importância dos cuidados que os trabalhadores destas instituições devem ter para que não ocorra transmissão acidental, principalmente durante procedimentos crueltos, como coleta de sangue, intervenções cirúrgicas e necropsias. A manipulação de amostras biológicas, seja para análises clínicas ou outras finalidades (sangue e outros tecidos), também deve ser feita de forma cautelosa.

Outro fator importante no contexto da FPZSP é desenvolver atividades educativas junto aos moradores do entorno do PEFI, especialmente no que se refere ao alto potencial infectivo presente nos gambás, uma vez que é sabido que existe caça ilegal destes animais nas áreas do PEFI e da FPZSP para utilizá-los como alimento. Com relação a presença de triatomíneos infectados na região, é importante que os munícipes estejam cientes deste fato, da mesma forma que devem ser orientados sobre a inerente baixa probabilidade de se infectarem pela via vetorial contaminativa. Além disso, os animais do PEFI são fontes alimentares para os triatomíneos, o que diminui ainda mais a chance de esta via acontecer. Neste sentido, uma sugestão seria envolver a comunidade em atividades educativas, tendo como foco central a biologia do parasito, de forma a demonstrar que o ser humano é apenas mais um hospedeiro em seu ciclo e que o risco de transmissão pela via vetorial contaminativa é baixo na FPZSP, diferente do risco pela via oral a partir da caça dos gambás. Uma das iniciativas poderia envolver a distribuição de cartilhas educativas voltadas para o público infantil, como as desenvolvidas pela Fiocruz, em escolas

municipais e/ou estaduais com as quais a FPZSP já possui vínculo. Ainda aproveitando este vínculo, a FPZSP poderia orientar educadores destas escolas através de palestras e fornecimento de material impresso apropriado. Outra sugestão seria a de desenvolver palestras, teatros e/ou outras ações lúdicas junto da comunidade, a fim de abordar o tema para todos os cidadãos locais. Os animais do Setor Vida de Bicho (gambá e ouriço) podem ser apresentados ao público em algumas destas abordagens, tornando-as mais atrativas. Ademais, as visitas monitoradas e técnicas que hoje ocorrem na FPZSP podem ser utilizadas para a abordagem do tema junto aos estudantes, do ensino fundamental até a graduação. Além destas iniciativas, a instituição pode desenvolver ações junto dos órgãos de saúde e do meio ambiente, tanto do município de São Paulo e quanto do estado.

6.5 Considerações Finais

Trypanosoma cruzi é um parasito que merece destaque dentro do contexto de Saúde Única, uma vez que apresenta um ciclo de transmissão complexo, envolvendo diversos hospedeiros e transmissão vetorial. Além disso, o parasito já foi diagnosticado em diferentes cenários ecológicos, desde ambientes preservados até degradados, sendo que seu ciclo pode ser influenciado por esta degradação, como é observado no caso da fragmentação de *habitat*. Mudanças ambientais provocadas pelo homem vêm alterando a maneira como os parasitos influenciam não apenas a vida selvagem, mas também ecossistemas inteiros. Outros tripanosomatídeos, por sua vez, exercem um importante papel para a manutenção da biodiversidade global e, conseqüentemente, da Saúde Única. Estudos desenvolvidos em ambientes naturais e instituições de cativeiro, buscando monitorar e compreender a relação de parasitismo com foco em Saúde Única, são essenciais para avançar e fortalecer o conhecimento e a conservação da biodiversidade.

Em nosso estudo obtivemos algumas contribuições sobre o parasitismo por tripanosomatídeos em ambientes de cativeiro, tanto envolvendo vertebrados quanto invertebrados. Estas contribuições podem ser consideradas, de forma criteriosa, para os animais silvestres de vida livre, como a descrição de parasitos em hospedeiros nunca antes descritos. Outra contribuição do estudo foi o diagnóstico de uma possível nova espécie (*T. terrestris-like*), demonstrando que examinar animais de cativeiro também pode gerar conhecimento acerca da riqueza de parasitos existentes. No que

se refere à autoctonicidade dos casos, por exemplo, o nascimento de um animal na instituição e sua permanência na mesma confirma a presença de um ciclo de transmissão local. As conclusões obtidas a partir de nosso estudo tornaram-se mais robustas a medida em que utilizamos diferentes métodos diagnósticos, avaliando-os de forma complementar.

7 CONCLUSÕES

- Há um ciclo enzoótico de *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos em mamíferos da FPZSP.
- Mais de um fator de risco está envolvido na transmissão de *T. cruzi* para os mamíferos cativos na FPZSP.
- Os gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) do PEFI e os ouriços-cacheiros (*Sphiggurus villosus*) na FPZSP são reservatórios de *T. cruzi* na área de estudo.
- Triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus* estão envolvidos no ciclo enzoótico de *T. cruzi* DTU TcI na FPZSP.
- O emprego de métodos de diagnóstico molecular a partir de diferentes tipos de amostras biológicas e/ou de coletas em momentos diferentes possibilitou identificar um maior número de espécies de parasitos, além das infecções mistas de diferentes genótipos e/ou diferentes parasitos.
- As infecções por *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. terrestris*-like estão geograficamente dispersas na FPZSP, acometendo ao menos quatro ordens diferentes de mamíferos.
- Infecções por *T. c. marinkellei* e *T. dionisii* em mamíferos não-voadores e em *P. megistus*, bem como a descrição de novos hospedeiros de *T. janseni* nos levam a questionar a especificidade previamente atribuída a estes parasitos, demonstrando que os mesmos são capazes de infectar uma gama maior de hospedeiros.
- O diagnóstico de sequências de DNA sugestivas de novas linhagens e/ou espécies apontam para um conhecimento ainda subestimado da real riqueza de *Trypanosoma* spp. na natureza.

8 ANEXOS

8.1 Anexo I

Anexo I: Lista de sequências de referência (GenBank®) utilizadas na construção das árvores filogenéticas.

Isolado ou Cepa	Genótipo	Número de Acesso GenBank® 18S
<i>T. cruzi</i>		
TCC 642	TcI	FJ001624
TCC 262	TcI	AY491763
Tlenti	TcI	MH059788
TCC 1146	TcII	FJ001629
MT 3869	TcIII	AF303660
MT 4167	TcIV	AF288661
TCC 656	TcV	FJ183395
CL Brener	TcVI	AF245383
TCC 947	TcBat	FJ001626
<i>T. cruzi marinkellei</i>		
TCC 344	-	FJ001664
<i>T. dionisii</i>		
558 CT	-	KY689928
TCC 495	-	FJ001667
<i>T. rangeli</i>		
TCC 643	TrE	FJ900242
San Augustin	TrA	AJ012417
<i>T. noyesi</i>		
D 15	-	JN315381
D 17	-	JN315382
<i>T. wauwau</i>		
TCC 411	-	KT030810
TCC 986	-	KT03821
<i>T. janseni</i>		
COLTRYP 715	-	KY243025
COLTRYP 716	-	KY243026
<i>T. lewisi</i>		
Molteno B3	-	AJ009156
<i>T. theileri</i>		
K127	-	AJ009164
TREU 124	-	AJ009163
<i>T. terrestris</i>		
CBT 60	-	KF586847
CBT 46	-	KF586846
<i>T. grayi</i>		
BAN 1	-	AJ620546
-	-	AJ223565
<i>T. avium</i>		
<i>rook</i>	-	U39578
LSHTM 144B <i>chaffinch</i>	-	AJ009140
<i>T. binneyi</i>		
H29	-	AJ132351
AAW	-	AJ620565
<i>Herpetomonas sp.</i>		
SC UKF5	-	AJ843897

8.2 Anexo II

Anexo II: Informações individuais dos mamíferos silvestres cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo infectados por tripanosomatídeos, frente aos diagnósticos parasitológicos, e por *Trypanosoma cruzi* frente à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Grupos I a V).

Grupo	Mamíferos						Resultados de Mamíferos Cativos Infectados							
	Nome Científico	LBT	CAD	Nome	Local do Recinto	Local de Origem	Exame a Fresco Papa Leucocitária		Hemocultivo e Caracterização Molecular		Diagnóstico Molecular Sangue com Guanidina-EDTA		RIFI	
							A	B	A	B	A	B	A	B
I	<i>Canis lupus</i>	4838	28157	Vermelho	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. cruzi marinkellei</i>	Não amplificou	1≥320	1:320
	<i>Sphiggurus villosus</i>	9095	29972	Soneca	Vida de Bicho	VL: vindo da mata do PEFI	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Não amplificou	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	NR	NR
II	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	10164	31672	Maui	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Não amplificou	Neg.	Neg.
	<i>Leopardus pardalis</i>	9833	29710	Lion	Exposição	VL: Tefé (AM)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Não amplificou	<i>T. terrestris</i> -like	1:40	1:160
	<i>Pan troglodytes</i>	9831	29436	Vitória	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	-	1:20	-
		9983	29556	Lulu	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	-	1:20	-
		10432	29358	Maria Pia	Exposição	VL: vindo do Jardim Zoológico de Lisboa	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	-	1:10	-
	<i>Sapajus apella</i>	9122	25355	Donzela	Zoo Safari	VL: doação – origem indeterminada	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pouco DNA	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	Neg.	1:10
		9770	29131	Carla Perez	Zoo Safari	Zoológico de Paulínia (Paulínia-SP)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Não amplificou	Neg.	Neg.
9771		29060	Baronesa	Zoo Safari	Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Não amplificou	Não amplificou	Neg.	1:10	
III	<i>Leopardus geoffroyi</i>	9099	25617	Pelé	Exposição	Estación de Cria de Fauna (Uruguai)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. rangeli</i>	Pouco DNA	Neg.	1:40
		9114	26432	Pintinha	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	<i>Trypanosoma</i> sp.	-	1:40	-
		9118	29351	Francisco	Extra	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pouco DNA	Não amplificou	Neg. (1:20)	1:40
		9755	28155	Grandão	Extra	Nascido na FPZSP	-	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. terrestris</i> -like	Pouco DNA	1:80	1:40
		9826	26434	Gordo	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pouco DNA	<i>Trypanosoma</i> sp.	1:40	Neg.
		9827	26433	Thunder	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pouco DNA	triptanosomatídeo	Neg.	(1:20)
		9867	25936	Linda	Extra	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Pouco DNA	Neg.	Neg.
	9914	28154	Pretinha	Extra	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. terrestris</i> -like	Pouco DNA	1:160	1:80	
	<i>Leptailurus serval</i>	9829	26420	Greg	Exposição	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	Pouco DNA	1:320	1:160
	<i>Puma yagouaroundi</i>	9819	29239	Texeirinha	Extra (planície)	VL: Palmas (TO)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Pouco DNA	Neg.	Neg.
9825		29742	Ritinha	Extra (planície)	VL: Araçatuba (SP)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Pouco DNA	Neg.	Neg.	
IV	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	9120	29828	Caio	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Pos.	-	Pos., mas CNE	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	1:80	-
		9121	29996	Xavier	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	-	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	1:40	1:40
		9630	30502	Serafim	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. dionisii</i>	Não amplificou	Neg.	Neg.
		9631	29658	-	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Não amplificou	Neg.	Neg.
		9634	29432	Bolinha	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Pos., mas CNE	Neg.	<i>T. dionisii</i>	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	1:80	1:20
		9635	30164	Bruno	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	-	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	Não amplificou	-	-
		9745	29559	Pietro	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	triptanosomatídeo	-	Neg.	-
		9747	29995	Fabi	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Não amplificou	<i>Trypanosoma</i> sp.	1:20	1:20
		9748	27247	-	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	<i>Trypanosoma</i> sp.	-	1:160	-
		9754	29269	Robben	Extra (micário)	Nascido na FPZSP	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. janseni</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.	Neg.	Neg.
		9875	29430	Fujão	Extra (micário)	VL: Cotia (SP)	Pos.	-	Neg.	-	<i>T. minasense</i>	-	Neg.	-
		9989	22898	-	Exposição	Nascido na FPZSP	Pos.	-	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	-	<i>T. cruzi marinkellei</i>	-	1:80	-
	<i>Lycaon pictus</i>	9093	31186	Midra	Exposição	Letsatsi La África Animal and Predator Park (África do Sul)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Não amplificou	Não amplificou	1:80	Neg. (1:20)
		10196	31184	Mambo	Exposição	Letsatsi La África Animal and Predator Park (África do Sul)	Neg.	-	Neg.	-	triptanosomatídeo	-	1:40	-
<i>Panthera leo</i>	9111	24578	Zomba	Zoo Safari	Nascido na FPZSP	Neg.	-	Neg.	-	<i>T. terrestris</i> -like	-	1:40	-	
<i>Panthera tigris tigris</i>	9094	29287	Baboo	Exposição	Le Parc des Félics d'Auneau (França)	Neg.	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	1:80	1:320	
	9100	30629	Tom	Exposição	Zoológico Cattoni-tur Park Hotel (Salete-SC)	Neg.	-	Neg.	-	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	-	1:160	-	
	9117	29453	Titan	Exposição	Fundación Temaiken (Argentina)	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	-	1:320	-	
V	<i>Brachyteles arachnoides</i>	9836	30963	Buda	Exposição (ilha)	VL: doação do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP)	Neg.	-	Neg.	-	triptanosomatídeo	-	Neg.	-
		10455	30961	Monão	Exposição (ilha)	VL: doação do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP)	Neg.	-	Neg.	-	triptanosomatídeo	-	Neg.	-
	<i>Cerdocyon thous</i>	9835	29984	Hard	Extra	VL: Louveira (SP)	Neg.	-	Neg.	-	Não amplificou	-	1:80	-
	<i>Didelphis aurita</i>	9987	31724	Tití	Vida de Bicho	VL: vindo da mata do PEFI	Neg.	Neg.	Neg.	<i>T. cruzi</i> DTU Tcl	Não amplificou	Não amplificou	1:40	1:2560
	<i>Leopardus tigrinus</i>	9828	22170	Leo	Extra	VL: Serra da Mantiqueira (SP)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<i>Trypanosoma</i> sp.	Não amplificou	Neg.	Neg.

Local de Origem: local de onde o animal veio imediatamente antes de integrar o plantel da FPZSP (Fundação Parque Zoológico de São Paulo) – para os animais oriundos da natureza (VL – Vida Livre) é o provável local de nascimento. A: Primeira coleta. B: Segunda coleta. PEFI: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Neg.: Negativo. Pos.: Positivo. CNE: Cultivo não estabelecido. NR: Não realizado (em virtude do método diagnóstico em relação à espécie do hospedeiro em questão). Não amplificou: não foi visualizado produto amplificado da reação em cadeia da polimerase em gel de agarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta ICL, Costa AP, Nunes PH, Gondim MFN, Gatti A, Rossi Jr. JL, Gennari SM, Marcili A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosoma in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. 2013. *Parasites & Vectors*. 6:349.
- Almeida AJ, Torquetti CG, Talamoni AS. Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in a urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2008. 25 (2): 214-219.
- Almosny NRP, Monteiro AO. Patologia Clínica. In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p. 939-966.
- Andrade MCR, Dick Jr EJ, Guardado-Mendoza R, Hohmann ML, Mejido DCP, VandeBerg JL, DiCarlo CD, Hubbard GB. Nonspecific Lymphocytic Myocarditis in Baboons Is Associated with *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009. 81 (2): 235-239.
- Andriolo A. Desafios para a Conservação da Fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo, SP: Roca, 2007. p.19-25.
- Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV – A Reconsideration of its Systematic Position. 1982. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 77 (4): 405-415.
- Araújo VAL, Boité MC, Cupolillo E, Jansen AM, Roque ALR. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*.
- Arregoitia LDV, Fisher DO, Schweizer M. Morphology captures diet and locomotor types in rodents. *Royal Society Open Science*. 2016. 4: 160957 (1-14). Disponível em: <<http://rsos.royalsocietypublishing.org/>>.
- Associação Mico Leão Dourado (AMLD). História da proteção dos micos-leões-dourados e Manejo da População. Página oficial da AMLD: "Mico-leão-dourado". Disponível em: <http://www.micoleao.org.br>.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1991. 48: 211-222.
- Bacigalupo A, Segovia V, García A, Botto-Mahan C, Ortiz S, Solari A, Acuna-Retamar M, Torres-Pérez F, Cattán PE. Differential pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012. 87 (3): 473-480.
- Bahia M, Barros FN, Magalhães-Matos PC, Gonçalves TS, Chierosin Neto L, Faria DC; Romeiro SA, Monteiro FO, Góes-Cavalcante G, Scocield A. *Trypanosoma cruzi* infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. *American Journal of Primatology*. 2016, 9999: 1-6.
- Baker JR. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1985. 4:111-113.

Baker JR, Miles MA, Godfrey DG, Barrett TV. Biochemical Characterization of Some Species of *Trypanosoma* (*Schyzotrypanum*) from Bats (*Microchiroptera*). 1978. The Am J of Trop Med and Hyg. 27 (3):483-491.

Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, Velásquez-Ordoñez V, Fajardo-Muñoz RC, Díaz-González, Oca-Jimenez RM, Barborsa-Mireles M, Guzmán-Bracho C, Estrada-Franco JG, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC. *Trypanosoma cruzi* Circulating in the Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009. 81 (3): 390-395.

Bargues MD, Schofield CJ, Dujardin JP. Classification and Phylogeny of the Triatominae. In: Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis, Chagas Disease, One Hundred Years of Research. 2010. pp. 117-147.

Barretto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da tripanossomose americana, com especial referência à região nordeste do estado de São Paulo. 1967. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 1(2): 23-35.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. Nucleic Acids Research. 2013. Vol. 41. D36-D42.

Bonecini-Almeida MG, Galvão-Castro B, Pessoa MH, Pirmez C, Laranja F. Experimental Chagas' Disease in Rhesus Monkey. I. Clinical, Parasitological, Hematological and Anatomic-Pathological Studies in the Acute and Indeterminate Phase of the Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990 abril-jun, 85 (2): 163-171.

Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, et al. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist. 2013. 164(1): 129-52.

Bradwell KR, Koparde VN, Matveyev AV, Serrano MG, Alves JMP, Parikh H, Huang B, Lee V, Espinosa-Alvarez O, Ortiz PA, Costa-Martins AG, Teixeira MMG, Buck GA. Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. BMC Genomics, 2018.

Brito EA, Favaretto, JA. Biologia: uma abordagem evolutiva e ecológica. 1 ed. Vol. 2. São Paulo: Editora Moderna LTDA. 1997. 655p.

Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. In: Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1998. pp. 287-336.

Brust DM, Pye GW. Sugar gliders. In: Carpenter JW. Exotic Animal Formulary. Kansas: Elsevier, 2013.

Bush AO, Fernández JC, Esch GW, Seed JR. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2001a. Capítulo 1, Introduction; p. 1-12.

Bush AO, Fernández JC, Esch GW, Seed JR. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2001b. Capítulo 14, Communities of parasites; p. 415-439.

Bbutts CT. 2008. Social network analysis with sna. Journal of Statistical Software, v. 24, n. 6, p. 1-51.

Caballero ZC, Costa-Martins AG, Ferreira RC, Alves JMP, Serrano MG, Camargo EP, Buck GA, Minoprio P, Teixeira MMG. Phylogenetic and syntenic data support a

single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. 2015. *Parasit. Vectors* 8, 222.

Cáceres NC. Use of the space by the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2003. 20 (2): 315-322.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Ver. do Inst. de Med. Trop.* 1966. 8 (5): 227-234.

Canavoso LE, Stariolo R, Rubiolo ER. Flight Metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the Role of Carbohydrates and Lipids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003. 98 (7): 909-914.

Carcavallo RU, Franca-Rodríguez ME, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galvão C, Rocha DS, Galíndez-Girón I, Arocha MAO, Martínez A, Rosa JA, Canale D, Farr TH, Barata JMS. Habitats e fauna relacionada. In: Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lentz H. *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*. 1998, Voll. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 551-600.

Cardoso JE, Brener Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1980 jul-dez, 75 (3-4): 97-104.

Carlier Y, Truyens C. Maternal – Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: Tellera J, Tibayreng M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier, 2010. 569-582pp.

Castro EBV, Fernandez FAS. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic forest fragments in Brasil. *Biological Conservation*. 2004. 119: 73-80.

Castro SL, Araújo-Jorge, MTR, Junqueira, ACV. Avaliação de Parâmetros Parasitológicos e de Mortalidade. In: Jorge TCA, Castro SL. *Doença de chagas. Manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. pp. 219-236.

Cavazzana Jr. M, Marcili A, Lima L, Silva FM, Junqueira ACV, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VLB, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schyzotripanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology*. 2010. 40: 345-355.

Chagas C. Neue Trypanosomen. *Arch. Schiffs. Tropenhyg.* 1909. 13: 120-122.

Cheida CC, Nakano-Oliveira E, Fusco-Costa R, Rocha-Mendes F, Quadros J. *Ordem Carnivora*. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. pp. 231-275.

Cook RA, Karesh WB. Emerging Diseases at the Interface of People, Domestic Animals, and Wildlife. In: Fowler ME, Miller RE. *Zoo and Wild Animal Medicine – Current Therapy*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. pp. 55-65.

Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int. J. Parasitol.* 2007. 37: 1609-1616.

Cuba Cuba CA. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1998. 31(2): 207-220.

Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo: Roca; 2007. 1354p.

Curtis-Robles R, Lewis BC, Hamer AS. High *Trypanosoma cruzi* infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2016. 5: 117-123.

Curtis-Robles R, Meyers AC, Auckland LD, Zecca IB, Skiles R, Hamer SA. Parasitic interations among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border. Acta Tropica, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.002>.

Dantas ES, Gurgel-Gonçalves R, Villela DAM, Monteiro FA, Maciel-de-Freitas R. Should I stay or should I go? Movement of adult *Triatoma sordida* within the peridomestic area of a typical Brazilian Cerrado rural household. Parasites & Vectors. 2018.11 (14). 11p.

d'Avila Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko, Duval L, Votýpka J, Yurchenko C, Grellier P, Lukes J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high throughput DNA sequencing era. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015. 110 (8): 956-956.

Davidow B. Transfusion Medicine in Small Animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2013. 43: 735-756.

Dario MA, Lisboa CV, Costa LM, Moratelli R, Nascimento MP, Costa LP, Leite YLR, Llewellyn MS, Xavier SCC, Roque ALR, Jansen AM. High *Trypanosoma* spp. Diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. 2017. PLoS ONE 12 (11): e0188412.

De Sousa, M.A., da Silva Fonseca, T., Dos Santos, B.N., Dos Santos Pereira, S.M., et al. 2008. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). Parasitology Research 103(3): 697-703. doi: 10.1007/s00436-008-1033-1.

Deem SL. Conservation Medicine: A Solution-Based Approach for Saving Nonhuman Primates. In: Waller, MT (ed.). Ethnoprimatology – Developments in Primatology: Progress and Prospects. Springer International Publishing Switzerland. 2016. p. 63-7

Devictor V, Julliard R, Jiguet F. Distribution of specialist and generalista species along spacial gradients of habitat disturbance and fragmentation. Oikos. 2008. 117: 507-514.

Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1997. 486p.

Dormann CF; Gruber B, Frund J. 2008. Introducing the bipartite package: analyzing ecological networks. *R News*, v. 8, n. 2, p. 8–11.

Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. Na appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology. 2018. 145: 430-442.

Fantoni DT, Cortopassi SRG. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2014. 620p.

Felippe PAN, Adania CH. Conservação e Bem-estar Animal. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2014. pp 25-31.

Filgueira A, Barros JHS, Xavier SCC, Souza SF, Medeiros LS, Ribeiro VMF, Jansen AM, Roque ALR. Natural *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* (Steel, 1885) infection among mammals from Brazilian Amazon. 2019. *Acta Tropica*. 190: 92-98.

Forattini OP, Ferreira OA, Silva EOR, Rabello EX. Aspectos Ecológicos da Trupanossomiase Americana: IX – Variação e mobilidade de *Panstrongylus megistus* em ecótopos artificiais. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*. 1977. 11: 199-213.

Forattini OP, Santos JLF, Ferreira OA, Silva EOR, Rabello EX. Aspectos Ecológicos da Trupanossomiase Americana: XVI – Dispersão e ciclos anuais de colônias de *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus* espontaneamente desenvolvidas em ecótopos artificiais. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*. 1979. 13: 299-313.

Froeschke G, Heyden S. A Review of Molecular Approaches for Investigation Patterns of Coevolution in Marine Host-Parasite Relationships. In: *Advances in Parasitology*. 2014. pp. 209-252.

Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Relatório Anual (Annual Report) 2013. Disponível em: < <http://www.zoologico.com.br/wp-content/uploads/2013/07/relatorio-anual-zoologico-2013-internet.pdf>>. Acessado em 20 de dezembro de 2016.

Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Relatório Anual (Annual Report) 2015. Disponível em: < <http://www.zoologico.com.br/wp-content/uploads/2013/07/relatorio-anual-zoologico-2015-internet.pdf>>. Acessado em 20 de dezembro de 2016.

Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Relatório Anual (Annual Report) 2017. Disponível em: < <http://www.zoologico.com.br/wp-content/uploads/2017/07/relatorio-anual-zoologico-2017-internet.pdf>>. Acessado em 04 de novembro de 2018.

Galvão C, Gurgel-Gonçalves. Vetores conhecidos no Brasil. In: Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015. pp. 88-93.

Galvão C, Rocha DA, Jurberg J, Carcavallo R. Início da Atividade de Vôo em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e *T. melanostoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2001. 96 (1): 137-140.

García L, Ortiz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F, Solari A. Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome B sequence and minicircle analyses. *PLoS One* 2012. 7(5):e36578.

Gardner RA, Molyneux DH. *Schizotrypanum* in British bats. *Parasitology* 1988. 97:43-50.

Glauert AM, Baker JR, Selden LF. Mechanism of entry and development of *Trypanosoma dionisii* in nonphagocytic cells. *J Cell Sci* 1982. 56:371-87.

Grisard, EC. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2002. 1:5, 2p.

Guedes PM, Veloso VM, Mineo TW, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, Nascimento MS, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia, MT. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* 2012 abril-jun, 21 (2): 151-156.

- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – Na Updated Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2003. 98(4): 435-442.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D, Gasparini JL, Sazima, I. Conservação: In: _____. Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia. São Paulo: Anolisbooks, 2013. pp.55-60.
- Halkyer NC. Paleogenética de populações pré-colombianas da Bolívia: Análises do mtDNA humano, e infecções por *Trypanosoma cruzi* e vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV) [tese de mestrado]. [Rio de Janeiro]: Instituto Oswaldo Cruz; 2008. 99p.
- Halliday FW, Heckman RW, Wilfahrt PA. A multivariate test of disease risk reveals conditions leading to disease amplification. Proceedings Royal Soc. B. 2017. 284: 20171340.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007. 44: 15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. International J for Paras. 2004. 34: 1393-1404.
- Hamilton PB, Stevens JR. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis, Chagas Disease, One Hundred Years of Research. 2010. pp. 321-338.
- Hechinger RF, Lafferty KD. Host diversity begets parasite diversity: bird final hosts and trematodes in snail intermediate hosts. Proceeding Royal Soc. B. 2005. 272: 1059-1066.
- Hernández R, Rios P, Valdés AN, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA Mcoding region: comparison with other trypanosomatids. Molecular and Biochemical Parasitology. 1990. 41: 207-212.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), na área endemic for Chagas disease. Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 2005. 99:379-388.
- Herrera HM, Rocha, FL. Lisboa CV, Rademaker V, Mourão GM, Jansen AM. Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brasil. Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 2011. 105: 380-387.
- Herrera L. Uma revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2010 jan-jul, Vol. L (1): 3-15.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. 1972. Blackwell Scientific Publishing, UK, Oxford, England.
- Hodo CL, Wilkerson GK, Birkner EC, Gray SB, Hamer SA. *Trypanosoma cruzi* Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. EcoHealth, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1318-5>.
- Hontebeyrie M, Brenière SF, Aznar C. Other Forms of Transmission. In: Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis, Chagas Disease, One Hundred Years of Research. 2010. pp. 583-597.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Mapa de clima do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2002. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/tematicos.html>>. Acessado em 01 de dezembro de 2018.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). The IUCN Red List Threatened Species™. 2018.2. Disponível em: <<http://oldredlist.iucnredlist.org>>. Acessado em 01 de dezembro de 2018.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). The Species Survival Commission. Guideline for Reintroductions and Other Conservation Translocations. 2013. 72p.

Jaime-Andrade J, Avila-Figueiroa D, Lozano-Kasten FJ, Hernández-Gutiérrez RJ, Magallón-Gastélum E, Kasten-Monges MJ, Lopes ER. Acute Chagas' Cardiopathy in a Polar Bear (*Ursus Maritimus*) in Guadalajara, Mexico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997 jul-ago,30 (4): 337-340.

Jansen AM, Roque AL. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015. pp. 75-87.

Jansen AM, Roque AL, Xavier SCC. *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: general aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2017. pp. 266-282.

Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*. 2015. 151: 1-15.

Johnson PTJ, Ostfeld RS, Keesing F. Frontiers in research on biodiversity and disease. *Ecology Letters*. 2015. 18: 1119-1133.

Johnson PTJ, Preston DL, Hoverman JT, LaFonte BE. Host and parasite diversity jointly control disease risk in complex communities. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 2013. 110 (42): 16916-16921.

Johnson PTJ, Wood CL, Joseph MB, Preston DL, Haas SE, Springer YP. Habitat heterogeneity drives the host-diversity-begets-parasite-diversity relationship: evidence from experimental and field studies. *Ecology Letters*. 2016. 19: 752-761.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008. 451: 990-994.

Jordano P. (1987). Patterns of mutualistic interactions in pollination and seed dispersal: connectance, dependence asymmetries, and coevolution. *American Naturalist*, 129: 657-677.

Jurberg J, Rodrigues JMS, Dale C, Lamas Jr VD, Peixoto SR, Silva JVT, Galvão C, Rocha DS. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da Doença de Chagas). [Rio de Janeiro]: Instituto Oswaldo Cruz; 2017. 62p.

Kamiya T, O'Dwyer K, Nakagawa S, Poulin R. Host diversity drives parasite diversity: meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography*. 2014. 37: 689-697.

Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*. 2017. 10:287. 17p.

Klotz SA, Schmidt JO, Dorn PL. *Trypanosoma cruzi* Carriage by *Triatoma rubida* and *Triatoma protracta* in a Zoological Park near Tucson, Arizona. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 2013. 86 (4): 373-374.

Kock MD. Wildlife, people and development: veterinary contributions to wildlife health and resource management in Africa. *Tropical Animal Health and Production*. 1996. 28 (1): 68-80.

Kribs-Zaleta CM. Alternative Transmission Modes for *Trypanosoma cruzi*. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2010 jul, 7 (3): 657-673.

Krivitsky P. 2015. statnet.common: Common R Scripts and Utilities Used by the Statnet Project Software. The Statnet Project (<http://www.statnet.org>). R package version 3.3.0, <http://CRAN.R-project.org/package=statnet.common>.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35: 1547-1549.

Kuntz RE, Myers BJ, McMurray TS. *Trypanosoma cruzi*-Like Parasites in the Slow Loris (*Nycticebus coucang*) from Malaysia. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1970. 89 (2): 304-307.

Lafferty KD. Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. *Philos Trans Royal Soc B*. 2012. 367: 2814-2827.

Lainson R, Shaw JJ, Frahia H, Miles MA, Draper CC. Chagas' disease in the Amazon Basin. T. cruzi in silvatic animals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. *Trans R Soc Med Hyg*. 1979. 73:193-204.

Lange RR, Lang A, Allgayer MC, Albuquerque IM, Rossi Junior, JL, Chierosin Neto L. Das práticas em zoológico à especialização dos dias atuais. *Revista CFMV*. 2013 maio-ago, 19 (59): 13-15.

Lazzari, CR. Biologia e Comportamento. In: Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015. pp.64-74.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their Significance as Vectors of Chagas' Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1979. 163 (3): pp. 123-520.

Liborio FA. Estudo dos Primatas *ex situ* no Estado da Bahia e Diagnóstico de Infecção por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. e *Trypanosoma cruzi* [tese de mestrado]. [Salvador]: Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia; 2014. 56f.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski Junior A, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006 (133): 603-611.

Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, Lima NR, Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica*. 2004 (90): 97-106.

Lisboa CV, Monteiro RV, Martins AF, Xavier SCC, Lima VS, Jansen AM. Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): an 11-year follow-up. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015. 110 (3): 394-402.

Lueddeke GR, Kaufman GE, Lindenmayer JM, Strond CM. Preparing society to create the world we need through "One Health" education. *SEEJPH*, 2017. 142: 1-22.

Maeda MH. Triatomíneos sinantrópicos no Distrito Federal, Brasil: ocorrência espaço-temporal e conhecimento dos moradores em relação à Doença de Chagas e seus vetores. [dissertação de mestrado]. [Distrito Federal]: Universidade de Brasília, 2011. 144.

Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr M, Ortiz PA, Campaner M, Taked GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP, Teixeira MMG. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. 2009. *Acta Trop.* 109, 199–207.

Mangini PR, Silva JC. Medicina da Conservação: Aspectos Gerais. In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p. 1258-1268.

Malta MCC, Luppi MM. Marsupialia – Didelphimorphia (Gambá, Cuíca). In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p. 340-357.

Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Carvenicola pilosa*. *Rev Biol Trop.* 1982. 30:107-11.

Martins AV, Gomes AP, Mendonça EG, Fietto JL, Santana LA, Oliveira MG, Geller M, Santos RF, Vitorino RR, Siqueira-Batista R. *Biología del Trypanosoma cruzi: Actualización*. *Infectio.* 2012, 16 (1): 45-58.

Marvulo, MFV. Zoonoses. In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p. 1250-1256.

Medina-Torres I, Vázquez-Chagoyán JC, Rodríguez-Vivas RI, Oca-Jiménez RM. Risk Factors Associated with Triatomines and Its Infection with *Trypanosoma cruzi* in Rural Communities from the Southern Region of the State of Mexico, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010. 82 (1): 49-54.

Mendes PC, Lima SC, Paula MBC, Souza AA, Rodrigues EAS, Limongi JE. Doença de Chagas e a distribuição especial de triatomíneos capturados em Uberlândia, Minas Gerais – Brasil. *Hygeia*, 2008. 3(6): 176-204.

Mills JN, Childs JE. Ecologic Studies of Rodent Reservoirs: Their Relevance for Human Health. *Emerging Infectious Diseases.* 1998 out-dez, 4(4): 529-537.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 2019. Vol. 50 (2).

Ministério do Meio Ambiente (MMA). Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção, 2014. Anexo I da Portaria nº444, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente (MMA). Fonte: Diário Oficial de 17 de dezembro de 2014.

Minoli SA, Lazzari CR. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Tropica*, 2006. 97: 324-330.

Minuzzi-Souza TT, Nitz N, Knox MB, Reis F, Hagström L, Cuba CA, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R. Vector-borne transmission of *Trypanodoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasites & Vectors.* (2016) 9:39.

Molyneux DH. *Trypanosomes of bats*. 2. ed. London: Academic Press; 1991.

Moncayo A, Silveira AC. Current Trends and Future Prospects for Control of Chagas Disease. In: Telleria J, Tibayrenc M. *American Trypanosomiasis, Chagas Disease, One Hundred Years of Research*. 2010. pp. 55-82.

Monteiro RV, Dietz JM, Raboy B, Beck BB, Vleeschower KD, Baker AJ, Martins A., Jansen AM. Parasite community interactions: *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths infecting wild golden lion tamarins *Leontopithecus rosalia* and golden-

- headed lion tamarins *L. chrysomelas* (Callitrichidae, L., 1766). *Parasitol. Res.* 2007 nov, 101 (6): 1689-1698.
- Monteiro RV, Baldez J, Dietz JM, Baker AJ, Lisboa CV, Jansen AM. Clinical, biochemical, and electrocardiographic aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *J. Med. Primatol.* 2006 fev, 35 (1): 48-55.
- Moraes MH, Guarneri AA, Girardi FP, Rodrigues JB, Eger I, Tyler KM, Steindel M, Grisard EC. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasites & Vectors.* 2008. 1: 20. 10p.
- Morand S. (macro-) Evolutionary ecology of parasite diversity: From determinants of parasite species richness to host diversifications. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* 2015. 4: 80-87.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K. Na updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2004. 54: 1861-1875.
- Mubiru JN, Yang A, Dick Junior EJ, Owston M, Sharp RM, VandeBerg JF, Shade RE, Vandeberg JL. Correlation between Presence of *Trypanosoma cruzi* DNA in Heart Tissue of Baboons and *Cynomolgus* Monkeys, and Lymphocytic Myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014, 90 (4): 627-633.
- Nascimento CC, Horta MC. Didelphimorphia (Gambá e Cuíca). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.* São Paulo: Roca, 2014. pp. 761-788.
- Nations JD. A ecologia profunda encontra o mundo em desenvolvimento. In: Wilson EO. *Biodiversidade.* Rio de Janeiro: Nova Fronteira S. A.; 1997. pp. 101-106.
- Neto VC, Yasuda MAS, Amato VS. Doença de Chagas Aguda. In: Dias, JCP, Coura JR. *Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral* [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. 127-134pp.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 2009, 40 (2) 26p.
- Northover AS, Lymbery AJ, Wayne AF, Godfrey SS, Thompson RCA. The hidden consequences of altering host-parasite relationships during fauna translocations. *Biological Conservation.* 2018. 220: 140-148.
- Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S. The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013. 7:11 (e2505).
- Nunes ALV, Catão-Dias JL. Primates – Priamtas do Velho Mundo. In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária.* São Paulo: Roca; 2007. pp.378-401.
- O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodríguez MB. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Tropica.* 1994. 56 (4): 265-287.
- Odum EP. *Ecologia.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 1988. Capítulo 7, Populações em Comunidades; p. 233-281.
- Oliveira JA, Bonvicino CR. Ordem Rodentia. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil.* Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. pp. 347-399.

Oliveira MP, Cortez M, Maeda FY, Fernandes MC, Haapalainen EF, Yoshida N, *et al.* Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: invasion, intracellular growth and nuclear localization. *Acta Trop* 2009;110(1):65-74.

Oliveira RL. Principais Insetos Vetores e Mecanismos de Transmissão das Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: Coura, JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2005. 2 ed. p.75-97.

Olson LC, Skinner SF, Palotay JL, McGhee GE. Encephalitis associated with *Trypanosoma cruzi* in a Celebes black macaque. *Lab. Anim. Sci.* 1986 dez, 36 (6): 667-670.

Orsini H, Bondan EF. Fisiopatologia do Estresse. In: In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2014. pp. 59-68.

Pacheco MXP. Social network structure and personality in captive meerkat, *Suricata suricatta*, populations: assessment, comparison between wild and captive meerkat populations and captive management implications, United Kingdom [tese de doutorado]. University of Exeter, 2017. 225p.

Pan-American Health Organization (PAHO) Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 2009. 92pp.

Paterson S, Piertney SB. Frontiers in host-parasite ecology and evolution. *Mole. Biol.* 2011. 20: 869-871.

Pavarini SP, Oliveira EC, Bandarra PM, Leal JS, Umezawa ES, Rozza DB, Driemeier D. Miocardite chagásica em caninos no Estado do Rio Grande do Sul. 2009. *Ciência Rural*, Santa Maria. 39(4): 1243-1247.

Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Filho HO. Ordem Chiroptera. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. pp.153-230.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection.* 2009. 72 (2): 441-446.

Petry K, Baltz T, Schottelius J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. vespertilionis* by monoclonal antibodies. *Acta Tropica.* 1986. 43 (1): 5-13.

Petry K, Voisin P, Baltz T. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). *Acta Tropica.* 1987. 44 (4): 381-386.

Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaría AM, Calzada JE, Saldaña A. Feeding sources and Trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas Disease endemic area of Amador County, Panama. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2008. 50 (2): 113-116.

Pinto LP, Bedê L, Paese A, Fonseca M, Paglia A, Lamas I. Mata Atlântica Brasileira: os Desafios para Conservação da Biodiversidade de um *Hotspot* Mundial. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. *Biologia da Conservação: Essências.* Ed. 1. São Carlos/SP: Rima, 2006. pp. 91-118.

Pizzi R. Disease Management in Ex-Situ Invertebrate Conservation Programs. In: Fowler ME, Miller RE. *Zoo and Wild Animal Medicine – Current Therapy.* St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. pp. 88-96.

Poulin R, Morand S. Parasite Biodiversity. Smithsonian Institution Press. Washington (DC). 2004. 216p.

Preston DL, Mischler JA, Townsend AR, Johnson PTJ. Disease Ecology Meets Ecosystem Science. *Ecosystems*. 2016. 19: 737-748.

Primack, RB; Rodrigues, E. *Biologia da Conservação*. Londrina: Editora Planta. 2001. 8ª impressão (2007). Capítulo 2, Ameaças à Diversidade Biológica; p. 69-134.

R CORE TEAM. 2019. R: *A Language and Environment for Statistical Computing Vienna*, Austria. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

Rabinovich J, Schweigmann N, Yohai V, Wisnivesky-Colli C. Probability of *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2001. 65:2, 125-130pp.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, *et al.* Trypanosome species in neotropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol* 2014. 22:250-6.

Rassi A, Rezende JM, Luquetti AO, Rassi Jr. A. Clinical Phases and Forma of Chagas Disease. In: Telleria J, Tibayrenc M. *American Trypanosomiasis, Chagas Disease, One Hundred Years of Research*. 2010. pp. 709-741.

Reis FC. *Tripanosomatídeos em mamíferos silvestres e potenciais insetos vetores no Zoológico de Brasília, DF, Brasil*. [dissertação de mestrado]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2018. 73p.

Rezende GC. *Sucesso em Programas de Conservação de Espécies da Fauna Ameaçada: A história do Programa de Conservação do Mico-Leão-Preto*. Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade. [tese de mestrado profissional]. [Nazaré Paulista]: Instituto de Pesquisas Ecológicas; 2013. 130p.

Robinette C, Saffran L, Ruple A, Deem SL. Zoos and public health: A partnership on the One Health frontier. *One Health*. 2017, 3: 1-4.

Rocha FL, Roque ALR, Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, Azevedo FC, Arrais RC, Bilac D, Herrera HM, Mourão G, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* Infection In Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the T. *cruzi* Transmission Chain. *PLoS ONE*. 2013. 8(7):e67463. 12p.

Rodrigues MS, Lima L, Xavier SCC, Herrera HM, Rocha FL, Roque ALR, Teixeira MMG, Jansen AM. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2019. 8: 171-181.

Roque AL, Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Galvão, C. (org.). *Vetores da doença de chagas no Brasil* (online). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. 2015. p. 75-87.

Roque AL, Xavier SC, Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* Transmission Cycle Among Wild and Domestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2008, 79: 742–749.

Rossi HRS. *Comunidade de morcegos e análise de grãos de pólen em pelage de Phyllostomidae (Chiroptera, Phyllostomidae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI, São Paulo, Brasil*. [dissertação de mestrado]. [São Carlos]: Universidade Federal de São Carlos; 2017. 114p.

Rossi RV, Bianconi GV, Pedro WA. Ordem Didelphimorphia. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. pp.27-66.

Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Nova Iorque: Cold Spring Harbor. 2001. 2231p.

Samwyas MJ. Insect Conservation: A Synthetic Management Approach. Annual Review of Entomology. 2007. 52: 465-487.

Santos WJ. *Trypanosoma cruzi* e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil [dissertação de mestrado]. [Botucatu]: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2016. 83p.

Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Bujas MA, Wisnivesky-Colli C. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* em zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health, 1999. 6:6. 371-377pp.

Scofield B. Gaia: The Living Earth – 2.500 Years of Precedentes in Natural Science and Philosophy. In: ScheneideR SH, Miller JR, Crist E, Boston PJ, Torres PR. Scientists Debate Gaia: The Next Century. Cambridge: The MIT Press. Massachusetts Institute of Technology. 2004. p. 151-159.

Seabloom EW, Borer ET, Gross K, Kendig AE, Lacroix C, Mitchell CE, Mordecai EA, Power AG. The community ecology of pathogens: coinfection, coexistence and community composition. Ecology Letters. 2015. 18:401-415.

Secretaria do Meio Ambiente (SMA) de São Paulo (Estado). Plano de Manejo – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Programa Multisetorial de Eco-desenvolvimento do PEFI, Instituto de Botânica, SMA-SP. 2007. 41p.

Silva AN, Xavier AF, Braz IJ. Unidades de Conservação da Natureza. Cadernos de Educação Ambiental – Governo do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 2014, 2 ed. 119p.

Silva MN, Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Timbó RV, Freire LP, Gurgel-Gonçalves R. Infestation of a captive-hedgehog unit by *Panstrongylus megistus* (Triatominae) at the Brasília Zoo. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2017. 2p.

Silva RAS, Mercado VTC, Barbosa GL, Rodrigues VLCC, Wanderley DMV. Current situation of entomological surveillance of Chagas disease in the state of São Paulo. Boletim Entomológico Paulista (BEPa), 2011: 8: 4-13.

Siqueira AF, Ferrioli Filho F, Barretto MP. Estudos sôbre reservatórios e vectores silvestres de *Trypanosoma cruzi*. XVI. Infecção natural do ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. 1967. Med. Trop. São Paulo 9. pp. 155-62.

Smith J. 2002. "Canis lupus" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed February 18, 2019 at https://animaldiversity.org/accounts/Canis_lupus/

Sociedade de Zoológicos e Aquários do Brasil (SZB). Lista de Zoológicos e Aquários do Brasil, divididos por regiões. 2013. Disponível em: <<http://www.szb.org.br/arquivos/zoos-e-aquarios-brasil.pdf>>. Acessado em 03 de janeiro de 2017.

Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. Proc. Nat. Acad. Sci. 1986. 83: 1383-1387.

SOS Mata Atlântica – Fundação SOS Mata Atlântica. Relatório Anual de Atividades 2017. 2017. 108p. Disponível em: <<http://www.sosma.org.br/quem-somos/relatorios-e-balancos/>>.

Souza Jr JC, Ziccardi M, Teixeira HT. Infecção natural por *Trypanosoma cruzi*-like em *Cebus apella xanthosternus* (Wied, 1926), provindo de lida livre, cativo na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. 2004. Anais do Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, Rio de Janeiro (RJ).

Steindel M, Dias Neto E, Pinto CJ, Grisard EC, Menezes CL, Murta SM, *et al.* Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(3):261-7.

Stevens JR. Kinetoplastid Phylogenetics, with Special Reference to the Evolution of Parasitic Trypanosomes. *Parasite*. 2008. 15:226-232.

Tavares DS, Santos AH, Varjão CO, Cruz DN, Conceição AM, Barros SL. Histórico de Atendimentos a Animais Silvestres Durante o Primeiro Semestre de 2013 Realizado pelo GEPAS/SERGIPE. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. 2014, 12 (2): p. 92.

Telford SR, Tonn RJ. Dinamica de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones de un reservorio primario, *Didelphis marsupialis*, en los llanos altos de Venezuela, 1982. *Bol. Oficina. Sanit. Panam.*, 1982. 93:4. 341-364pp.

Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, Nascimento R, Vexenat CA, Silva AR, Ault SK, Costa JM. Emerging Chagas Disease: Trophic Network and Cycle of Transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. 2001. 7 (1): 100-112.

Thompson CK, Wayne AF, Godfrey SS, Thompson RCA. Temporal and spatial dynamic of trypanosomes infecting the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata*): a cautionary note of disease-induced population decline. 2014. *Parasites & Vectors*, 7:169.

Vaz VC, Andrea PS, Jansen AM. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2007. (134): 1785-1793.

Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Marcet PL, Cecere MC, Cardinal MV, Kitron U, Gürtler RE. Seasonal variations in active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* in rural north-western Argentina. *Med. Vet. Entomol*. 2006. 20 (3): 273-279.

Verona CES, Pissinatti A. Primates – Primatas do Novo Mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio). In: Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. pp. 358-377.

Voss RS. Revisionary Notes on Neotropical Porcupines (Rodentia: Erethizontidae) 3. Na Annotated Checklist of the Species of *Coendou* Lacépède, 1799. *American Museum Novitates*, 2011. 3720: 36p.

Voss RS. Superfamily Erethizontidae Bonaparte, 1845. In: Patton JL, Pardiñas UFJ, Elía G. *Mammals of South America*. Vol. 2. Rodents. 2015. pp. 2440-2496.

Wanderley DMV, Silva RA, Carvalho ME, Barbosa GL. Doença de Chagas: a vigilância entomológica do Estado de São Paulo. *Boletim Entomológico Paulista (BEPA)*, 2007. 4 (38): 8-12.

Wilson EO. A situação atual da diversidade biológica. In: Wilson EO. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira S. A.; 1997. p. 3-24.

Wood CL, Johnson PTJ. A world without parasites: exploring the hidden ecology of infection. *Front Ecol Environ*. 2015. 13 (8): 425-434.

Xavier SCC, Roque ALR, Bilac D, Araújo VAL, Neto SFC, Lorosa ES, Silva LFCF, Jansen AM. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014. 8 (5): e2878.

Xavier SCC, Roque ALR, Lima VS, Monteiro KJL, Otaviano JCR, Silva LFCF, Jansen AM. Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012. 6(5): e1647.

Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int*. 57:105-109.

Zhang ZQ. Phylum Arthropoda. In:_____. *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness*. *Zootaxa*. 2013. 3703 (1): 17-26.

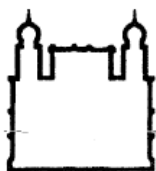
Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Lainson R, Brígido CO, Muniz JA. Trypanosomes of Non-human Primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2000 mar-abril, 95 (2): 157-159.

Zetun CB, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Langoni H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. *Veterinária e Zootecnia*. 2014, mar. 21 (1): 139-147.

APÊNDICE A

Apêndice A: Licença L-050/2016

Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IOC)



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-050/2016

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-037/2016), intitulado “Diagnóstico da infecção por Tripanosomatídeos em mamíferos potenciais reservatórios no Brasil”, sob a responsabilidade de **ANDRÉ LUIZ RODRIGUES ROQUE** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 30/11/2020 e inclui o uso total de:

Animal	espécie ou linhagem	quant (total)	♂	♀	idade	peso	origem (*)
Roedores Silvestres e Sinantrópicos		2000	1000	1000			Silvestre
Marsupiais		1800	1000	800			Silvestre
Morcegos		2000	1200	800			Silvestre
Carnívoros Silvestres		800	400	400			Silvestre
Cingulatas		80	40	40			Silvestre
Píliosos		40	20	20			Silvestre
Cão doméstico	<i>Canis familiaris</i>	2000	1000	1000			Proprietário
Cavalos	<i>Equus caballus</i>	400	200	200			Fazenda
Porcos	<i>Sus domesticus</i>	200	100	100			Fazenda
Ovinos	<i>Ovis aries</i>	200	100	100			Fazenda
Caprinos	<i>Capra a. hircus</i>	200	100	100			Fazenda

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 10 de novembro de 2016.

Flávio Alves Lara

Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

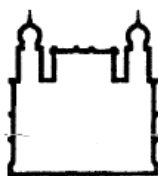
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

APÊNDICE B

Apêndice B: Licença Aditiva LA-009/2017

Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IOC)



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA ADITIVA

LA-009/2017

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação do pesquisador **ANDRÉ LUIZ RODRIGUES ROQUE**, responsável pela licença (L-050/2016), do protocolo (CEUA/IOC-037/2016), intitulado "Diagnóstico da infecção por Tripanosomatídeos em mamíferos potenciais reservatórios no Brasil", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença aditiva tem validade até 30/11/2020 e inclui:

Uso de animais:

Animal	espécie ou linhagem	quant (total)	♂	♀	idade	peso	origem (*)
Roedores Silvestres e Sinantrópicos		2000	1000	1000			Silvestre e FPZSP
Primatas não humanos		50					Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP)
Artiodátilos		10					FPZSP
Carnívoros Silvestres		800	400	400			Silvestre e FPZSP

MÉTODOS DE CAPTURA E SOLTURA (somente em caso de uso de animais silvestres)

Mamíferos cativos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP)

Os mamíferos oriundos da FPZSP serão contidos física e quimicamente de acordo com os protocolos internos da própria instituição. O procedimento, bem como a via de acesso, para coleta do sangue será definida pela equipe de veterinários da FPZSP.

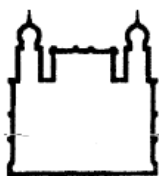
Procedimento 2 - Contenção e Anestesia em Pequenos Mamíferos

...Alternativamente, para a sedação com analgesia dos roedores, será feito uso do protocolo (iii) cloridrato de ketamina (40 a 80 mg/kg) associada ao cloridrato de xilazina (3 a 10 mg/kg) e ao fentanil (0,1 a 0,3 mg/kg), pela via intramuscular. Para a sedação com analgesia dos marsupiais, o protocolo alternativo (iii) será cloridrato de ketamina (10 a 30 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (1 mg/kg) e fentanil (0,01 a 0,1 mg/kg), pela via intramuscular. Para os dois protocolos alternativos, em casos de bradicardia poderá ser feito o uso de atropina (0,03 a 0,05 mg/kg) ou glicopirrolato (0,01 a 0,02 mg/kg), pelas vias intramuscular ou subcutânea. A definição entre os protocolos acima será de responsabilidade do médico veterinário responsável pela coleta de material à campo...

Procedimento 3 - Contenção e Anestesia em Mamíferos de Médio e Grande Porte

... Os mamíferos oriundos da FPZSP serão contidos física e quimicamente de acordo com os protocolos internos aprovados pela própria instituição e definida pelo médico veterinário do Zoológico responsável pela contenção do animal....

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

Procedimento 7 - Eutanásia de Pequenos Mamíferos

... Alternativamente, caso seja necessária a eutanásia dos animais sedados com analgesia em virtude de hipovolemia ou outras debilidades do animal, o protocolo para os roedores será propofol (20 a 35 mg/kg) ou tiopental (40 a 50 mg/kg), pela via intraperitoneal ou intravenosa, podendo ser seguida de Cloreto de Potássio 19,1% (1 mL/kg), pelas mesmas vias de acesso. Já para marsupiais o protocolo será propofol (10 a 20 mg/kg) ou tiopental (10 a 20 mg/kg), pela via intraperitoneal ou intravenosa, podendo ser seguida de Cloreto de Potássio 19,1% (1 mL/kg), pelas mesmas vias de acesso...

Observação: Esta licença aditiva não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 10 de abril de 2017.

**Coordenador CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz**

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

APÊNDICE C

Apêndice C: Autorização para Atividades com Finalidade Científica nº 58262-1



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58262-1	Data da Emissão: 08/05/2017 18:02	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: SUELEN SANCHES FERREIRA	CPF: 358.182.068-40
Título do Projeto: Infecção por Trypanosoma cruzi em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno.	
Nome da Instituição: Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Projeto de Mestrado	04/2017	03/2019
2	Captura de animais cativos (ex situ) da FPZSP e coleta de amostras biológicas dos animais	04/2017	12/2018
3	Captura de animais in situ e coleta de amostras biológicas dos animais	06/2017	12/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As armadilhas utilizadas para captura de mamíferos deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido a hipotermia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	BRUNO ALVES SILVA	Pesquisador colaborador	084.626.437-40	109087353 DETRAN-RJ	Brasileira
2	André Luiz Rodrigues Roque	Pesquisador - Orientador	273.556.108-99	28362324-X SSP-SP	Brasileira
3	Carolina Romeiro Fernandes Chagas	Pesquisadora colaboradora	324.700.598-60	330812191 SSP-SP	Brasileira
4	Caio Filipe da Motta Lima	Pesquisador colaborador	368.199.448-02	443155586 SSP-SP	Brasileira
5	Cauê Monticelli	Pesquisador colaborador	345.940.738-75	422713181 ssp-SP	Brasileira
6	Patricia Locosque Ramos	Pesquisadora colaboradora	263.190.078-26	270955768 SSP-SP	Brasileira
7	Carolina vaz cabral nery	Pesquisadora colaboradora	090.912.757-31	117540906 detran-RJ	Brasileira

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

Código de autenticação: 17643526



Página 1/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58262-1	Data da Emissão: 08/05/2017 18:02	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: SUELEN SANCHES FERREIRA	CPF: 358.182.068-40
Título do Projeto: Infecção por Trypanosoma cruzi em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno.	
Nome da Instituição: Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

8 FABRÍCIO BRAGA RASSY	Pesquisador colaborador	899.437.403-53	95002027611 SSP-CE	Brasileira
9 Marina Galvão Bueno	Pesquisadora - Co-orientadora	251.174.338-82	23878020-x SSP/SP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Didelphimorphia, Marsupialia Megalonychidae, Hyaenidae, Ursus arctos, Leopardus geoffroyi, Sapajus apella, Leontopithecus chrysopygus, Leontopithecus rosalia, Didelphimorphia, Lagomorpha, Mephitidae, Caracal, Canis, Chrysocyon, Dasyprocta, Leptailurus, Rodentia, Panthera, Leopardus tigrinus, Leopardus wiedii, Artiodactyla, Camelus, Viverridae, Ursidae, Tapiridae, Rhinocerotidae, Pitheciidae, Sapajus xanthosternus, Marsupialia, Lycaon, Pan troglodytes, Sphiggurus, Mustelidae, Myrmecophagidae, Primates, Cyclopedidae, Dasypodidae, Felidae, Equidae, Leontopithecus chrysomelas, Sapajus flavius, Leopardus colocolo, Puma concolor, Leopardus pardalis, Tayassu tajacu, Puma yagouaroundi, Hominidae, Herpestidae, Cebidae, Atelidae, Procyonidae, Bradypodidae, Canidae, Callithricidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rodentia, Marsupialia, Didelphimorphia
4	Marcação de animais silvestres in situ	Rodentia, Marsupialia, Didelphimorphia

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Sangue
3	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
4	Amostras biológicas (Tamanduás)	Sangue
5	Amostras biológicas (Tatus)	Sangue
6	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(dardo anestésico / usado em cativeiro)
7	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(dardo anestésico / usado em cativeiro), Puçá, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
8	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta(dardo anestésico / usado em cativeiro), Puçá, Captura manual
9	Método de captura/coleta (Tamanduás)	Puçá, Zaratana de dardo anestésico
10	Método de captura/coleta (Tatus)	Captura manual, Puçá
11	Método de marcação (Carnívoros)	Outros métodos de marcação(Animais da FPZSP)
12	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco
13	Método de marcação (Primates)	Outros métodos de marcação(Animais da FPZSP)
14	Método de marcação (Tamanduás)	Outros métodos de marcação(Animais da FPZSP)
15	Método de marcação (Tatus)	Outros métodos de marcação(Animais da FPZSP)

Destino do material biológico coletado

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

Código de autenticação: 17643526





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58262-1	Data da Emissão: 08/05/2017 18:02	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: SUELEN SANCHES FERREIRA	CPF: 358.182.068-40
Título do Projeto: Infecção por Trypanosoma cruzi em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno.	
Nome da Instituição : Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO	
2	Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	

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

Código de autenticação: 17643526



Página 3/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58262-1	Data da Emissão: 08/05/2017 18:02	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: SUELEN SANCHES FERREIRA	CPF: 358.182.068-40
Título do Projeto: Infecção por Trypanosoma cruzi em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno.	
Nome da Instituição : Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 17643526



Página 4/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58262-1	Data da Emissão: 08/05/2017 18:02	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: SUELEN SANCHES FERREIRA	CPF: 358.182.068-40
Título do Projeto: Infecção por Trypanosoma cruzi em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno.	
Nome da Instituição : Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 17643526



Página 5/5

APÊNDICE D

Apêndice D: Ofício 52/2017/FPZSP/DTC – Projeto de Pesquisa nº423



Ofício nº 52/2017/FPZSP/DTC

São Paulo, 30 de março de 2017.

Senhor Pesquisador,

Informamos Vossa Senhoria que o Projeto de Pesquisa para elaboração de tese de Mestrado Profissional intitulado **“Infecção por *Trypanosoma cruzi* em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e em pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno”**, a ser desenvolvido pela aluna **Suelen Sanches Ferreira**, foi analisado e aprovado pelas instâncias técnico-científicas da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, sob o registro de Projeto nº 423.

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo solicita o envio do Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética da instituição e a aprovação do IBAMA/SISBIO para constar do expediente do Projeto no prazo de quinze dias após o recebimento deste ofício.

Aproveitamos a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de elevada estima e distinta consideração.

Prof. Dr. João Batista da Cruz
Diretor Técnico Científico

Ao Senhor
Prof. Dr. **ANDRÉ LUIZ RODRIGUES ROQUE**
Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP – FIOCRUZ)

c/c: Departamento de Pesquisas Aplicadas
Núcleo de Atividades *In Situ*
Divisão de Ciências Biológicas - Setor de Mamíferos
Núcleo de Análises Clínicas
Núcleo de Biologia Molecular e Microbiologia
Departamento Técnico – Núcleo de Relações Interinstitucionais
Divisão de Veterinária

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
Av. Miguel Stéfano, 4241 – CEP: 04301-905 – Caixa Postal 12.918 – CEP: 04010-970
Tel.: (0xx11) 5073-0811 – Fax.: (0xx11) 5058-0564 – 5073-7238
São Paulo – SP – Brasil
<http://www.zoologico.sp.gov.br>