

JACIARA DE OLIVEIRA JORGE COSTA

**Diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*
em vertebrados silvestres e vetores da área de Sede da Reserva
Legado das Águas- Votorantim, no município de Miracatu, São
Paulo**

São Paulo

2020

JACIARA DE OLIVEIRA JORGE COSTA

Diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em vertebrados silvestres e vetores da área de Sede da Reserva Legado das Águas-Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

De acordo:



Orientador

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3970
FMVZ

Costa, Jaciara de Oliveira Jorge
Diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em vertebrados silvestres e vetores da área de Sede da Reserva Legado das Águas - Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo / Jaciara de Oliveira Jorge Costa. – 2020.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. *Leishmania*. 2. *Trypanosoma*. 3. Mata Atlântica. 4. Zoonoses. 5. Saúde Pública. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diversidade de parasitas dos gêneros Trypanosoma e Leishmania em vertebrados da Reserva Legado das Águas [] Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 1609160318 (ID 005408), sob a responsabilidade de **Arlei Marcili e equipe; Jaciara de Oliveira Jorge Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "Diversity of parasites of the genera Trypanosoma and Leishmania in vertebrates of the Legado das Águas Reserve - Votorantim, in the municipality of Miracatu, São Paulo", utilizing 60 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 1609160318 (ID 005408), under the responsibility of **Arlei Marcili and team; Jaciara de Oliveira Jorge Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **01/2020**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Espécies silvestres brasileiras**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 20 semanas**

N: **60**

Linhagem: **diversas**

Peso: **20 a 3000 g**

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: **58632-1**

Método de Captura: Para pequenos mamíferos silvestres serão utilizadas armadilhas do tipo gaiolas (Sherman) com diferentes atrativos como iscas (mortadela e uma mistura de fubá, sardinha e pasta de amendoim). As armadilhas serão vistoriadas diariamente e os animais capturados serão transportados em sacos de pano. Para a captura de morcegos serão utilizadas redes de neblina ([]mist nest[]) com 3,0 X 6,0 m de comprimento, que serão armadas no início do entardecer e mantidas abertas por um período de 5 a 6 horas. Para algumas espécies de morcegos serão realizadas buscas ativas em abrigos e os animais capturados serão transportados em sacos de pano. Para os diferentes grupos de vertebrados serão utilizadas armadilhas do tipo gaiolas (tamahawk). Em seguida os animais serão anestesiados, para coleta de sangue.

Local do experimento: A captura de animais serão realizadas na Reserva Legado das Águas- Votorantim, no município de Miracatu-SP, e as amostras coletadas serão processadas no laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.

São Paulo, 16 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Camilla Mota Mendes
Vice-Coodenador

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Posicionamento filogenético de *Trypanosoma cruzi* isolados de triatomíneos capturados na Reserva Legado das Águas- Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo.", protocolada sob o CEUA nº 7717280119 (ID 006275), sob a responsabilidade de **Arlei Marcili** e equipe; *Jaciara de Oliveira Jorge Costa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "Phylogenetic positioning of *Trypanosoma cruzi* isolated from triatomines caught in the Legado das Águas-Votorantim Reserve, in the municipality of Miracatu, São Paulo.", utilizing 40 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7717280119 (ID 006275), under the responsibility of **Arlei Marcili** and team; *Jaciara de Oliveira Jorge Costa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **01/2020**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 20 semanas**

N: **40**

Linhagem: **balb c**

Peso: **20 a 3000 g**

Local do experimento: Os camundongos serão mantidos durante todo experimento no Infectório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal- VPS, da FMVZ-USP, Campus Capital.

São Paulo, 16 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: JORGE-COSTA, Jaciara de Oliveira

Título: **Diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em vertebrados silvestres e vetores da área da Sede Reserva Legado das Águas- Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal pela oportunidade de realização do Mestrado e toda disponibilização institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de pós graduação e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Projeto.

Ao Legado das Águas- Reserva Votorantim por todo apoio e auxílio essencial a realização das campanhas de captura, e a todos funcionários da Reserva pela prestatividade e cordialidade a qual sempre recebem e hospedam a equipe de pesquisa. Especialmente ao Miguel Flores, por ter sido fundamental para o sucesso de cada uma das campanhas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlei Marcili, pela grande oportunidade concedida, pela paciência e dedicação a qual empenha à Ciência e ao Ensino, e por todas as correções; cada campo e experimento, e por demonstrar uma real fonte de inspiração e entusiasmo.

Ao Prof. Doutor Herbert Sousa Soares, da Universidade de Santo Amaro (UNISA), pela contribuição indispensável e imensurável para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Cirilo Jorge da Silva e Tania Aparecida de Oliveira Silva, por desde sempre serem o apoio, motivação e incentivo fundamental para todos os passos na minha jornada acadêmica, e que as limitações não são barreiras intransponíveis.

Ao meu marido, Yunkler Phillip, por dividir comigo com muito amor e paciência, todas as alegrias e angústias da pós graduação, e sempre me incentivar a seguir em frente.

Aos meus colegas de pesquisa em 'Filogenia, Taxonomia e Diagnostico Molecular de tripanossomatídeos', da USP e UNISA, em especial ao Ryan, Giovanna, Isabella, Thiago Chiachello, Luis Eduardo, e Thiago Fakelmann.

A todos professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, em especial a Carolina, Yara, Ana Beatriz, Lina, Bruna, Mara e Bianca.

A todos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, em especial aos técnicos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Renato Caravieri e Dra. Hilda Pena, por todo suporte técnico e acompanhamento nas rotinas laboratoriais, e ao Secretário Danival Lopes, por todo apoio fundamental com protocolos e documentações.

As pessoas que contribuíram indiretamente, mas com toda dedicação me deram a base fundamental para que eu pudesse ter condições de estar na Pós Graduação e realizar este trabalho, aos quais serei sempre grata: Matias Pablo Juan Szabó, Maria Marlene Martins e Amália Regina Mar Barbieri.

RESUMO

JORGE-COSTA, J O. **Diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em vertebrados silvestres e vetores da área da Sede Reserva Legado das Águas- Votorantim, no município de Miracatu, São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Protozoários da família Trypanosomatidae, representam importante papel para saúde humana e animal, apresentando ciclos de vida monoxeno e heteroxeno, onde na alternância de hospedeiros, podem infectar o ser humano. O gênero *Leishmania* possui ciclos silvestre e urbano, infectando principalmente mamíferos silvestres e cães domésticos como hospedeiros vertebrados. As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas a estes hospedeiros através da picada de invertebrados hematófagos da família Psychodidae, e possui duas apresentações clínicas principais quando infecta o ser humano: visceral e cutânea; onde a forma visceral é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* na América e Europa, e pela espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia. A Leishmaniose Visceral está classificada como uma das Doenças Tropicais Negligenciadas pela OMS. O gênero *Trypanosoma* possui uma subdivisão baseada no desenvolvimento dos parasitas no trato digestivo do vetor; em duas Seções, Salivaria e Stercoaria, além também das divisões em diversos Clados, baseado em filogenia molecular; e a separação em três subgêneros: *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*. No subgênero *Schizotrypanum* está classificada a espécie *Trypanosoma cruzi*, que possui bastante complexidade epidemiológica, e capacidade de infectar mamíferos de todas as ordens, inclusive o ser humano. No ser humano o *T. cruzi* causa a Doença de Chagas, transmitida por diversas espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rodnius* e *Panstrongylus*. A Doença de Chagas também está classificada no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas da OMS. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* na Reserva Legado das Águas – Votorantim, na região do Vale do Ribeira, sul do estado de São Paulo, uma região de Mata Atlântica preservada, a fim de contribuir para o melhor entendimento dos ciclos de transmissão desses parasitas, e acrescentar conhecimento ao estudo dessas zoonoses. Foram capturados 324 pequenos mamíferos das ordens Rodentia, Chiroptera e Marsupialia, através de armadilhas do tipo gaiolas e redes de neblina. Foi coletado sangue e tecidos destes animais, onde o sangue foi distribuído em

hemoculturas e ambos submetidos a testes moleculares. Foram também capturados triatomíneos (barbeiros) e tabanídeos (mutucas), através de busca ativa e redes de neblina (para tabanídeos). As hemoculturas não demonstraram crescimento de parasitas, e a análise molecular corroborou tais resultados negativos. Foram capturados 16 espécimes de triatomíneos, dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*. Através destes foram obtidos 11 isolados classificados como *Trypanosoma cruzi* II, e uma sequência obtida classificada como *Trypanosoma cruzi* IV. Foram capturados três tabanídeos, que possibilitou a obtenção de duas sequências de conteúdo intestinal, caracterizadas como *Trypanosoma terrestris*. Estes tabanídeos ainda serão classificados a nível de espécie através da análise molecular. Através da captura de animais foi possível atestar a biodiversidade e nível de preservação ambiental da Reserva Legado das Aguas – Votorantim, e ainda demonstrar que há a circulação de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vetores e potenciais vetores, necessitando ainda de mais estudos para determinar quais vertebrados mantem os ciclos ativos, e ainda determinar a capacidade vetorial de tabanídeos para a espécie *Trypanosoma terrestris*, que ainda não possui vetores caracterizado.

Palavras-chave: *Leishmania*. *Trypanosoma*. Mata Atlântica. Zoonoses. Saúde Pública.

ABSTRACT

JORGE-COSTA, J O. **Diversity of parasites of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild vertebrates and vectors of the headquarters Reserva Legado das Águas- Votorantim area, in the municipality of Miracatu, São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Protozoa of the Trypanosomatidae family, play an important role for human and animal health, presenting monoxene and heteroxene life cycles, where in alternating hosts, they can infect humans. The *Leishmania* genus has wild and urban cycles, mainly infecting wild mammals and domestic dogs as vertebrate hosts. The species of the genus *Leishmania* are transmitted to these hosts through the bite of blood-sucking invertebrates of the Psychodidae family, and it has two main clinical presentations when it infects humans: visceral and cutaneous; where the visceral form is caused by the species *Leishmania (Leishmania) infantum* in America and Europe, and by the species *Leishmania (Leishmania) donovani* in Asia. Visceral Leishmaniasis is classified as one of the Neglected Tropical Diseases, by the WHO. The *Trypanosoma* genus has a subdivision based on the development of parasites in the vector's digestive tract; in two Sections, Salivaria and Stercoaria, in addition to the divisions in several Clados, based on molecular phylogeny; and the separation into three subgenera: *Herpetosoma*, *Megatrypanum* and *Schizotrypanum*. In the subgenus *Schizotrypanum*, the species *Trypanosoma cruzi* is classified, which has a lot of epidemiological complexity, and is capable of infecting mammals of all orders, including humans. In humans, *T. cruzi* causes Chagas disease, transmitted by several species of triatomines of the genera *Triatoma*, *Rodnius* and *Panstrongylus*. Chagas' disease is also classified in the WHO Neglected Tropical Diseases group. The present study aimed to investigate the occurrence of parasites of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* in the Legado das Aguas Reserve - Votorantim, in the Vale do Ribeira region, south of the state of São Paulo, a region of preserved Atlantic Forest, in order to contribute to better understanding of the transmission cycles of these parasites, and adding knowledge to the study of these zoonoses. 324 small mammals of the orders Rodentia, Chiroptera and Marsupialia were captured, using cage-type traps and mist nets. Blood and tissues were collected from these animals, where the blood was distributed in blood cultures and both subjected to molecular tests. Triatomines and tabanids were also captured, through active search and fog nets (for tabanids). Blood

cultures did not show parasite growth, and molecular analysis corroborated these negative results. 16 specimens of triatomines, of the genera *Triatoma* and *Panstrongylus*, were captured. Through these 11 isolates classified as *Trypanosoma cruzi* II were obtained, and a sequence obtained classified as *Trypanosoma cruzi* IV. Three tabanids were captured, which made it possible to obtain two sequences of intestinal content, characterized as *Trypanosoma terrestris*. These tabanids will still be classified at the species level through molecular analysis. Through the capture of animals it was possible to attest to the biodiversity and environmental preservation level of the Legado das Aguas Reserve - Votorantim, and to demonstrate that there is the circulation of parasites of the genus *Trypanosoma* in vectors and potential vectors, requiring further studies to determine which vertebrates keeps the cycles active, and also determine the vectorial capacity of tabanids for the species *Trypanosoma terrestris*, which does not yet have characterized vectors.

Keywords: *Leishmania*. *Trypanosoma*. Atlantic Rainforest. Zoonoses. Public Health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Ocorrência e distribuição dos triatomíneos de importância epidemiológica, segundo município de residência de captura e ano de notificação, 2012 e 2016. (Extraído de: Doença de Chagas Aguda e distribuição dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016 SVS/MS, 2019).....	14
Figura 02- - Localização da Sede da Reserva Legado das Águas, na Região sul do Estado de São Paulo, no Vale do Ribeira. Criado em: Ahoy Map Maker Abdulqadir Rashik © Miavy Systems 2016-2020).....	19
Figura 03- - Trilhas de passagem de visitantes, onde foram montadas as armadilhas para captura de pequenos mamíferos, onde a : trilha bike; b e c : trilha Estufa. Fotos: Herbert Sousa Soares.).....	20
Figura 04 - Armadilhas do tipo <i>Tomahawk</i> e do tipo <i>Shermman</i> , utilizadas no trabalho para captura de pequenos mamíferos. Fotos: Herbert Sousa Soares.	21
Figura 05- Árvore filogenética inferida por parcimônia e análise Bayesiana com base nas sequências genéticas SSUrDNA e <i>Trypanosoma rangeli</i> como grupo externo. Os números dos nós correspondem a 1000 replicatas de <i>bootstrap</i> e ao valor da probabilidade <i>a posteriori</i>	28
Figura 06. Árvore filogenética inferida por parcimônia e análise Bayesiana com base nas sequências genéticas SSUrDNA e <i>Phytomonas</i> sp. como grupo externo. Os números dos nós correspondem a 1000 replicatas de <i>bootstrap</i> e ao valor da probabilidade <i>a posteriori</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Espécies de pequenos mamíferos capturados e resultados de hemoculturas examinadas no estudo.25

Tabela 02. Espécies de triatomíneos capturados na Reserva Legado das Águas e resultado parasitológico para a presença de formas compatíveis a família Trypanosomatidae.27

OMS – Organização Mundial da Saúde;
WHO – World Health Organization
DTU – Unidade Discreta de Tipagem;
DTN – Unidades Discretas de Tipagem
SSU rDNA – Ácido desoxirribonucleico da pequena subunidade ribossomal
(Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid);
gGAPDH – Proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Glyceraldehyde-3-
Phosphate Dehydrogenase);
ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva;
SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo;
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana;
Km – Quilômetro;
M – metro;
Mg – miligrama;
ML – mililitro;
Kg – quilo;
°C – Graus Celsius;
MZUSP – Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo;
ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade;
DNA – Ácido desoxirribonucleico;
PCR – Reação em cadeia da polimerase;
µL – Microlitro;
BAB – '*Blood Ágar Base*';
LIT – '*Liver infusion Tryptose*';
PBS – '*Phosphate Buffer Solution*';
TAE – Tampão Tris acetado EDTA;
FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo;
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais;
CBT – Código de identificação na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.2 Família Trypanosomatidae	15
1.3 Gênero <i>Leishmania</i>	16
1.4 Gênero <i>Trypanosoma</i>	17
1.4.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4.1.2 Vetores da Doença de Chagas.....	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. A área do Estudo	30
4.2. Captura e Identificação dos Animais	31
4.3. Captura de triatomíneos	34
4.4. Captura de tabanídeos	34
4.5. Isolamento de tripanossomatídeos (<i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>) de animais vertebrados.	34
4.6. Isolamento e Cultivo de tripanossomatídeos de Triatomíneos.	34
4.7. Preservação Dos Tripanossomatídeos na Coleção de Culturas.	35
4.8. Extração de DNA e Reações de Amplificação de sangue e tecidos de mamíferos.	35
4.9. Purificação e Sequenciamento.	35
4.10. Alinhamento das Sequências Obtidas e Inferências Filogenéticas.	36
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXO 01 Formulário de autorização para realização da captura e manipulação dos animais, expedida pelo Ministério do Meio Ambiente.	65

1. INTRODUÇÃO

1.2 Família Trypanosomatidae

A Família Trypanosomatidae (Akhoundi et al., 2017) pertencente à ordem Kinetoplastida e compreende protozoários flagelados (Honigberg, 1963) que, juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida) compõem o filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981, 1993). A família Trypanosomatidae pertence ainda a subordem Trypanosomatina, onde todos os membros são parasitas, diferente da subordem Bodonina, que compreende parasitas e espécies de vida livre (Lom 1976; Vickerman 1976).

Os membros da Família Trypanosomatidae são de importância médica, médica veterinária e econômica, além de interesse ecológico e ambiental. Podem apresentar ciclo de vida monoxênico, que utilizam um hospedeiro apenas, ou heteroxênico, mais de um hospedeiro durante o ciclo. Estão distribuídos em quatorze gêneros, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento. 11 destes gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina*, *Argomonas*, *Blechomonas*, *Paratrypanosoma*, *Strigomonas*, *Sergeia* e *Rynchoidomonas*) um gênero que parasita invertebrados e espécies vegetais (*Phytomonas*) (Hoare & Wallace, 1966; Vickerman, 1994, Camargo, 1998) e três que apresentam forma heteroxênica, parasitando invertebrados e animais vertebrados durante seu ciclo de vida (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) Depois dos nematóides, os tripanosomatídeos são os eucariotos que apresentam a maior variedade de hospedeiros e de distribuição geográfica (Vickerman, 1976; 1994; Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2006).

Hipóteses fundamentadas em reconstruções que utilizaram como base a filogenia molecular e dados biogeográficos e paleontológicos tentam explicar a origem do parasitismo dos tripanosomatídeos e dos ciclos heteroxênico dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Os estudos filogenéticos indicam diferentes histórias evolutivas para os cinetoplastídeos, dependendo do número de amostras, dos grupos externos utilizados, dos genes e sequências analisados, dos alinhamentos e dos métodos utilizados para as inferências filogenéticas. Em geral, se admite que a adoção do ciclo de vida heteroxênico ocorreu, independentemente, várias vezes ao longo da história evolutiva dos Euglenozoa (Vickerman 1994; Maslov & Simpson 1995; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2007). Dentre os gêneros que parasitam

vertebrados, destacam-se os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* que podem parasitar e causar doença também no homem (Hoare, 1972).

1.3 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). São cerca de 30 espécies no total, infectando diferentes espécies de mamíferos. Podem se apresentar nas formas amastigota ou promastigota, formas que se diferenciam morfológicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, e presença de flagelo livre e membrana ondulante (Hoare, 1972; Vickerman, 1994). Possui dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, subdivididos de acordo com o local do tubo digestivo do vetor onde o parasita na forma promastigota se desenvolve até a forma infectante (Lainson e Shaw, 1978).

Os insetos associados como principais vetores das espécies do gênero *Leishmania* são os chamados Flebotomíneos (mosquito-palha, birigui, tatuquira), denominação dada aos indivíduos da família Psychodidae subfamília Phlebotominae (Galatti e Ovallos, 2012; Mcintyre et. al., 2017). A principal espécie de flebotomíneo descrita em associação aos ciclos de transmissão da Leishmaniose Visceral no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis*, que possui ampla distribuição no país, cobrindo todas as áreas de ocorrência endêmica da doença (Forattini et. al., 1970; Galvis-Ovallos et. al., 2017). Além desta espécie principal, outras têm sido descritas com importante capacidade vetorial para os protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as principais: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia olmeca nociva*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia anduzei*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia whitmani* e *Psychodopygus wellcome* (Ready et. al., 1983; Barbosa et. al., 2008; Rezende et. al., 2009; Carvalho et. al., 2010; Thies et. Al., 2016).

A apresentação clínica causada por parasitas deste gênero compõe um grupo de doenças com grande diversidade epidemiológica e sintomatológica, se apresentando em duas formas principais: tegumentar e visceral. A forma visceral possui caráter zoonótico e é umas das mais importantes doenças em Saúde Pública nos continentes asiático, africano, e na América Latina; possuindo ampla distribuição geográfica nestes (Ashford et al., 1992). No continente americano, a Leishmaniose Visceral é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* do Novo Mundo, apresentado proximidade genética a *L. (L.) infantum* do Velho Mundo, causadora de

Leishmaniose Visceral na região do Mediterrâneo (Europa e África) (Marcili et al., 2014). Esta proximidade infere a recente especiação entre as duas, além de demonstrar que a recente introdução da espécie no Continente pode ser embasada pela inexistência de variabilidade genética recentemente demonstrada entre isolados de diversos Biomas do Brasil. (Silva et al., 2019). Separadamente destas, nas regiões asiáticas do Nepal, Paquistão, Bangladesh e Índia, o agente causador da Leishmaniose Visceral é a *L. (Leishmania) donovani*. (Maurício et al., 1999; Maurício et al., 2000; Kuhls et al., 2005; Quispe-Tintaya et al., 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses integram o grupo das seis doenças tropicais mais importantes no Velho Mundo e nas Américas (Ministério da Saúde, 2004).

Humanos e cães domésticos são os principais hospedeiros vertebrados do gênero *Leishmania*, além de mamíferos silvestres. Em áreas endêmicas os cães são encontrados com altas taxas de infecção, e podem permanecer por muitos anos sem sinais clínicos mesmo com um intenso parasitismo favorecendo o ciclo de transmissão da doença para o homem porque, normalmente, estes animais vivem dentro ou próximos as habitações humanas atuando como reservatório do parasita (Ashford, 1996; Moreno e Alvar, 2002; Dantas-Torres et al., 2007; Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). No meio silvestre os reservatórios conhecidos são os canídeos (Deane e Deane, 1954; Deane e Deane, 1955; Alencar, 1961; Lainson et al., 1969; Courtenay et al., 2002; Lainson e Rangel, 2005; Figueiredo et al., 2008), felinos (Savani et al., 2004; Dahroug et al., 2010), roedores (Lainson e Rangel, 2005), marsupiais do gênero *Didelphis* (Travi et al., 1994; Lainson e Rangel, 2005;) e morcegos (Lima et al., 2008; Costa et al., 2015). Recentemente o gênero foi descrito também encontrado em gatos domésticos (*felis catus*) numa área endêmica na Amazônia brasileira, porém esta espécie não tem papel ainda comprovado como reservatório do patógeno (Rocha et al., 2019).

1.4 Gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* possuem grande variedade de hospedeiros e vetores invertebrados nos diferentes seus ciclos de vida, incluindo no grupo de vertebrados mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. (Hoare, 1972; Simpson et. al., 2006; Hamilton et. al., 2007; Stevens, 2008).

Foram definidos agrupamentos em duas Secções, diferenciadas pelo local de desenvolvimento e diferenciação dos parasitas no organismo do invertebrado vetor, e a via de eliminação das formas infectantes (Hoare, 1964).

A secção Salivaria compreende as espécies que se desenvolvem no tubo digestivo e glândulas salivares do vetor, a mosca tsé-tsé, (gênero *Glossina*), e são eliminados em formas tripomastigotas metacíclicas por inoculação, durante a picada do vetor. Nesta secção estão os subgêneros: *Trypanozoon* (espécie tipo *Trypanosoma brucei*), *Duttonella* (espécie tipo *Trypanosoma vivax*), *Pycnomonas* (espécie tipo *Trypanosoma suis*) e *Nannomonas* (espécie tipo *Trypanosoma congolense*), abrangendo todos os tripanossomas Africanos patogênicos aos mamíferos, transmitidos por tabanídeos do gênero *Glossina* (Wiedemann, 1830). As espécies *T. vivax* e *T. evansi* são as únicas que possuem ocorrência fora do continente Africano, inclusive na América, por terem se associados com sucesso a outros gêneros de invertebrados das famílias Tabanidae e Muscidae (mutucas e moscas). (Hoare, 1972; Ventura et. al., 2001; Cortez et. al., 2006). Estes subgêneros citados na secção Salivaria foram determinados, em estudos recentes, como um único grupo monofilético de *Trypanosoma* do continente Africano, transmitidos pelo vetor pertencente ao gênero *Glossina*, conhecida como mosca tsé-tsé (Stevens et. al., 2001; Hamilton et. al., 2004; Adams et. al., 2010).

A Secção Stercoaria compreende as espécies que se desenvolvem exclusivamente no sistema digestivo do vetor, transmitidas pela contaminação por fezes contendo as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas. Esta secção possui ampla distribuição geográfica, e estão incluídos os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie tipo *T. cruzi*) *Herpertosoma* (espécie tipo *T. lewisi*), e *Megatrypanum* (espécie tipo *T. theileri*) (Hoare, 1964; 1972). Desta Secção, apenas *T. cruzi* possui capacidade de infectar o ser humano e também de causar patologia aos hospedeiros vertebrados, tendo como exceção apenas casos humanos descritos por *T. lewisi-like* (Sarataphan et. al., 2007).

Nas últimas décadas, estudos moleculares filogenéticos dividiram o gênero *Trypanosoma* em Clados.

O Clado de *Trypanosoma cruzi*, inclui além do *T. cruzi*, as espécies que parasitam exclusivamente os morcegos (Chiroptera), no novo e velho mundo, e associados a transmissão por invertebrados da família Triatominae (Stevens et al., 2001; 2008; Hamilton et al., 2004; 2007; Lima et. al., 2012).

Clado *Trypanosoma brucei*, agrupando os tripanossomas de origem africana, originalmente transmitidos por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.).(Stevens et al., 1999a, b, 2001; Hamilton et. al., 2008; Van Den Bossche et. al., 2010). Dentre as espécies deste clado está o *Trypanosoma brucei gambiense*, causador da Tripanossomíase Africana, conhecida como “Doença do Sono”, classificada como uma das de maior relevância no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas pela OMS. (WHO, 2013).

Clado Aquático, dividido em dois subclados, o primeiro de *Trypanosoma* de peixes e um isolado de ornitorrinco associados a evidências que sugerem a transmissão por sanguessugas aquáticas; e o segundo de isolados de anfíbios anuros, transmitidos por flebotomíneos (Psychodidae)(Jakes et al., 2001a,b; Hamilton et. al., 2007; Ferreira et. al., 2008).

Clado de *Trypanosoma theileri*, abrangendo as espécies de *Trypanosoma* relacionadas com mamíferos da ordem *Artiodactyla*; e o Clado de *Trypanosoma lewisi*, agrupando as espécies transmitidas por pulgas que parasitam preferencialmente pequenos mamíferos das ordens Rodentia, Lagomorpha e Insetivora (Hamilton et. al., 2005, 2007; Sarataphan et al., 2007; Maia da Silva et. al., 2010).

Clado *Trypanosoma grayi* que abriga os tripanossomas de crocodilianos nos continentes americano e africano (Viola et. al.,2009).

Clado de *Trypanosoma cyclops*, formado por isolados de diferentes espécies vertebradas na região da Malásia e Austrália, e com a possível associação a sanguessugas da família Haemadipsidae como vetores invertebrados (Weinman, 1972; Hamilton et. al., 2005).

Clado de *Trypanosoma avium/Trypanosoma corvi*, o grupo de tripanossomas de aves, transmitidos por diversas espécies de invertebrados (Votypka et. al., 2002, 2012).

Clado das espécies que parasitam cobras e lagartos no Brasil e continente Africano transmitidos por flebotomíneos (Psychodidae), abriga além da espécie *Trypanosoma gennarii*, isolada de marsupiais no Brasil (Hamilton et. al., 2007; Ferreira et. al., 2008; Viola et al., 2008; Ferreira et. al., 2017).

Posterior a estes, um novo clado foi criado através de uma nova espécie descrita, o Clado de *Trypanosoma terrestris*, isolada de antas (*Tapirus terrestris*) no estado do Espírito Santo - Brasil, e com vetor ainda não determinado (Acosta et. al., 2013).

O subgênero *Herpertosoma* classifica os tripanossomas não patogênicos aos hospedeiros mamíferos. É dividido em dois grupos principais: *T. rangeli*, isolado de humanos, animais silvestres e triatomíneos e *T. lewisi*, que parasita ratos e mais de 80 espécies de animais silvestres (Hoare, 1972). O *T. rangeli* possui característica similar ao *T. cruzi*, a de infectar mamíferos de todas as ordens, parasitando primatas, roedores, morcegos, marsupiais e edentados, inclusive com a capacidade de infectar também o homem. Este parasita é encontrado apenas nas Américas Central e Sul (Guhl & Vallejo, 2003). No Brasil foi descrito em diferentes mamíferos e triatomíneos, principalmente na região amazônica, onde foram descritos os únicos casos humanos no país (Coura et al., 1996; Maia Da Silva et al. 2004a,b). Apesar de ser transmitido de forma inoculativa, como outros membros da secção Salivaria esta espécie se mostra mais relacionado com o *T. cruzi* que com os as espécies africanas, segundo análises filogenéticas baseadas em sequências de SSUrDNA (Stevens et al., 1999; 2001; Briones et al., 1999; Maia da Silva et al., 2004a,b). Os isolados de *T. rangeli* de diferentes regiões ecogeográficas e hospedeiros podem ser divididos em pelo menos quatro linhagens (Maia da Silva et al., 2004a), dado corroborado por análises filogenéticas baseadas no gene ribossômico (SSU e ITS), que confirma também o polimorfismo da espécie (Grisard et al., 1999; Maia da Silva et al., 2004b).

O subgênero *Megatrypanum* (*T. theileri*) infecta animais domésticos e silvestres de praticamente todas as ordens de mamíferos incluindo espécies de animais silvestres das ordens: Artiodactyla, Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Edentata e Primata (Hoare, 1972). Caracterizado pela diversidade de espécies e de hospedeiros mamíferos e invertebrados, este subgênero frequentemente infecta os animais domésticos, pertencentes a família *Bovidae* (bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, etc.). *Trypanosoma theileri* é encontrado em bovídeos e cervídeos de do mundo todo (*T. theileri-like*). Isolados de cervos, ovelhas e cabras têm sido classificados como diferentes espécies, de acordo com o hospedeiro (Hoare, 1972). Embora um número reduzido de isolados tenha sido analisado, estudos filogenéticos baseados no gene ribossômico indicam que este subgênero é polifilético (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2007; Rodrigues et al., 2006).

No subgênero *Schizotrypanum* estão classificadas algumas espécies de tripanossomas descritos apenas em morcegos (Chiroptera), dentre elas: *Trypanosoma cruzi marinkellei* descrita na América central e Sul, *Trypanosoma dionisii* na América do Sul, *Trypanosoma vespertilionis* descrito em todos continentes exceto Oceania,

Trypanosoma erneyi, *Trypanosoma livingstonei* e *Trypanosoma pipistrelli* no continente Africano; *Trypanosoma hipposideri* e *Trypanosoma pteropi* na Austrália, *Trypanosoma hedricki* e *Trypanosoma myotis* na América do Norte; *Trypanosoma phyllostomae* e *Trypanosoma cruzi* em toda a América Latina, e porção sul dos Estados Unidos. (Hoare 1972; Marinkelle 1976; Molyneux 1991; Marcili et al., 2009c; Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012; Lima et al., 2013). Estas espécies são indistinguíveis apenas pela morfologia, e são amplamente distribuídas (Hoare, 1972),

Neste subgênero está classificado a espécie *Trypanosoma cruzi*, que além de infectar o ser humano e ser o agente da Doença de Chagas, possui capacidade de parasitar uma larga variedade de mamíferos, incluindo roedores (Rodentia) e morcegos (Chiroptera) (Costa et al., 2015; Marcili et al., 2009a; 2009b; 2009c).

1.4.1.1 *Trypanosoma cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* é o agente da Doença de Chagas e frequentemente encontrado infectando animais silvestres, onde centenas de espécies já foram descritas infectadas (Cavazzana et al. 2010 ; Roellig et al. 2013 ; Jansen et al. 2015; Jansen et al. 2018). São denominados três ciclos de transmissão de *T. cruzi* envolvendo o vetor: silvestre, doméstico e peridoméstico. No ciclo estritamente silvestre, é raro envolvimento humano, e a transmissão é feita por triatomíneos hematófagos (barbeiros), que habitam fendas em árvores, palmeiras e abrigos de animais. No ciclo doméstico são envolvidos além do homem, animais domésticos que vivem nas áreas próximas a atividade humana, e a transmissão é feita por triatomíneos domiciliados. Por fim há o ciclo peridoméstico, onde ocorre sobreposição dos dois anteriores, por meio do contato com os reservatórios silvestres ou por meio dos vetores que sejam atraídos eventualmente a esses domicílios (Coura et al., 2002).

A espécie de *T. cruzi* possui sete linhagens já descritas, sendo seis linhagens geneticamente semelhantes denominadas DTU, ou “Unidades Discretas de Tipagem” (*discrete typing unit*) nomeadas de TcI a TcVI (Zingales et al. 2009), onde TcV e TcVI são descritas como linhagens híbridas, onde foram propostos dois modelos de origem inicialmente: um onde a hibridização antiga entre TcI e TcII que originaram os atuais DTUs de TcIII e TcIV foi seguida por um *backcross* de TcII e TcIII, gerando TcV e TcVI como linhagens heterozigóticas, chamado de modelo ‘Duas hibridizações’ proposto por Westenberger et al., 2005. E um segundo modelo, o ‘Três ancestrais’ onde os três

genótipos ancestrais são TcI, TcII e TcIII e os DTU's híbridos TcV e TcVI foram originados hibridização de TcII e TcIII. A origem do TcIV não foi abordada neste modelo (Freitas et al., 2006). Evidências experimentais que apóiam um ou outro modelo são apresentadas em outros estudos (Zingales et al., 2012). As linhagens TcI e TcII são consolidadas em diversas análises como linhagens puras, que se divergiram das demais a bastante tempo na evolução (Machado e Ayala, 2001; Brisse et al., 2003; Sturm et al., 2003; Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Sturm e Campbell, 2010; Lewis et al., 2011). A sétima DTU foi descrita recentemente associada principalmente a morcegos, denominada TCBat (Marcili et al. 2009b).

As DTUs TCII, TCV e TCVI são as linhagens associadas a Doença de Chagas em pacientes da porção sul da América do Sul, sendo a TCII associada com casos agudos graves e casos crônicos no Brasil, nas regiões da Mata Atlântica e Brasil Central, transmitidos por triatomíneos domiciliados (Miles et al., 2009).

TCI foi descrito ocorrendo originalmente em pacientes humanos na região amazônica e nos países logo ao norte desta região, causando alterações patológicas leves, sugerindo que esta DTU teria um caráter clínico mais brando que as outras linhagens (Miles et al. 1981b). Porém em contramão destes dados anteriores, em descrições recentes foi demonstrado TCI causando quadros clínicos de cardiomiopatia e meningoencefalite em países endêmicos para a Doença de Chagas, como em regiões da Venezuela (Añez et al. 2004; Burgos et al. 2008). Já linhagem TCIII possui rara associação com ciclos domésticos, e um ciclo silvestre bem delineado, sendo associado com mamíferos silvestres terrestres como tatus (*Dasypus novemcinctus*), (*Euphractus sexcinctus*), gambás (*Monodelphis brevicaudata*) e diversos roedores terrestres (Yeo et al. 2005; Marcili et al. 2009c). A linhagem TCIV possui poucos dados sobre seu ciclo silvestre porém aparece como segunda linhagem associada a pacientes humanos na Venezuela (Miles et al. 1981), e também foi isolado em um surto de Doença de Chagas Aguda por contaminação via oral na cidade de Belém, estado do Pará, Brasil, de onde se originou a cepa de referência da linhagem (CANIII) (Miles et al. 1978).

Todas as linhagens possuem a capacidade descrita de causar clinicamente a Doença de Chagas em humanos, porém possuem perfis epidemiológicos distintos, contribuindo para isto a variação filogeográfica das linhagens. Além disso, vários estudos também apontam para ciclos silvestres das linhagens de *T. cruzi* bastante

complexos (Fernandes et. al., 1999; Lisboa et. al., 2004; 2006; 2008; Marcili et. al., 2009a; 2009b; 2009c).

A infecção humana pelo *T. cruzi* pode ocorrer por diversas portas de entrada do parasita no organismo do hospedeiro, porém as duas de maior importância epidemiológica são a transmissão vetorial através do repasto sanguíneo e contaminação por fezes do triatomíneo, e a infecção via oral pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de triatomíneos ou com o próprio triatomíneo triturado acidentalmente com o alimento (Coura 2015). A Doença de Chagas está classificada pela OMS no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (WHO, 2013), e está delimitada primariamente ao continente americano, fator associado a distribuição e abundância dos invertebrados que fazem a transmissão vetorial (*Triatominae, Hemiptera, Reduviidae*) e por isso a doença é conhecida também como tripanossomíase americana (WHO, 2015).

A Doença de Chagas apresenta um curso clínico bifásico, onde o período de incubação varia de 4 a 15 dias, e inicialmente apresenta um quadro agudo, com o parasita predominantemente na corrente sanguínea do paciente, onde os sintomas vão de febre alta prologada por mais de sete dias, associada a outros sintomas inespecíficos, como diarreia, prostração, cefaleia, mialgias, aumento de gânglios linfáticos e manchas vermelhas na pele; a alguns de maior complexidade clínica, como a cardiopatia aguda e as manifestações hemorrágicas, além dos sinais característicos como edema palpebral na fase aguda, chamado sinal de *Romãña* ou o chagoma de inoculação (Rassi et. al., 2000; Ministério da Saúde, 2005; Pinto et. al., 2008). Este quadro inicial tende naturalmente ao desaparecimento gradual dos sintomas associado com a queda da parasitemia sanguínea, e o aumento da produção de anticorpos (Ministério da Saúde, 2013) . A Doença de Chagas aguda vem ocorrendo com menor frequência nos países endêmicos, inclusive no Brasil, onde o controle da transmissão vetorial (especialmente por *T. infestans*) e sanguínea foi de extrema importância nesta diminuição de casos (Ministério da Saúde, 2005; 2015).

A fase crônica tem o início geralmente assintomático sem sinais de comprometimento cardíaco ou digestivo. A evolução desta fase se caracteriza pelo desenvolvimento ao longo de anos e tende a três formas clínicas: uma denominada indeterminada, onde não há evolução com comprometimento de órgãos, e o paciente pode permanecer assintomático pela maior parte da vida, com ou sem a evolução tardia de sintomas (Almeida et. al., 2007) . E duas formas determinadas da Doença

de Chagas crônica que são: a digestiva, com a formação de megacólon e megaesôfago; e a cardíaca, que evolui frequentemente em Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) e é a responsável pela maior parte da mortalidade em casos de Chagas crônica (Rassi & Marin-Neto, 2000; Xavier et. a., 2005). Pode ocorrer também a associação destas duas formas, com comprometimento cardiodigestivo.

Atualmente tem se discutido a associação da Doença de Chagas com outras patologias de caráter crônico degenerativo que causem imunossupressão, onde esta comorbidade alteraria o curso clínico e a mortalidade pela Doença de Chagas, devido ao comprometimento imune do paciente (MS, 2006; Almeida et. al., 2011).

Um grande número de isolados de diversas espécies de mamíferos, vetores e pacientes com diferentes formas clínicas, representativos de ampla distribuição ecogeográfica foi indispensável para uma melhor compreensão do relacionamento das diversas linhagens de *T. cruzi* com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (Fernandes et. al., 1999; Lisboa et. al., 2004; 2006; 2008; Marcili et. al., 2009a; 2009b; 2009c).

1.4.1.2 Vetores da Doença de Chagas

Os hospedeiros invertebrados que desempenham o papel de vetor da Doença de Chagas são triatomíneos conhecidos genericamente como barbeiros (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Estes insetos vetores possuem o hábito hematófago em todas as suas seis formas de desenvolvimento entre a primeira ninfa e o adulto, e estão associados a abrigos de animais silvestres em diferentes nichos ecológicos desde os terrestres como tocas e abrigos rochosos, assim como cavernas, ninhos de aves e palmeiras (Jansen et al. 2015; 2018). Os principais gêneros envolvidos com o ciclo de transmissão do *T. cruzi* são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Silveira et al., 1984; Carcavallo et al., 1999; Lent & Wygodzinsky, 1979). Por muitos anos as espécies associadas majoritariamente com o ciclo doméstico da Doença de Chagas foram o *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, sendo o primeiro adaptado ao ambiente doméstico (Aragão 1971), e o segundo habitando naturalmente ecótopos definidos em palmeiras na região amazônica e América Central, ainda que com a capacidade de invadir ambientes antropizados (Schofield & Dias 1999).

Ao total são 148 espécies de barbeiros conhecidas, sendo 65 destas encontradas no Brasil diferentes distribuições geográficas (**Figura 01**), onde 42 destas têm o registro de ocorrência apenas no país (Carcavallo et al., 1985; Luitgards-Moura et al., 2005; Leite et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Almeida et al., 2008; Massaro et

al., 2008 ; Abad-Franch et al., 2009; Carbajal de la Fuente et. al.,2009; Gurgel-Gonçalves & Cuba, 2009; Gurgel-Gonçalves & Silva, 2009; Pavan et. al., 2009).

A distribuição geográfica de algumas espécies dentro dos gêneros de importância no contexto epidemiológico da Doença de Chagas no Brasil apresentam forte ligação a variação ambiental e Biomas específicos, como *Rodnius neglectus* e *Triatoma sordida* de ocorrência limitada ao Cerrado, *Rodnius nasutus* e *Panstrongylus lutzi* na Caatinga, *Rodnius robustus* e *Rodnius pictipes* na Amazônia, *Rodnius domesticus* e *Triatoma tibiamaculata* com a Mata Atlântica, *Triatoma rubrovaria* e *Panstrongylus tupynambai* com os Pampas e, finalmente, *Triatoma baratai* e *Panstrongylus guentheri* com o Bioma Pantanal (Carcavallo et. Al., 1999; Almeida et. al., 2008; Abad-Franch & Monteiro, 2009; Gurgel-Gonçalves R & Cuba, 2009; Pavan, 2009;). Outras espécies como *Panstrongylus geniculatus* e *Panstrongylus megistus* ocorreram em mais diversos estados brasileiros e em pelo menos três diferentes Biomas, mostrando grande potencial de adaptação a diferentes condições ambientais (Carcavallo et al., 1985; Leite et al., 2007)

Desde a década de 1960 programas nacionais de controle de triatomíneos têm sido associados a diminuição da incidência de transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil, e em 2006 o país foi certificado pela Organização Panamericana da Saúde e pela OMS como livre de transmissão por *T. infestans* no ciclo doméstico (Dias, 2015).

Atualmente no Estado de São Paulo é mantido um programa regular de controle de triatomíneos domiciliados, por meio da intervenção da Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), que realiza o controle químico em residências e estudo analítico periódico da eficácia do programa.

Legenda

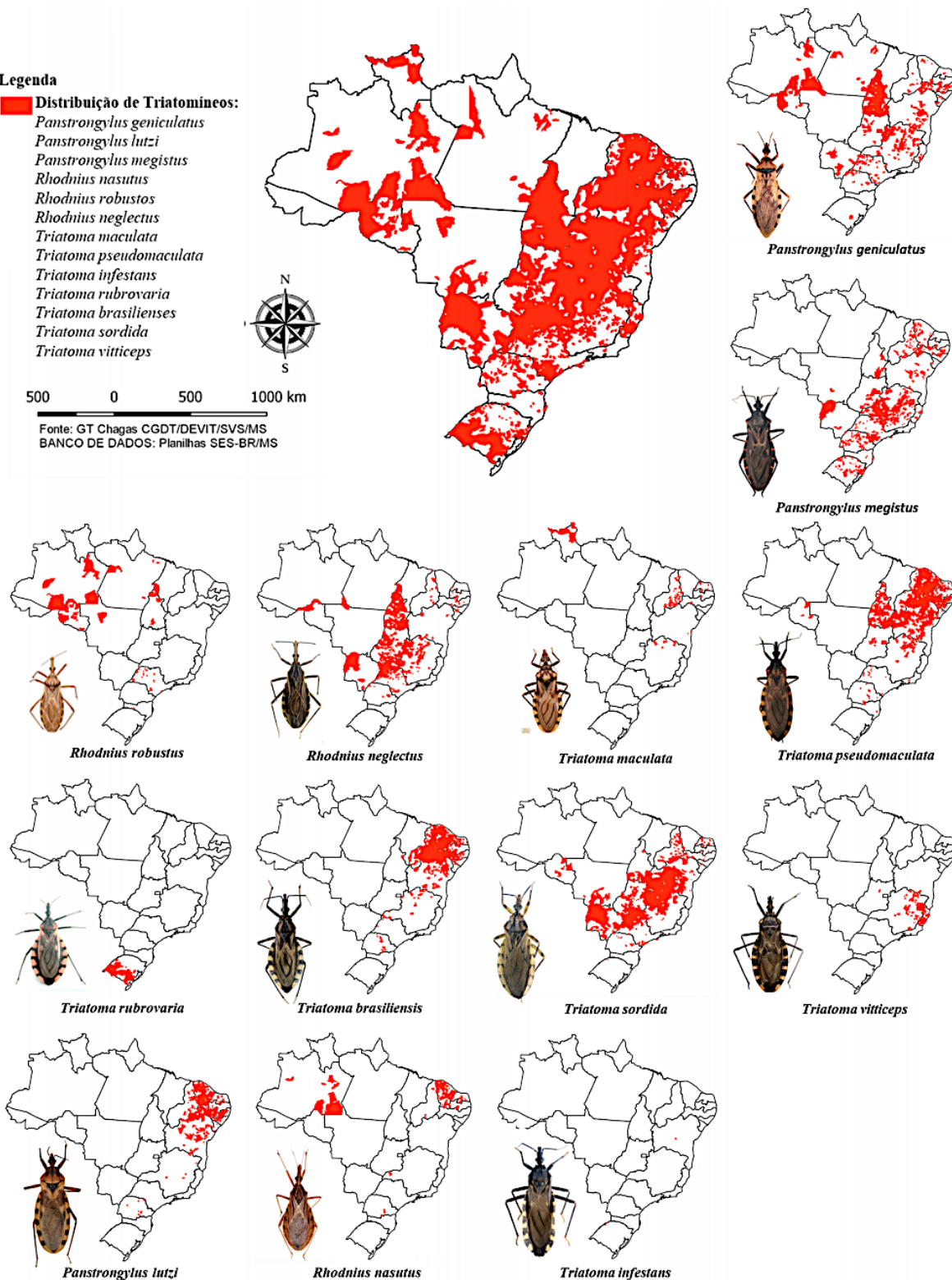
Distribuição de Triatomíneos:

- Panstrongylus geniculatus*
- Panstrongylus lutzi*
- Panstrongylus megistus*
- Rhodnius nasutus*
- Rhodnius robustus*
- Rhodnius neglectus*
- Triatoma maculata*
- Triatoma pseudomaculata*
- Triatoma infestans*
- Triatoma rubrovaria*
- Triatoma brasiliensis*
- Triatoma sordida*
- Triatoma vitticeps*



500 0 500 1000 km

Fonte: GT Chagas CGDT/DEVIT/SVS/MS
BANCO DE DADOS: Planilhas SES-BR/MS



Fonte: CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em dezembro/2016.

Figura 01- Ocorrência e distribuição dos triatomíneos de importância epidemiológica, segundo município de residência de captura e ano de notificação, 2012 e 2016. (Extraído de: Doença de Chagas Aguda e distribuição dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016 SVS/MS, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo o Boletim Epidemiológico de 2019 da Secretaria de Saúde do estado de São Paulo, no período de 1999 a 2017 foram notificados 2.858 casos autóctones de Leishmaniose Visceral humana no estado com letalidade de 8,6%, e verificou-se também uma tendência de dispersão espacial da doença pelos municípios do oeste do Estado para o interior, distribuindo gradualmente pelos municípios nas margens da rodovia Marechal Rondon (SP 300). O mesmo Boletim também registrou o início de registros de casos de Leishmaniose Visceral no município de Votorantim, região de Sorocaba a partir de 2017, que corrobora com a tendência de dispersão recente da doença pelo interior do estado de São Paulo.

A ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) encontra-se em processo de expansão no estado de São Paulo, e a região do Vale do Ribeira é a que apresenta, ao longo desta expansão, as taxas de incidência mais altas. Foram correlacionados com esta alta incidência na região, a cobertura vegetal, o relevo e presença de flebotomíneos (Domingos et. al., 1998; Neves et. al., 1999; Neves et. al., 2002).

Um levantamento entomológico feito em todo o estado de São Paulo, em 2011, registrou a ocorrência das espécies *Triatoma sordida* e *Triatoma tibiamaculata*, principalmente, no fragmento de Mata Atlântica do Vale do Ribeira, detectando ainda o maior índice de infecção natural na espécie *T. tibiamaculata* por *T. cruzi*, atribuída a sua correlação ambiental com sua associação com animais mamíferos silvestres (Silva et. al., 2011).

A Mata Atlântica é um dos biomas com a maior diversidade de mamíferos (De Carvalho & De Oliveira, 2015), além de apresentar altos índices de biodiversidade e endemismo, e é apontada com uma das 33 áreas de prioridade de Conservação em todo o planeta (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2004). A Mata Atlântica está reduzida a apenas 13,1% da sua distribuição original, fato atribuído a intensa exploração e antropização desordenada, ao longo da expansão populacional e formação de diversos centros urbanos que estão diretamente inseridos no bioma Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2019).

Estudos investigativos do ciclo silvestre dos tripanossomatídeos são de extrema importância devido ao caráter zoonótico destes, e o risco constante de exposição acidental de seres humanos a estes patógenos na realização de atividades

econômicas e de lazer envolvendo áreas de cobertura vegetal nativa, ou mesmo áreas de transição, além da possibilidade de eventual sobreposição do ciclo silvestre com ciclos domiciliares ou peridomiciliares, envolvendo seres humanos e animais domésticos que estão nestas áreas em constante contato direto ou indireto aos animais silvestres.

Outros estudos já foram realizados em áreas antropizadas, mas pouco se sabe sobre a diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em áreas com altos níveis de preservação ambiental, como o que é demonstrado na Reserva Legado das Águas, onde há a mescla de um importante trecho de Mata Atlântica com alto grau de preservação ambiental; e a constante interação humana através diversas atividades de Ecoturismo, a apenas 122km da cidade mais populosa do país, com intensa atividade humana em seus entornos.

Assim, propomos o estudo da ocorrência de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, na reserva Legado das Águas, uma área preservada, a fim de contribuir para o conhecimento das relações de diversidade dos parasitas com níveis de preservação ambiental, o levantamento de informações sobre os potenciais reservatórios de tripanossomatídeos neste ambiente, e assim, contribuir para estabelecimento de padrões adequados de vigilância epidemiológica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem por objetivo principal o conhecimento da diversidade de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em mamíferos silvestres e seus vetores da área da Base da Reserva Legado das Águas- Grupo Votorantim, no município de Miracatu, estado de São Paulo

3.2 Objetivos Específicos

1. Isolamento de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* de animais silvestres capturados na área da Sede da Reserva Legado das Águas- Grupo Votorantim, no município de Miracatu, estado de São Paulo.

2. Caracterização molecular e morfológica dos isolados obtidos e de amostras diretas colhidas dos animais silvestres e domésticos capturados da Reserva Legado das Águas- Grupo Votorantim, no município de Miracatu, estado de São Paulo.

3. Diagnóstico molecular para os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* dos animais silvestres e domésticos capturados na Reserva Legado das Águas – Grupo Votorantim, no município de Miracatu, estado de São Paulo.

4. Posicionamento filogenético dos parasitas detectados baseado em sequências dos genes ribossômico (SSUrDNA) e gliceraldeído fosfato desidrogenase (gGAPDH).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP sob N° 1609160318 e N° 7717280119.

4.1. A área do Estudo

A reserva Legado das Águas (24° 01'49" S 47° 21'07" W) está no Vale do Ribeira, sul do estado de São Paulo, na porção sul do corredor ecológico da Serra do Mar. Com 31 mil hectares, a Reserva está ligada contiguamente a diversas outras Unidades de Conservação, contribuindo num importante corredor ecológico entre as áreas de litoral e interior da região sul do Estado de São Paulo. Está a 122 km da capital do estado, e inserida no município Miracatu correspondendo a maior área contínua de Mata Atlântica remanescente que sofreu mínima intervenção humana, fator atribuído a baixa densidade demográfica e pouco desenvolvimento econômico, na região.

A área é considerada a maior Reserva Privada de Mata Atlântica do país, e recebem investimentos em sua proteção em 1947, quando o grupo Votorantim S. A. adquiriu a área para manter a preservação das nascentes da bacia do rio Juquiá, que já gerava energia para seus empreendimentos, e desde 2012 a área tem, se voltado para a exploração do Ecoturismo como atividade principal.

Uma mostra da diversidade e do grau de preservação da Reserva Legado das Águas é a ocorrência de espécies de mamíferos ameaçados de extinção em outras áreas do país, como o cachorro do mato vinagre (*Speothos venaticus*); e a anta albina (*Tapirus terrestris*), além da presença de grandes felinos como onça-parda (*Puma concolor*) que foram ambos observados por meio de armadilhas fotográficas instaladas nas áreas da Reserva.

A Reserva possui várias bases de apoio técnico, tanto adaptadas para o Ecoturismo quanto para as atividades das quatro usinas que se encontram dentro do seu território delimitado. O presente estudo foi realizado na área da Sede administrativa (**figura 02**), onde há um maior fluxo de atividades de visitantes e de circulação de animais domésticos, devido ao risco de transbordamento de patógenos tanto de origem silvestre para o meio doméstico, quanto o inverso.

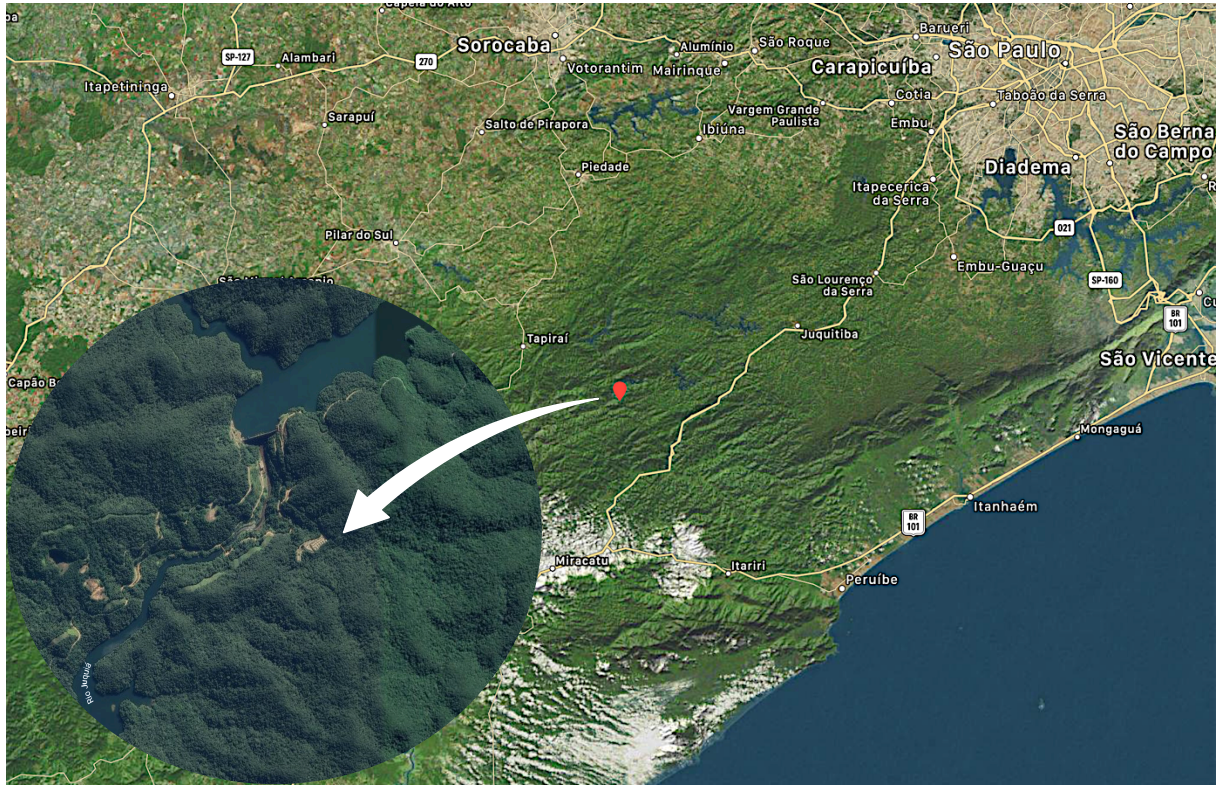


Figura 02- - Localização da Sede da Reserva Legado das Águas, na Região sul do Estado de São Paulo, no Vale do Ribeira. Criado em: Ahoj Map Maker Abdulqadir Rashik © Miavy Systems 2016-2020.

4.2. Captura e Identificação dos Animais

Foram realizadas três campanhas de campo nos meses de janeiro, julho e dezembro de 2018, com seis dias de armadilhas de captura para roedores e marsupiais e cinco noites de capturas de morcegos em rede, em cada campanha.

Para captura dos animais foram selecionadas três áreas, que são trilhas já utilizadas para o ecoturismo comercial (trilha Cambuci, *Bike-Cambuci* e trilha da Estufa) (**figura 03**). Estas trilhas começam na Sede, e se aprofundam na mata passando através de diversos quilômetros de extensão por micro ambientes diversificados. A trilhas Cambuci e *Bike-Cambuci* são de contínuo fluxo de visitantes, com vegetação ligeiramente mais seca e alterada pela presença constante de visitantes, e nestas duas as armadilhas foram colocadas nas adjacências da passagem, entendendo-se até cerca de um quilômetro de extensão a partir da entrada de cada trilha. Já a trilha Estufa possui uma passagem suspensa artificial, que corre ao longo de uma vegetação bastante diversificada e úmida e sobre um córrego. Nesta trilha as armadilhas foram distribuídas por um trajeto diferente do demarcado para visitantes, seguindo uma passagem de animais, com vegetação mais conservada e úmida em relação as outras duas e bastante variação de inclinação do solo.

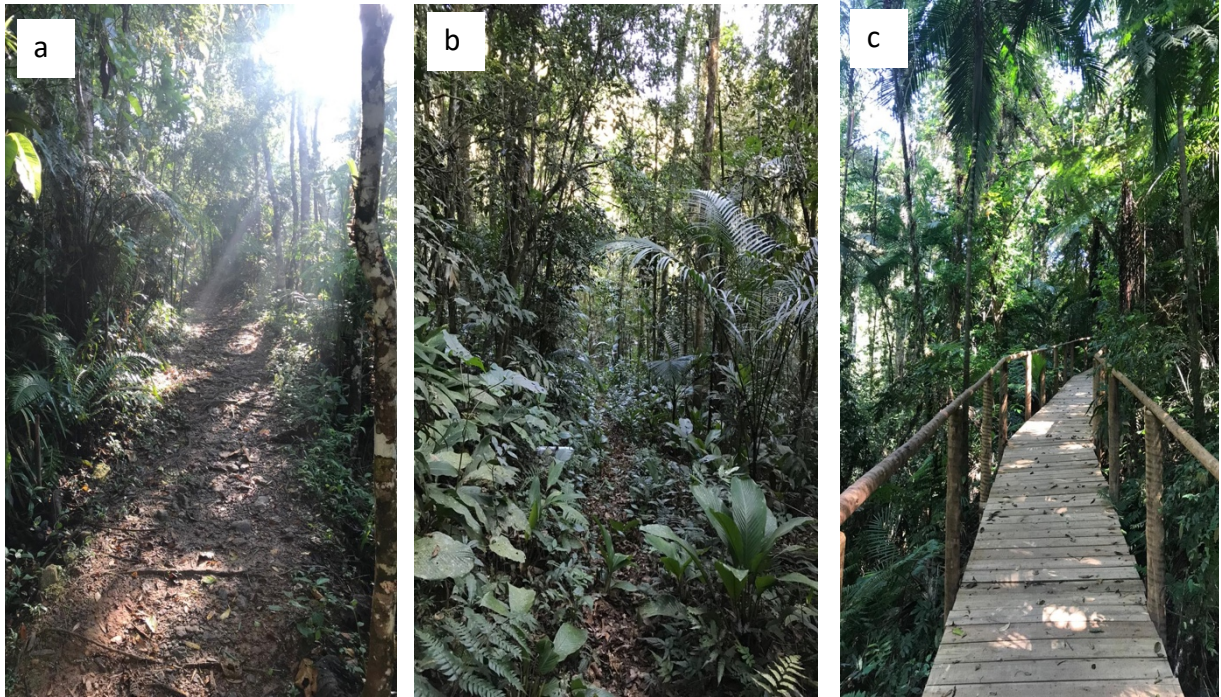


Figura 03- - Trilhas de passagem de visitantes, onde foram montadas as armadilhas para captura de pequenos mamíferos, onde **a**: trilha bike; **b** e **c**: trilha Estufa. Fotos: Herbert Sousa Soares.

A captura dos animais silvestres foi determinada de acordo com os grupos pretendidos, para pequenos mamíferos terrestres (roedores e marsupiais) foram utilizadas armadilhas do tipo *Sherman* e *Tomahawk* (**figura 04**) com isca atrativa (uma mistura de fubá, sardinha, óleo de coco e pasta de amendoim).

Em cada uma das três áreas amostradas foram dispostas 40 estações de captura distantes 20 metros em média entre si, seguindo as margens da trilha de passagem de visitantes. Cada estação foi composta por duas armadilhas, sendo uma do modelo *Tomahawk* colocada preferencialmente no solo e uma *Shermman* posicionada sobre galhos quando possível. As iscas foram repostas pontualmente conforme necessidade, e trocadas de todas as armadilhas a cada dois dias. Foi utilizado um total de 240 armadilhas, totalizando um esforço de captura de 8640 armadilhas/dia por campanha e com um total de 25920 armadilhas/dia no projeto.



Figura 04 - Armadilhas do tipo *Tomahawk* (esq.) e do tipo *Shermman* (dir.), utilizadas no trabalho para captura de pequenos mamíferos. Fotos: Herbert Sousa Soares.

Para a captura de morcegos foram utilizadas redes de neblina (*"mist nest"*) com 3,0 X 6,0 m de comprimento, armadas no início do pôr do sol e mantidas abertas por um período de das 18 as 22 horas, por 5 noites a cada campanha. Totalizando um esforço de captura de 175 horas/noite por campanha e com um total de 525 horas/noite. Para algumas espécies de morcegos foram realizadas buscas ativas em abrigos e os animais capturados transportados em sacos de pano ate o laboratório montado em campo.

Os animais e foram identificados com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais (Emonns & Feer, 1990; Vizotto & Tadei, 1973; Bonvicino et al., 2008). Após a captura, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue realizada ou por punção cardíaca, ou pela veia caudal ou cefálica, além de alíquotas de sangue total e de tecidos (baço e fígado) coletadas para estudos moleculares. Alguns exemplares de animais cuja identificação da espécie não foi possível a campo foram eutanasiados por meio da sedação com xilazina (1mg/kg) e quetamina (10mg/kg), seguida de inalação com Isoflurano e posteriormente fixados em formol 10% para posterior identificação e transportados ao laboratório para depósito no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Além destes animais onde ao foi possível a campo, por padronização e mediante autorização do ICMBio, foi também eutanasiado um indivíduo por espécie capturada, para depósito como espécime testemunho, por não haver nenhuma descrição anterior das espécies de pequenos mamíferos que ocorrem na área da Reserva.

4.3. Captura de triatomíneos

A captura de triatomíneos foi realizada na área da Sede da Reserva, mediante busca ativa aos arredores dos domicílios e construções, com foco nas lâmpadas e outras fontes de luz que pudessem atrair estes vetores. Os exemplares capturados foram acondicionados em recipientes plásticos até serem identificados e examinados.

A identificação dos triatomíneos foi feita morfológicamente de acordo com Lent e Wygodzinsky (1979). Após a identificação, os exemplares foram dissecados, examinados quanto à presença de formas compatíveis com os parasitas de interesse no tubo digestivo e glândulas salivares.

4.4. Captura de tabanídeos

Os tabanídeos foram capturados utilizando as redes de neblina na mesma metodologia de captura de morcegos e também através de coleta manual nas áreas onde houve relatos da observação de circulação de mamíferos com armadilha fotográfica pelos próprios monitores da Reserva. Após a captura, os tabanídeos foram mantidos em recipientes de plástico com algodão úmido e adaptação para ventilação para posterior análise. Estes exemplares foram dissecados, e o conteúdo intestinal colocado em álcool absoluto, para ser submetido ao mesmo protocolo de extração de DNA e PCR as quais foram submetidas as amostras de tecido de pequenos mamíferos visando a pesquisa de parasitas, bem como para posterior tentativa de identificação molecular da espécie de Tabanidae.

4.5. Isolamento de tripanossomatídeos (*Leishmania* e *Trypanosoma*) de animais vertebrados.

A tentativa de isolamento de espécies de tripanossomatídeos de amostras dos pequenos mamíferos foi realizada através da coleta de sangue por punção cardíaca, e semeado cerca de 100-200 µL de sangue em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (*blood ágar* base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (contendo soro fetal bovino e antibióticos) (Camargo, 1963). Este processo foi realizado em duplicata quando coletado quantidade de sangue suficiente. Estes tubos foram acondicionados a 28°C, e examinados através da observação de uma gota do conteúdo em lâmina, em microscópio de luz semanalmente por três meses.

4.6. Isolamento e Cultivo de tripanossomatídeos de Triatomíneos.

Quando observada a presença de formas compatíveis com tripanossomatídeos, o intestino do triatomíneo foi acrescido de PBS 1x e Gentamicina numa concentração de 4mg/mL, para posterior inoculação peritoneal em dois camundongos Balb/c e estes mantidos sob observação por 20 dias. Após este período, os camundongos foram eutanasiados e o sangue retirado por punção cardíaca e inoculado em meio bifásico composto por BAB (Blood Agar Base) acrescido de LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 28°C, para o acompanhamento do crescimento de formas compatíveis com tripanossomatídeos.

4.7. Preservação Dos Tripanossomatídeos na Coleção de Culturas.

As espécies de tripanossomatídeos foram mantidas criopreservadas na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal FMVZ-USP. Os isolados foram mantidos congelados em nitrogênio líquido, e cultivados a 25-28°C.

4.8. Extração de DNA e Reações de Amplificação de sangue e tecidos de mamíferos.

Foi utilizado o kit comercial de extração de DNA Kit PureLink® (ThermoFisher), baseado nas recomendações e protocolos do fabricante para as amostras de sangue e tecido dos animais silvestres capturados. Todas as amostras extraídas foram submetidas a quantificação de DNA em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) antes de seguirem para a etapa seguinte de amplificação.

Os oligonucleotídeos e condições das reações que foram utilizadas para a amplificação da SSUrDNA, Citocromo B, gGAPDH, e catepsina *L-like*, estão descritos em trabalhos anteriores (Maia Da Silva et. al., 2004; 2007; Rodrigues et. al., 2006; Marcili et. al., 2009a, 2009b; 2009c; Hamilton et. al., 2004, 2007; Silva et al., 2019)

4.9. Purificação e Sequenciamento.

Fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com Sybr Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific). Os amplificados foram purificados utilizando o ExoSAP-IT® (Applied Biosystems), e os fragmentos

de DNA amplificados e purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator® (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer® (Perkin Elmer).

4.10. Alinhamento das Sequências Obtidas e Inferências Filogenéticas.

As sequências obtidas dos diferentes genes utilizados como alvo foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelos programas programa Clustal X® (Thompson *et al.*, 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “*indels*” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01® (Nicholas *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram inferidas por análise bayeseana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR *Branch-breaking*”). As análises de suporte por “*bootstrap*” foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca. As análises bayeseanas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2® (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Para a verificação de suporte de ramos nas análises Bayeseanas foram utilizados os valores de probabilidade a *posteriori* obtidos com o programa MrBayes v.3.1.2®. As matrizes de similaridade (baseadas em distância p não corrigida) foram construídas utilizando o programa Poit Replacer v.2.0® disponibilizado pelo autor (Alves, J. M.) no endereço <http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>

5. RESULTADOS

Foram capturados 327 indivíduos, sendo 37 marsupiais, 172 roedores e 118 morcegos, pertencentes a 30 gêneros (**Tabela 01**).

Tabela 01. Espécies de pequenos mamíferos capturados e resultados de hemoculturas examinadas no estudo.

Ordem	Família	Gênero e Espécie	Indivíduos por espécie	Positivos/Examinados em hemocultura
-------	---------	------------------	------------------------	-------------------------------------

Rodentia

		<i>Brucepattersonius</i>	1	0/1
	Família Muridae	sp.		
		<i>Delomys</i> sp.	1	0/1
		<i>Euryoryzomys</i>		
		<i>russatus</i>	147	0/147
		<i>Hyalaemys</i> sp.	4	0/4
		<i>Oligoryzomys</i> sp.	9	0/9
		<i>Oxymycterus</i> sp.	2	0/2
		<i>Sooretamys angoya</i>	1	0/1
		<i>Oryzomys</i> sp.	7	0/7
Ordem	Família			
Didelphiamorpha	Didelphidae	<i>Didelphis aurita</i>	2	0/2
		<i>Gracilinanus</i>		
		<i>microtarsus</i>	1	0/1
		<i>Marmosops</i> sp.	2	0/2
		<i>Metachirus</i>		
		<i>nudicaudatus</i>	29	0/29
		<i>Micoureus</i> sp.	3	0/3
Ordem Chiroptera	Família			
	Emballonuridae	<i>Saccopteryx leptura</i>	21	0/21
	Família			
	Molossidae	<i>Molossus ater</i>	1	0/1
		<i>Molossus molossus</i>	1	0/1
		<i>Nyctiomops</i>		
		<i>laticaudatus</i>	5	0/5
	Família		4	0/4
	Phyllostomidae			
		<i>Artibeus cinereus</i>	6	0/6
		<i>Artibeus fimbriatus</i>	4	0/4
		<i>Artibeus gnomus</i>	1	0/1
		<i>Artibeus lituratus</i>	9	0/9
		<i>Artibeus obscurus</i>	2	0/2
		<i>Anoura caudifer</i>	9	0/9
		<i>Carollia perspicillata</i>	18	0/18
		<i>Chiroderma doriae</i>	1	0/1
		<i>Glossophaga</i>		
		<i>soricina</i>	1	0/1
		<i>Lonchorhina aurita</i>	1	0/1
		<i>Micronycterys</i>		
		<i>microtis</i>	1	0/1
		<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1	0/1
		<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	0/1
		<i>Sturnira lillium</i>	13	0/13
		<i>Uroderma bilobatum</i>	1	0/1
		<i>Trachops cirrhosus</i>	2	0/2
		<i>Myotis nigricans</i>	12	0/12
	Família			
	Vespertilionidae	<i>Myotis riparius</i>	2	0/2
		<i>Eptesicus</i> sp.	2	0/2

Foram examinadas 532 hemoculturas dos pequenos mamíferos, e não houve registro de crescimento de parasitas com morfologia compatível dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*.

As análises moleculares pelo método de PCR foram realizadas em 395 amostras de DNA extraídas de sangue e tecidos (baço e fígado) dos animais, e testadas para os genes SSUrDNA, Citocromo B, gGAPDH, para a detecção de tripanossomatídeos em geral.

Todas as 395 amostras foram ainda testadas para o diagnóstico específico de *Leishmania infantum* baseado do gene Catepsina L-like (Silva et al. 2019) e todas as amostras testadas também foram negativas para este gene. Uma outra reação de PCR realizada foi para o gene Citocromo B de mamíferos (Steuber et. al., 2005), feita por amostragem, para conferir a eficácia da extração de DNA, e confirmou uma extração satisfatória.

Foram capturados e encaminhados para análise do conteúdo intestinal 16 espécimes de triatomíneos adultos identificados morfologicamente em duas espécies distintas: *Panstrongylus megistus* e *Triatoma tibiamaculata*. Dos examinados, sete indivíduos apresentaram formas compatíveis com protozoários da família Trypanosomatidae no intestino, conforme demonstrado na **Tabela 03**. Três espécimes não tiveram o conteúdo intestinal examinado pois não resistiram ao transporte até o laboratório. Posteriormente a visualização, cada conteúdo intestinal positivo foi submetido ao protocolo de inoculação em camundongos, para a tentativa de isolamento do parasita visualizado.

Foram obtidos 11 isolados provenientes dos triatomíneos (**Tabela 03**). Esses isolados foram caracterizados através da região SSUrDNA e gGAPDH e as sequências alinhadas. Estes isolados foram provenientes da inoculação em camundongos.

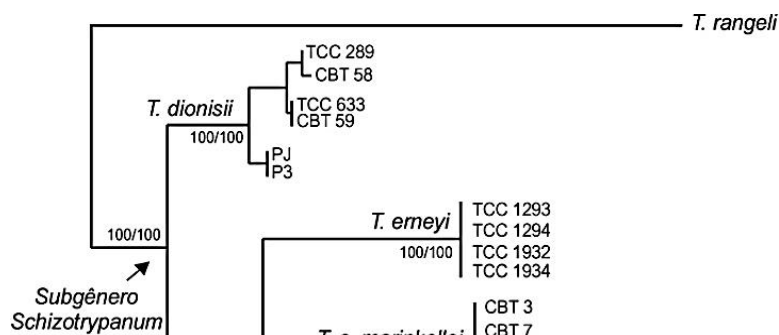
Tabela 03. Espécies de triatomíneos capturados na Reserva Legado das Águas e resultado parasitológico para a presença de formas compatíveis a família Trypanosomatidae, com identificação dos isolados obtidos.

Espécie de triatomíneo	Código	Exame parasitológico	CBT ^a
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR01	Positivo	300/301/302
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR02	Positivo	303/304
	TR03	Positivo	Não isolado

<i>Panstrongylus megistus</i>			
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR04	Positivo	305/306
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR05	Negativo	
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR06	Positivo	307/308
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR07	Positivo	290/291
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR08	Negativo	
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR09	Negativo	
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR10	NE	
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR11	Negativo	
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR12	Negativo	
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR13	NE	
<i>Panstrongylus megistus</i>	TR14	Negativo	
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR15	Positivo	Não Isolado
<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TR16	NE	

^a **CBT**- Código de identificação na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos – FMVZ-USP; NE- não examinado

A partir da análise destas sequências, relações filogenéticas com base na SSUrDNA (região *barcode*) foram inferidas por meio de máxima parcimônia e análise bayesiana e topologias congruentes foram geradas para *Trypanosoma* do subgênero *Schizotrypanum*, conforme demonstrado na **Figura 05**. O subgênero *Schizotrypanum* é um grupo monofilético (100% de *bootstrap* e 1% probabilidade a *posteriori*) e inclui as espécies *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi*. Os isolados obtidos neste estudo foram incluídos em dois ramos monofiléticos: dez isolados foram agrupados com a cepa de referência Y de *T. cruzi* (100% de *bootstrap* e 1 de probabilidade a *posteriori*); e a sequência do barbeiro da espécie *Panstrongylus megistus* (TR03, indicada como B1) com a cepa de referência CANIII (100% de *bootstrap* e 1,0% de probabilidade a *posteriori*).



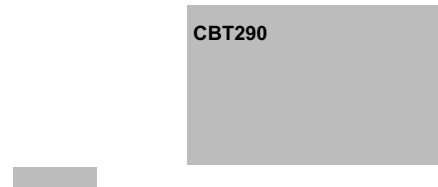


Figura 05- Árvore filogenética inferida por parcimônia e análise Bayesiana com base nas sequências genéticas SSUrDNA e *Trypanosoma rangeli* como grupo externo. Os números dos nós correspondem a 1000 replicatas de *bootstrap* e ao valor da probabilidade *a posteriori*.

Também foi possível realizar a análise do conteúdo intestinal de três exemplares de tabanídeos (Diptera: Tabanidae) coletados na mesma área onde foram montadas as armadilhas para vertebrados. Os espécimes capturados foram dissecados e o conteúdo intestinal observado em microscópio óptico de luz e foi observadas presença de formas compatíveis com o gênero *Trypanosoma*. O conteúdo intestinal de dois tabanídeos (**M1**, **M3**) positivos foi preservado em etanol para análise molecular. A caracterização molecular foi baseada na região V7V8 SSUrDNA e no gene gGAPDH e as sequências comparadas a outras depositadas do *GenBank*. As sequências da região V7V8 SSUrDNA obtidas foram 99,29% similares com a espécie *Trypanosoma terrestris* (KF586847) (Acosta et al., 2013) corroborado pelas sequências de gGAPDH, similares com *T. terrestris* com 99,33% (KF586843). (**Figura**

06) A identificação molecular da espécie do tabanídeo ainda não foi possível, e ainda será realizada.

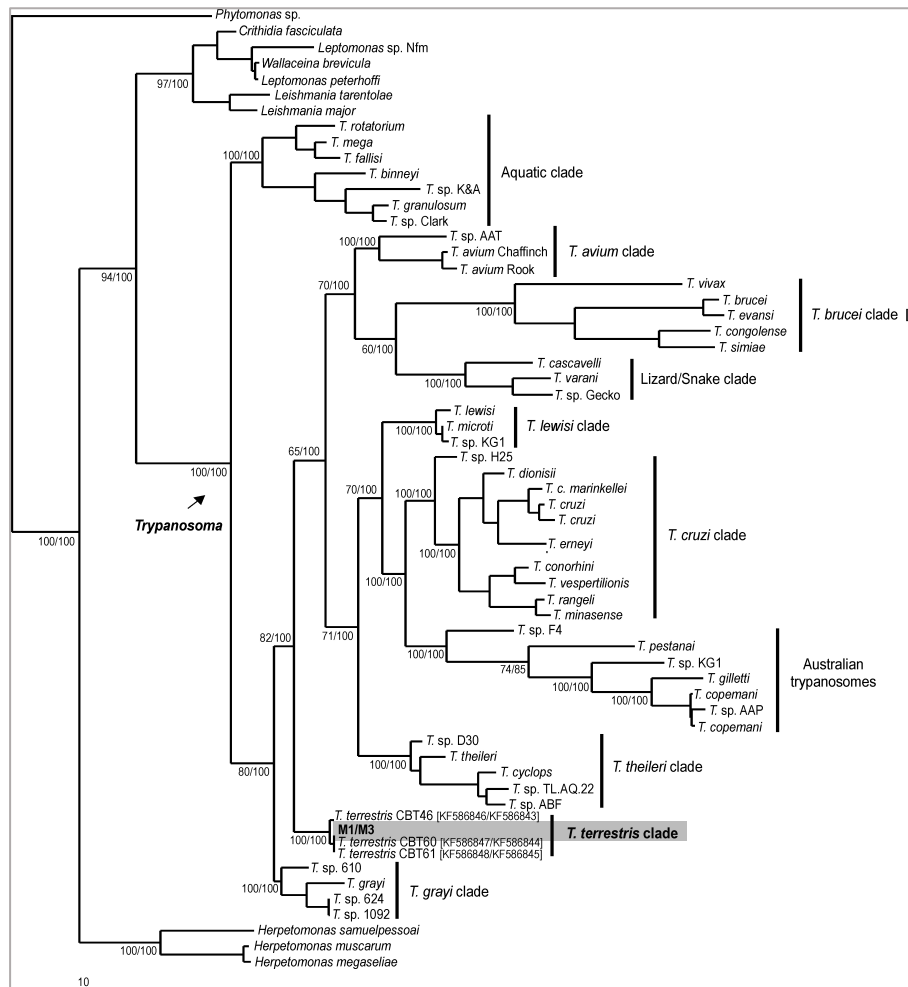


Figura 06. Árvore filogenética inferida por parcimônia e análise Bayesiana com base nas sequências genéticas SSUrDNA e *Phytomonas* sp. como grupo externo. Os números dos nós correspondem a 1000 replicatas de *bootstrap* e ao valor da probabilidade *a posteriori*.

6. DISCUSSÃO

A Reserva Legado das Águas está situada no trecho de Mata Atlântica que abrange 87 Unidades de Conservação, no Corredor da Serra do Mar, contendo apenas em seu território 0,2% do total remanescente (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2019). Apesar do alto grau de preservação e baixa atividade humana na Reserva em si, em seu entorno estão assentadas diversas comunidades tradicionais e vilas nas bordas da mata. Estas pessoas não têm relação econômica direta com a Reserva, porém a região do Vale do Ribeira é uma das regiões com menor PIB per

capita do estado de São Paulo e a população local ainda possui como fonte de renda a exploração ambiental, através da agricultura, pecuária de subsistência e extrativismo (IBGE, 2017).

A Reserva Particular Legado das Águas possibilita uma intensa correlação entre dois ambientes distintos, áreas de mata preservada, com grande abundância de espécies de pequenos mamíferos endêmicos da Mata Atlântica; com as comunidades tradicionais assentadas no entorno da área da Reserva, e a própria área de Sede, que possui vilas formadas por domicílios e hospedagens que servem como base para os funcionários e visitantes que transitam pela Reserva Legado das Águas, pequenas áreas modificadas onde há um fluxo contínuo de pessoas, e mesmo a observação visual de animais domésticos, como cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*).

A abundância de espécies da fauna da Reserva foi demonstrada neste estudo pela quantidade de espécies de pequenos mamíferos capturados, assim como a presença de algumas espécies que atuam como indicadores de qualidade ambiental como o *Euryoryzomys russatus* (Wagner, 1848; Bonverdop et al., 2017), e a diversidade de espécies de quirópteros endêmicos da Mata Atlântica e América do Sul, e predominância de espécies da família Phyllostomidae, que já foram demonstradas anteriormente como boas na indicação de habitat com baixa alteração antrópica (Fenton et al., 1992).

Houve a ausência de crescimento de parasitas nas hemoculturas diretas dos pequenos mamíferos, e nos testes moleculares do tipo PCR que são mais sensíveis e eficazes para a detecção dos parasitas alvo deste trabalho, e mesmo utilizando diferentes marcadores de eficácia comprovada, não resultou em amplificação, corroboraram com dados dos testes de hemocultura. Porém também há relato anterior da utilização do método de hemocultura direta de pequenos mamíferos silvestres que também obtiveram baixa positividade demonstrada por isolados de *T. cruzi* e *T. cruzi-marinkellei*, (Costa et al., 2015), e esta é uma segunda possibilidade que deve também ser avaliada, além da aparente não ocorrência de protozoários parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* nos pequenos mamíferos amostrados na Reserva legado das Águas.

Além disso, os dados encontrados neste trabalho, se assemelham a outros resultados já encontrados anteriormente, onde foram detectadas baixas porcentagens de positividade em pequenos mamíferos silvestres em áreas de Mata Atlântica preservada (Cavazzana Jr. et al., 2010; Marcili et al., 2013; Acosta et al., 2014; Dario

et. al., 2017;). Tal achado pode ser interpretado como uma detecção do efeito de diluição destes parasitas em áreas de alta biodiversidade, onde a quantidade de hospedeiros ótimos e ruins para a replicação de patógenos se equilibram, e geram uma menor taxa de infecção percentual mesmo nas espécies que são os reservatórios naturais destes, efeito este já demonstrado anteriormente em doenças infecciosas emergentes (Keesing et al., 2010; Altizer et. al., 2013).

Foram encontrados 43.75% dos triatomíneos examinados positivos quanto a presença de formas compatíveis com protozoários da família Trypanosomatidae no intestino. E os 11 isolados foram caracterizados via método molecular como *Trypanosoma cruzi*, agrupados como a linhagem TCII. Esta é uma linhagem de circulação no ciclo doméstico e detectada em ocorrência de Doença de Chagas em várias regiões da América do Sul (Lages-Silva et al., 2001; 2006;), em transmissão associada a triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma*, que vivem em abrigos de animais, tocas de roedores, rochas e também em habitats arbóreos, como ocos de árvores (Gaunt & Miles, 2000).

Relatos anteriores com análise direta de triatomíneos em diversos biomas demonstraram taxas de infecção variáveis, estudos feitos no Brasil relatam 100% de infecção na espécie *Triatoma vitticeps* num registro na Mata Atlântica modificada do estado do Espírito Santo, Brasil (Santos et al., 2005) 19,4% em *Triatoma sórdida* no estado de Mato Grosso do Sul (Cominetti et al., 2011) e 8,3% em *Panstrongylus megistus* na região do triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais (De Paula et al., 2010). Ainda estudos feitos no México demonstraram 57,3% e 11% em triatomíneos de espécies relacionadas ao ciclo de transmissão da Doença de Chagas (Vidal-Costa et al., 2000; Gómez-Hernández et al., 2008).

Além dos dados de positividade de triatomíneos próximo a outros estudos já realizados, o presente estudo traz o achado de uma linhagem de ocorrência predominantemente antrópica circulando em grande parte dos triatomíneos capturados, TCII. Esta mesma DTU também já foi descrita anteriormente em áreas de mata Atlântica infectando naturalmente primatas, onde uma espécie (*Leontopithecus* sp.) demonstraram serem bons reservatórios silvestres desta linhagem (Lisboa et. al., 2015; Acosta et. al., 2016) Além disso, estas espécies de vetores identificadas no presente estudo também utilizam abrigos de animais silvestres como refúgio primário (Carcavallo et al 1998), gerando a hipótese de possível sobreposição de diferentes ciclos de *T. cruzi* neste ambiente, seja pela possibilidade do reservatório vertebrado

do protozoário ser algum animal silvestre ainda não capturado, seja pela possibilidade dos triatomíneos estarem se alimentando também em animais domésticos ou humanos que circulem nas áreas adjacentes e da sede do Legado das Águas.

Além dos triatomíneos, houve o registro de uma espécie de *Trypanosoma* em mutucas da família Tabanidae, qual foi realizado por eventual possibilidade de captura destas nas redes montadas inicialmente para captura de morcegos. Esta família de invertebrados já foi descrita relacionando com algumas espécies do gênero *Trypanosoma*, como *T. theileri*, *T. vivax*, e *T. brucei* (Hoare, 1972; Böse et al., 1987, Böse & Heister, 1993; Hamilton et. al., 2008).

Com a caracterização molecular foi detectada a presença de *Trypanosoma terrestris*, uma espécie já identificada parasitando antas (*tapirus terrestris*) no estado do Espírito Santo (Acosta et al., 2013), o que é digno de registro pois até então seu vetor não foi definido, ainda que evidências recentes sugerem evolução desse parasita juntamente a populações de antas, e ainda assim a possível alternância de hospedeiros realizada por um vetor (Perez et. al., 2019), Mais estudos, no entanto, são necessários para afirmar a correlação entre *T. terrestris* e os tabanídeos, caracterizando também a espécie do inseto encontrado correlato, e se há uma competência vetorial real, além de novas investigações acerca da capacidade patogênica do protozoário tanto no hospedeiro já descrito, como em novos possíveis hospedeiros vertebrados.

7. CONCLUSÃO

Há a circulação de duas espécies do gênero *Trypanosoma*, *T. terrestris* e *T. cruzi* linhagem TCII, na Reserva Legado das Aguas-Votorantim, no município de Miracatu, estado de São Paulo, porém as características de transmissão não foram estabelecidas, e mais estudos serão necessários para caracterização de ambos os ciclos, e ainda estabelecer a epidemiologia da espécie *Trypanosoma terrestris*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo NO, Gurgel-Gonçalves R, Dias FBS & Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 2009; 112: 159-177.
- Abad-Franch F & Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 57-70.
- Acosta N, Miret J, López E, Schinini A. First report of *Sapajus cay* naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in San Pedro Department, Paraguay. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.* 2016;25(3):327-332.
- Acosta ICL, Costa AP, Gennari SM, Marcili A, Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil, *J. Med. Entomol.* 2014; 51(3):686–693.
- 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 trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Parasites & Vectors* 2013, 6:349.
- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitol.* 2010; 26:324-8
- Alencar JE. Profilaxia do calazar no Ceará. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1961. v 3, p. 175-180.
- Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, ShikanaiYasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(6):762-70.
- Almeida CE, Pacheco RS, Haag K, Dupas S, Dotson EM & Costa J. Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78: 791-802.
- Almeida EA, Barbosa Neto RM, Guariento ME, Wanderley JS, Souza ML. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(3):311-5.

- Altizer S, Ostfeld RS, Johnson PTJ, Kutz S, Harvell CD. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science*. 2013; 341(6145):514–519.
- Anez N, Crisante G, Silva FMD, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, Stolf AMS, Ramirez JL, Teixeira MMG. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop. Med. Int. Health*. 2004; 9:1319–1326.
- Aragão MB. Sobre a dispersão do *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1971; 5: 183–191.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000. 30(12-13):1269-81. Review.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*. 1996 14(5):523-32. Review.
- Barbosa MG, Fé NF, Marcião AHR, Silva APT, Monteiro WM, Guerra JAO. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):485-491, out. 2008.
- Bonvicino CR, De Oliveira JA, D'Andrea OS. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.
- Böse, R, Friedhoff KT, Olbrich S, Büscher G, Domeyer I. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitol. Res.* v.73, p.421–424, 1987.
- Böse, R., Petersen, K., Pospichal, H., Buchanan, N., Tait, A. Characterization of *Megatrypanum* trypanosomes from European Cervidae. *Parasitology* 1993; 107: 55-61.
- Böse R., Heister, N.C. Development of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in tabanids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1993; 40: 788–792.
- Bovendorp RS, Villar N, de Abreu-Junior EF, Bello C, Regolin AL, Percequillo AR, Galetti M. Atlantic small-mammal: a dataset of communities of rodents and marsupials of the Atlantic forests of South America. *Ecology*. 2017; 98(8):2226.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of

- American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;104(2):219-32.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003; 2(3):173-83.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001; 31(11):1218-26.
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000b; 30(1):35-44.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000a; 111(1):95-105.
- Burgos JM, Begher S, Silva HM, Bisio M, Duffy T, Levin MJ, Macedo AM, Schijman AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78:294–297.
- Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 2003; 5(5):419-27.
- Camargo EP. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit.* 1998; 42:29-112.
- Carbajal de la Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Trop* 2007; 101: 115-119.
- Carcavallo RU, Jurberg J & Lent H. Filogenia dos triatomíneos. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H (Eds.). *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, Vol III*, Fiocruz, Rio de Janeiro. 1999; 925-980.
- 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, Lent H. *Atlas of Chagas disease vectors in the*

- Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1998; 2:561-600.
- Carcavallo RU & Martinez A. Biología, Ecología y Distribución Geográfica de los triatomíneos americanos. In: Carcavallo RU, Rabinovich JE, Tonn RJ (eds) Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Vol II. Organización Panamericana de la Salud, Buenos Aires, Argentina. 1985; 149-208.
- Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pereira DP, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae). *Acta Tropica*. 2010; 116(1):108-110, out. 2010.
- Cavalier-Smith, T. Only six kingdoms of life. *Proceedings: Biological Sciences*. 2004; 271:1251-1262.
- Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev*. 1993; 57(4):953-94.
- Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*. 1981; 14:461-81.
- Cavazzana M, Marcili A, Lima L, Silva FM da, Junqueira AC V, 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 *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol*. 2010; 40: 345–355.
- Cominetti Marlon Cezar, Andreotti Renato, Oshiro Elisa Teruya, Dorval Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2011 Oct [cited 2020 May 08]; 44(5): 576-581.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 2006; 133: 159–169.
- Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, Mesquita ETKC, Gennari SM, Marcili A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015; 656-666.

- Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions: a comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(3):277-82
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90, 278–279.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology. 2002. 125(Pt 5):407-14.
- Dahroug MA, Almeida AB, Sousa VR, Dutra V, Turbino NC, Nakazato L, de Souza RL. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010. 104(1):73-4.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol. 2007. 10;149(3-4):139-46.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2006. 39(4):352-6.
- Dario MA, Lisboa CV, Costa LM, Moratelli R, Nascimento MP, et al. (2017) High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. PLOS ONE, 2017; 12(11).
- Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. Hospital. 1955. v. 48, p. 61-76.
- Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. Hospital. 1954. v. 45, p. 419-421.
- De Carvalho M, De Oliveira T. Small non-volant mammals (Didelphimorphia and Rodentia) from the RPPN Guarirú, an Atlantic Forest fragment in northeastern Brazil. Check List. 2015; 11 (6): 1782.
- De Paula MBC, Costa IN, Freitas PA, Limongi JE, Pajuaba Neto AA, Pinto RMC, et al. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43:9-14

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004. 27(5):305-18. Review.
- De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 2002; 8:269-285.
- Domingos MF, Carreri-Bruno GC, Ciaravolo RMC, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31: 425-432.
- Emmons LH. & Feer F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. The University of Chicago Press. 1990.
- Fenton M.B.; Acharya L.; Audet D.; Hicket M.; Merriman C.; Obrist M. e Syme D. *Phyllostomid* bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicator of habitat disruption in the neotropics. *Biotropica.* 1992; 24: 440-446.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. *Parasitology.* 1999; 118:161-6.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 1998b; 58(6):807-11.
- Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998a; 95:129-33.
- Ferreira JIGS, Da Costa AP, Nunes PH, Ramirez D, Fournier GFR, Saraiva D, Tonhosolo R, Marcili A. New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado. *Acta Trop.* 2017; 176:249-255.
- Ferreira R.C., De Souza A.A., Freitas R.A., Campaner M., Takata C.S., Barrett T.V., Shaw J.J. and Teixeira M.M.G. The phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J. Eukaryot Microbiol.* 2008; 55:427-35.

- Ferreira R.C., Campaner M., Viola L.B., Takata C.S., Takeda G.F. and Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitol.* 2007;134:1623-38.
- Figueiredo FB, Gremião ID, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, Schubach TM, Madeira MF. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008. 102(2):200-1.
- Forattini OP, Rabello EX, Pattoli DGB. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. de Saúde Pública.* 1970; 4(1):99-100, jun. 1970.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2006; 2:24.
- Fundação SOS Mata Atlântica e INPE. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica Relatório Técnico período 2017-2018, São Paulo. 2019
- Galati EAB, Ovallos FG. Description of two new sand fly species related to *Nyssomyia antunesi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *J. Of Medical Entomol.* 2012; 49(2):238-252, 1 mar. 2012. Oxford University Press (OUP).
- Galvão C, De Paula AS, Jansen AM, Roque ALR, Silveira AC, Dale C, Jurberg J, Pavan MG, Obara MT, Lima MM, Silva RA, Gurgel-Gonçalves R, Santos CM, Lazzari C, Marli D, Wanderley V, Rocha DS, Martins EC, Monteiro FA, Costa J. Vetores da Doença de Chagas no Brasil. Série Zoologia : Guias e Manuais de identificação. *S. Bras. de Zool.* 2014; 20:616.9363.
- Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000; 95, 557–565.
- Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Zárate AC, Zárate EC, Trujillo-Contreras F, Ramirez LE. Prevalência de triatomíneos (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuição na região Ciénega do Estado de Jalisco, México. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(3): 257-262.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Miniexon-gen sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 1999; 118: 375-382.

- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - An updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:435-42.
- Gurgel-Gonçalves R & Cuba CAC. Predicting the potential geographical distribution of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) based on ecological niche modeling. J Med Entomol. 2009; 46: 952-960.
- Gurgel-Gonçalves R & Silva RB. Analysis of the geographical distribution of *Psammolestes Bergroth* (Heteroptera: Reduviidae) in South America with new records of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg. Zootaxa. 2009; 2033: 41-48.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produto Interno Bruto dos Municípios. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Contas Nacionais e Diretoria de Geociências, Coordenação de Geografia e Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2017.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele II, Gibson WC. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. Infect Genet Evol. 2008; 8:26-33.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol. 2007; 44(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. Mol Ecol. 2005;14(10):3167-3175.
- 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. Int J Parasitol. 2004; 34(12):1393-404.
- Hiramoto RM, Oliveira SS, Rangel O, Henriques LF, Taniguchi HH, Barbosa JER, Casanova C, Junior AV, Sampaio SMP, Spinola R, Rehder S, Lindoso JAL, Tolezano JE. Epidemiological classification of the municipalities of the State of São Paulo according to the Visceral Leishmaniasis Control and Surveillance Program, 2017. BEPA 2019;16(182):11-35
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972.

- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 1966; 212, 1385.
- Hoare, CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X Revision of the Systematics. *J. Protozool.* 1964; 11 (2): 200-7
- Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press; 1963. p.68.
- Jakes KA, O'Donoghue P, Munro M, Adlard R. Hemoprotozoa of freshwater turtles in Queensland. *J. Wild. Dis.* 2001b; 37:12-9.
- Jakes KA, O'Donoghue PJ, Adlard RD. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitol.* 2001a ; 123 :483-7.
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 151: 1–15. Jansen AM, Xavier SC das C, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors.* 2018; 11: 502.
- Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 2005. 7(11-12):1224-34. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005. 100(8):811-27. Review.
- Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SD, Macedo AM, Chiari E. Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II Strains from Patients with Different Clinical Forms of Chagas' Disease in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(6): 2167-2171.
- Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(5): 435.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In: W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. I, Academic Press, London, 1978. p. 1-120.

- Lainson R, Shaw JJ, Lins CZ. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania (L.) donovani* in Pará State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1969. 63:741-745.
- Leite GR, Santos CB & Falqueto A. Insecta, Hemiptera, Reduviidae, *Panstrongylus geniculatus*: Geographic distribution map. *Check List* 2007; 3: 147-152.
- Lent H & Wygodzinsky P. Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Amer Mus Nat Hist* 1979; 163: 123-529.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 1979; 163: 125-520
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(10):1363.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015; 151:166-177.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MMG. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist.* 2012; 163(6):856-72.
- Lima H, Rodríguez N, Barrios MA, Avila A, Cañizales I, Gutiérrez S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008.103(4):412-4.
- 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.
- Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 156(3-4):314-8.

- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006; 133(Pt 5):603-11.
- Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NR, das Chagas Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 2004; 90(1):97-106.
- Lom J. Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, 1976; 269-337.
- Luitgards-Moura, JF, Vargas AB, Almeida CA, Magno-Esperança G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E, Costa J, Tsouris P & Rosa-Freitas MG (2005). A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) populations from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 47:131-137.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98:7396-7401.
- Magurran, A. E. *Ecological diversity and its measurement*, Princeton University Press, Princeton, Nova Jersey, 1988.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2004b; 129(5):549-61.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, Coura JR, Takefa GF, Shaw JJ, Teixeira MMG. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 2004a; 128:283-94.
- Marcili A, Costa AP, Soares HS, Acosta ICL, Lima JTR, Minervino AHH, Melo ATL, Aguiar DM, Pacheco RC, Gennari SM. "Isolation and Phylogenetic Relationships of Bat Trypanosomes from Different Biomes in Mato Grosso, Brazil," *J. Parasitol.* 2013; 99(6):1071-1076.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, Souza AI, da Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts,

association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 2009c; 9(6):1265-74.

- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM.. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 2009b; 136(6):641-55.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009a; 39(5):615-23.
- Marinkelle C. J. Biology of the trypanosomes of bats. In: LUMSDEN, W.HR EVANS, D.A Biology of the kinetoplastida. London: Academic Press. 1976;1:175-216.
- Massaro DC, Rezende DS & Camargo LMA. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Rev Bras Epidemiol.* 2008; 11: 228-40.
- Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today.* 1995; 11(1):1995.
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000. 16(5):188-9. Review.
- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999. 119 (Pt 3):237-46
- McIntyre S, Rangel EF, Ready PD, Carvalho BM. Species-specific ecological niche modelling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* following climate change in South America. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):157.
- Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* 2002; 124(Pt 2):177-84.
- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 2003; 326(7404):1444-8.

- Miles MA, Cedillos R, Povoá M, De Souza A, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *The Lancet* 1981; 317:1338–1340.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Tóye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978; 272(5656): 819-21.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
- Ministério da Saúde (BR). Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. *Rev Patol Trop*. 2013; 42(4):475-8.
- Ministério da Saúde (BR). Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Trypanosoma cruzi*: vírus da imunodeficiência humana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(4):392-415.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38 Supl 3:1-29.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim, Brooks JJ, Mittermeier CG, Lamourux J, Fonseca GAB. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Cemex. 2004.
- Molyneux, D. H. Trypanosomes of bats. In *Parasitic Protozoa*, (ed. Kreier, J. P. and Baker, J. R.) 1991;2:95–223. Academic Press, London, UK
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002. 18(9):399-405. Review.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000; 403: 853-858
- Neves VLFC, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 299-306.
- Neves VLFC. Características da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil [Dissertação de Mestrado]. [São Paulo (SP)]: Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo; 1999.
- Nicholas, K.B.; Nicholas, H.B. J.R.; Deerfield, D.W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *Embnew news.v.4,p.14*. 1997.

- Odum, E. P.. Ecologia. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, RJ. 1988.
- Oliveira MR, Souza RCM & Diotaiuti L. Redescription of the genus *Cavernicola* and the tribe Cavernicolini (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae), with morphological and morphometric parameters. Zootaxa. 2007; 1457: 57-68.
- Ovallos FG, Silva MD, Bispo GBS, Oliveira AG, Goncalves-Neto JR, Malafronte RS, Galati EAB. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite. 2017;24:1-10.
- Pavan M. Filogeografia de *Rhodnius pictipes* (Hemiptera: Reduviidae) na região amazônica. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2009 ; Brasil.
- Pinto AYN, Valente SA, Valente VC, Ferreira Júnior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(6):602-14.
- Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuyper S, Hide M, Bañuls AL, De Doncker S, Rijal S, Cañavate C, Campino L, Dujardin JC. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. J Infect Dis. 2005. 192(4):685-92.
- Rassi A, Rassi Júnior A, Rassi GG. Fase aguda. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M (orgs). Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.231-45.
- Rassi Jr A, Marin-Neto JA. Estado da Arte. Cardiopatia chagásica crônica. Rev Soc Cardiol Est São Paulo. 2000;10(4):6-12.
- Ready PD, Ribeiro AL, Lainson R, Alencar J. E. de, & Shaw, J. J. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in Ceara State. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1983;78(2):235-236.
- Rezende HR, Sessa PA, Ferreira AL, Santos CB, Leite GR, Falqueto, A. Efeitos da implantação da Usina hidrelétrica de Rosal, rio Itabapoana, estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009;42(2):160-164.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals

- lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006; 132(Pt 2):215-24.
- Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, Texeira MMG. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol*. 2003; 116(3):185-207.
- Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. Genetic Variation and Exchange in *Trypanosoma cruzi* Isolates from the United States . *PLoS One*. 2013; 8: e56198.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003. 19. 1572-1574.
- Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100(5): 471-473.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, et al. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasit*. 2002; 96(8):755-64.
- Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, Stich RW, Pittapalapong S. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand, *J Med Microbiol*. 2007;56:1118-21.
- Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2004. 25;120(3):229-33
- Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol*. 1999; 42: 1–27.

- Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde; 2019.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012; 54(6):845-52.
- Silveira AC & Feitosa RV. Altas taxas de infecção natural por *Trypanosoma* tipo *cruzi* em *Panstrongylus lutzi* Neiva e Pinto, 1923. In: Resumos da XI Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu. Resumo VE-10, 1984.
- Silva RE, Sampaio BM, Tonhosolo R, Costa AP, Costa LES, Nieri-Bastos FA, Sperança MA, Marcili A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. BMC Infect. Dis. 2019; 19: 895 (2019).
- Silva RA, Mercado VT, Barbosa GL, Rodrigues VL, Wanderley DM. Situação atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. Bol Epidemiol Paul. 2011;8:4-13.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 2006; 22(4):168-74.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1996; 83(2):141-52.
- Stamatakis, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 2006. 1, 2688-90.
- Stevens JR, Kinetoplastid phylogenetics with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. Parasite. 2008; 5:226-32.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. Adv Parasit. 2001; 48:1-56.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. Parasitol. 1999b; 118:107-16.

- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 1999; 118:107-16.
- Stevens JR, Stevens J, Noyes H, Gibson WC. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1998;93: 669-76.
- Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2010; 115: 35-43.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003; 33(3):269-79.
- Thies SF, Bronzoni RV, Espinosa MM, et al. Frequency and diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sinop, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(5):544-552.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, Velez ID. Didelphis marsupialis, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1994. 50(5):557-65
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Inter Jour for Parasitol*. 2001; 31:472-481.
- Van den Bossche P, de La Rocque S, Hendrickx G, Bouyer J. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitol*. 2010;26(5):236-243.
- Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takda G., Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol*. 2001; 99:37-48.
- Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Publica Mex* 2000;42:496-503.
- Vickerman K. The Evolution expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal of Parasitology*. 1994; 18, 124-193
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen, WHR, Evans DA. Editors. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic; Press 1976. p. 1-34.

- Viola L.B., Attias M., Takata C.S., Campaner M., De Souza W., Camargo E.P. and Teixeira M.M.G. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. J. Eukaryot. Microbiol. 2009; 56:594-602.
- Viola L.B., Campaner M., Takata C.S., Ferreira R.C., Rodrigues A.C., Freitas R.A., Duarte M.R., Grego K.F., Barrett T.V., Camargo E.P. and Teixeira M.M.G. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. Parasitology. 2008; 135:595-605.
- Vizotto LD, Taddei VA, Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. Francal, 1973. São José do Rio Preto.
- Votycka J, Szabová J, Rádrová J, Zídková L, Svobodová M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. International J. of Syst. and Evol. Microbiol, 2012; 62:745-754.
- Votycka J, Oborník M, Volf P, Svobodová M, Lukes J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitology. 2002;125(3):253-263, 2002.
- Wagner, J.A. Beiträge zur Kenntniss der Säugthiere Amerika's. Abhandl.Math. Physik. König. Bayer. Akad. Wiss. M'ünchen 1848; 5: 271–332.
- Weinman D. *Trypanosoma cyclops* n. sp.: a pigmented trypanosome from the Malaysian primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1972; 66:628-636.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. Int J Parasitol. 2006; 36(3):337-46.
- Westenberger, SJ. Barnabé, C. Campbell, DA. and Sturm, NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 2005; 171:527-543.
- World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.

- World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013
- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90(6):33-44.
- Xavier SS, Sousa AS, Brasil PEAA, Gabriel FG, Holanda MT, Hasslocher-Moreno A, et al. Incidência e preditores de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica com função sistólica preservada. *Rev SOCERJ.* 2005; 18(5):457-63.
- Yeo, M. Acosta, N. Llewellyn, M. Sánchez, M. Adamson, S. Miles, GAJ. López, E. González, N. Patterson, JS. Gaunt, MW. Rojas de Arias, A. Miles, MA. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35:225–233.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(2):240-253.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG,. A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific no- Menclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI [WWW Document]. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(7): 1051-1054.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998; 28(1):105-12.

ANEXO 01 Formulário de autorização para realização da captura e manipulação dos animais, expedida pelo Ministério do Meio Ambiente.



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: 58632-1	Data da Emissão: 26/05/2017 16:49	Data para Revalidação*: 25/06/2018
* 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: Arlei Marcili	CPF: 282.937.948-95
Título do Projeto: ESTUDO DE AGENTES ZOONÓTICOS E SEUS VETORES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NA RESERVA PARTICULAR LEGADO DAS ÁGUAS ? RESERVA VOTORANTIM, NOS MUNICÍPIOS DE TAPIRAÍ E MIRACATU, SÃO PAULO.	
Nome da Instituição : Obras Sociais e Educacionais de Luz	CNPJ: 18.301.267/0001-84

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura e coleta de material	07/2017	07/2017
2	Captura e coleta de material	12/2017	12/2017
3	Captura e coleta de material	07/2018	07/2018
4	Captura e coleta de material	12/2018	12/2018
5	Captura e coleta de material	07/2019	07/2019
6	Captura e coleta de material	12/2019	12/2019
7	Captura e coleta de material	07/2020	07/2020

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 n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 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 da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
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 ou hipertermia. As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 20 em 20 minutos.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	THIAGO RIBEIRO NICOLIELLO	Pesquisador	062.601.406-90	MG10917667 SSPMG-MG	Brasileira
2	Thiago Fernandes Martins	Pesquisador	220.508.838-62	29126414-1 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 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: 78753754



Página 1/4



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: 58632-1	Data da Emissão: 26/05/2017 16:49	Data para Revalidação*: 25/06/2018
* 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: Arlei Marcili	CPF: 282.937.948-95
Título do Projeto: ESTUDO DE AGENTES ZONÓTICOS E SEUS VETORES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NA RESERVA PARTICULAR LEGADO DAS ÁGUAS ? RESERVA VOTORANTIM, NOS MUNICÍPIOS DE TAPIRAÍ E MIRACATU, SÃO PAULO.	
Nome da Instituição : Obras Sociais e Educacionais de Luz	CNPJ: 18.301.267/0001-84

3	HERBERT SOUSA SOARES	Pós-doutorando	019.520.355-03	550197680 ssp-SP	Brasileira
4	Fernanda Aparecida Nieri Bastos	Pesquisadora	257.872.838-80	276921288 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	TAPIRAÍ	SP	Legado das Águas	Fora de UC Federal
2	MIRACATU	SP	Legado das Águas	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura, Squamata, Mesostigmata, Trombidiformes, Astigmata, Rodentia, Chiroptera, Ixodida, Parasitiformes, Didelphimorphia
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Ixodida, Didelphimorphia, Chiroptera, Trombidiformes, Parasitiformes, Anura, Squamata, Mesostigmata, Rodentia, Astigmata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Astigmata (*Qtde: 200), Didelphimorphia (*Qtde: 2), Trombidiformes (*Qtde: 200), Squamata (*Qtde: 2), Chiroptera (*Qtde: 2), Rodentia (*Qtde: 2), Anura (*Qtde: 2), Mesostigmata (*Qtde: 200), Ixodida (*Qtde: 200)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Ectoparasita, Sangue
2	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Secreção, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
4	Amostras biológicas (Répteis)	Ectoparasita, Sangue
5	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual
6	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual
7	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Rede de neblina, Captura manual
8	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	MUSEU DE ZOOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	coleção

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: 78753754



Página 2/4



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: 58632-1	Data da Emissão: 26/05/2017 16:49	Data para Revalidação*: 25/06/2018
* 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: Arlei Marcili	CPF: 282.937.948-95
Título do Projeto: ESTUDO DE AGENTES ZONÓTICOS E SEUS VETORES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NA RESERVA PARTICULAR LEGADO DAS ÁGUAS ? RESERVA VOTORANTIM, NOS MUNICÍPIOS DE TAPIRAÍ E MIRACATU, SÃO PAULO.	
Nome da Instituição : Obras Sociais e Educacionais de Luz	CNPJ: 18.301.267/0001-84

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: 78753754



Página 3/4



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: 58632-1	Data da Emissão: 26/05/2017 16:49	Data para Revalidação*: 25/06/2018
* 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: Arlei Marcili	CPF: 282.937.948-95
Título do Projeto: ESTUDO DE AGENTES ZONÓTICOS E SEUS VETORES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NA RESERVA PARTICULAR LEGADO DAS ÁGUAS ? RESERVA VOTORANTIM, NOS MUNICÍPIOS DE TAPIRAÍ E MIRACATU, SÃO PAULO.	
Nome da Instituição : Obras Sociais e Educacionais de Luz	CNPJ: 18.301.267/0001-84

* 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: 78753754



Página 4/4