

THIAGO FAKELMANN

**Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*
em Xenarthras monitorados e encontrados atropelados em
rodovias brasileiras**

São Paulo

2022

THIAGO FAKELMANN

**Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*
em Xenarthras monitorados e encontrados atropelados em
rodovias brasileiras**

VERSÃO CORRIGIDA

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2022

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)

4277
FMVZ

Fakelmann, Thiago
Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em *Xenarthras* monitorados e encontrados atropelados em rodovias brasileiras / Thiago Fakelmann. – 2022.
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2023.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. Tatus. 2. Tamanduás. 3. Análise molecular. 4. Ecologia. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em *Xenarthras* monitorados e encontrados atropelados em rodovias brasileiras.", protocolada sob o CEUA nº 8180050520 (ID 007867), sob a responsabilidade de **Ariel Marcell** e equipe; *Thiago Fackelmann* - 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 Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/05/2020.

We certify that the proposal "Diversity of *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites in *Xenarthras* monitored and found run over on Brazilian highways.", utilizing 10 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 8180050520 (ID 007867), under the responsibility of **Ariel Marcell** and team; *Thiago Fackelmann* - 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 05/20/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2020 a 04/2022 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem: Animais provenientes de outros projetos

Especie: Espécies silvestres brasileiras sexo: Machos e Fêmeas idade: 00 a 16 anos Quantidade: 10

Linha gem: Xenarthras Peso: 00 a 41 kg

Registro: Autorização para atividades com finalidade científica de número ICMBio 53798-10, com data de emissão de 15/01/2020 às 14:26:11, tendo como titular Arnaud Leonard Jean Desblez para o projeto de nome Projeto Bandeiras e Rodovias para a instituição de nome IPE - INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS.

Local exp.: As amostras são recolhidas das rodovias BR262 (rodovia transversal que liga os estados de Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul), BR267 (rodovia transversal que corta os estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul) e MS040 (rodovia que corta o estado do Mato Grosso do Sul). O processamento das amostras será realizado no departamento VPS da FMVZ - USP.

Mét. Captura: Animais encontrados atropelados em rodovias pelos integrantes do Projeto Bandeiras e Rodovias.

São Paulo, 06 de dezembro de 2022

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

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais





Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São
Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Fakelmann, Thiago

Título: Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em Xenarthras monitorados e encontrados atropelados em rodovias brasileiras

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Arlei Marcili, pelo qual tenho grande admiração.

Agradeço a todos os funcionários do VPS pelo apoio, por todas as orientações e ajuda, principalmente ao Técnico de laboratório Renato e a Dra. Hilda por estarem sempre presentes e extremamente solícitos a ajudar.

Agradeço todos os envolvidos no Projeto Bandeiras e Rodovias, pela honra de participar do lindo trabalho que realizam.

Agradeço a minha esposa Pricila Rosa, que durante minha trajetória de construção deste trabalho, ressignificou para mim o que é companheirismo e amor.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Arlete Fakelmann, que mesmo diante de uma vida com imensas dificuldades, sempre me incentivaram a estudar e se sacrificaram para que isso fosse possível.

Agradeço aos meus irmãos Luan e Gabriel Fakelmann por vibrarem por minhas conquistas e pelo companheirismo e a empatia diante de minhas dificuldades.

Agradeço imensamente os meus amigos Isabela Pesenato, Jaciara Costa, Carolina Serpa e Herbert Soares, por todo o suporte, parceria, carinho e paciência que tiveram comigo.

Agradeço meu professor da graduação Me. Luiz Eduardo da Silva Costa, por ter sido um grande professor e uma grande pessoa em minha vida.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa desenvolvida.

“O que não provoca minha morte faz com que eu fique mais forte”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

FAKELMANN, T. **Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em Xenarthras monitorados e encontrados atropelados em rodovias brasileiras**. 2022. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A magnaordem Xenarthra compreende um grupo de mamíferos placentários representados por tatus, tamanduás e preguiças. Atualmente, a magnaordem Xenarthra é dividida em duas ordens: Cingulata (tatus) e pilosa (preguiças e tamanduás). As duas ordens são amplamente distribuídas na América do Sul e Central, enquanto na América do Norte, apenas tatus são encontrados. Os Xenarthras representam um dos mais antigos grupos de animais endêmicos da América do sul e são bastantes diversos em relação aos seus habitats e nichos ecológicos, tornando-os um grupo interessante para estudos sobre diversidade de parasitas. O presente estudo teve como objetivo identificar a diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* de amostras de Xenarthras atropelados em rodovias brasileiras, cedidas pela equipe do projeto Bandeiras e Rodovias. Foram realizadas extrações de DNA e reações de amplificação (PCR) de amostras de 74 animais, em um total de 208 tecidos, provenientes de baço, fígado e linfonodo mesentérico. As análises resultaram em uma prevalência de tripanossomatídeos em 25% *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim), 22,22% em *Euphractus sexcinctus*, 20,45% em *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) e 16,66% em *Dasypus novemcinctus* (tatu-galinha). Amostras provenientes de animais atropelados, mesmo apresentando diferentes graus de degradação, são importantes na compreensão dos ciclos naturais das doenças parasitárias e impactos nas populações silvestres e dos efeitos das ações antrópicas dentro dos ecossistemas.

Palavras-chave: Tatus. Tamanduás. Análise molecular. Ecologia.

ABSTRACT

FAKELMANN, T. **Diversity of parasites of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* in Xenarthras monitored and found run over on Brazilian highways**. 2022. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The magnaorder Xenarthra comprises a group of placental mammals represented by armadillos, anteaters and sloths. Currently, the magnaorder Xenarthra is divided into two orders: Cingulata (armadillos) and Pilosa (sloths and anteaters). The two orders are widely distributed in South and Central America, while in North America, only armadillos are found. The Xenarthras represent one of the oldest groups of endemic animals in South America and are quite diverse in terms of their habitats and ecological niches, making them an interesting group for studies on parasite diversity. The present study aimed to identify the diversity of parasites of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* in samples of Xenarthras run over on Brazilian highways, provided by the Bandeiras e Rodovias project team. DNA extractions and amplification reactions (PCR) were performed in samples from 74 animals, in a total of 208 tissues, from the spleen, liver and mesenteric lymph node. The analyzes resulted in a prevalence of trypanosomatids in 25% in *Tamandua tetradactyla* (anteater anteater), 22.22% in *Euphractus sexcinctus*, 20.45% in *M. tridactyla* (anteater giant) and 16.66% in *Dasypus novemcinctus* (narrow armadillo). Samples from roadkill animals, even with different degrees of degradation, are important in understanding the natural cycles of parasitic diseases and impacts on wild populations and the effects of anthropic actions within ecosystems.

Keywords: Armadillos. Anteaters. Molecular analysis. Ecology.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Formas de desenvolvimento de <i>Leishmania</i> ; Amastigota e Promastigota | 15 |
| Figura 2 - Rodovias amostradas no Mato Grosso do sul..... | 28 |
| Figura 3 - Regiões que mais atropelam animais | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Espécies de animais e tecidos utilizados por amostra..... | 27 |
| Tabela 2 – Resultados das ampliações..... | 29 |
| Tabela 3 – Sexo e maturidade sexual dos animais testados positivo para marcadores de tripanossomatídeos..... | 30 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 Magnaordem Xenarthra | 13 |
| 1.2 Família Trypanosomatidae..... | 15 |
| 1.3 Gênero <i>Leishmania</i> | 17 |
| 1.4 Gênero <i>Trypanosoma</i> | 20 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1 Objetivos específicos | 24 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 Obtenção de amostras | 25 |
| 4.2 Extração de DNA e Reações de amplificação..... | 25 |
| 4.3 Purificação e Sequenciamento..... | 26 |
| 5. RESULTADOS | 27 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 31 |
| 7. CONCLUSÃO | 36 |
| 8. REFERÊNCIAS | 37 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Magnaordem Xenarthra

A magnaordem Xenarthra é composta por mamíferos placentários, representados por tatus, tamanduás e preguiças. Esses animais compartilham características bastantes específicas, como uma articulação extra nas vértebras torácicas e lombares, que são denominadas “vértebras xenárticas” (Glass, 1985; Medri et al., 2011a; Medri et al., 2011b; Superina, 2012), possuem articulação entre o ísquio e a coluna vertebral e o esqueleto apendicular bem desenvolvido. Contam com um metabolismo basal lento, patas com garras fortes e dentes pouco desenvolvidos, nas espécies que os possuem, sem esmalte e com superfícies oclusais simples (Simpson, 1980; Eisenberg e Redford, 1999; McDonald, 2005; Superina e Loughry, 2012).

A origem da magnaordem Xenarthra antecede os 60 milhões de anos e pode ter surgido por volta de 100 milhões de anos atrás (Simpson, 1980; Bininda-Emonds et al., 2007; Delsuc et al., 2012). A maior parte da diversificação desse grupo deu-se na América do Sul, quando o continente ainda se encontrava isolado da América do Norte e da Antártica. O grupo alcançou uma ampla distribuição geográfica devido ao grande intercâmbio entre as faunas autóctones que ocorreu com o surgimento de uma conexão entre os dois subcontinentes, a América central, há cerca de três milhões de anos, que permitiu que o grupo passasse a ocorrer ao longo de todo o continente Americano (Simpson, 1980; Benton, 2000; McDonald, 2005), distribuindo-se desde o Alasca (Stock, 1942) até a Patagônia (Borrero et al., 1998).

Os Xenarthra, há aproximadamente 10.000 anos, representavam um grupo relativamente numeroso. Atualmente possuem mais de 200 gêneros fósseis descritos (Patterson, Pascual, 1972). No período entre o Pleistoceno e o Holoceno a diversidade de espécies da magnaordem Xenarthra foi drasticamente reduzida em um evento de extinção em massa que atingiu principalmente a megafauna (Simpson, 1980; Koch, Barnosky, 2006; Barnosky, Lindsey, 2010). No Brasil, pelo menos 20 espécies de Xenarthra foram extintas, entre tatus, preguiças e gliptodontes (Cartelle, 1999; Cartelle et al., 2008). Estima-se, devido aos registros fósseis, que algumas, dentre essas espécies extintas, podem ter alcançado a massa corporal de mais de uma tonelada (Mann de Toledo, 1998)

Entre as possíveis causas da extinção em massa estão mudanças climáticas, o aumento das florestas úmidas no Holoceno (De Vivo, Carmingnotto, 2004), o impacto antrópico (Lyons et al., 2004) e a predação (Marshall et al., 1982). A extinção das espécies de Xenarthras ocasionou além da diminuição na diversidade do grupo a diminuição de sua distribuição geográfica, que atualmente está concentrada em quase toda a América do Sul e a América Central e limitada a uma única espécie registrada no Sul da América do Norte, o tatu-galinha (*D.novencinctus*) (Gardner, 2007).

Esses animais são bastantes diversos em relação ao nicho ecológico, habitats e massa corporal, havendo registros de animais que, atualmente, podem ter entre 100g a 40 kg (Eisenberg e Redford, 1999).

Atualmente a magnaordem Xenarthra é dividida em duas ordens, tendo como critério de divisão o tipo de revestimento corporal que apresentam. Os integrantes da ordem Cingulata apresentam o corpo revestido por osteodermos, enquanto os representantes da ordem Pilosa possuem o corpo revestido por pelos (Gardner, 2005, 2007). Recentemente, três novas espécies foram descritas por Miranda et al. (2017) (*Cyclops Gray*, 1821), totalizando 34 espécies de Xenarthras descritas (Superina, 2012), dentre elas 22 espécies possuem ocorrências no Brasil.

As espécies da magnaordem Xenarthra são monofiléticas, esse monofilatismo é apoiado tanto por dados morfológicos (Engelman, 1985; Gaudin, 2004) como por dados moleculares (Van Dijk et al., 1999; Delsuc et al., 2003; Bininda-Emonds et al., 2007).

Os Xenarthra são subdivididos em três grupos diferenciados em sua ecologia e morfologia (Paula Couto, 1979; Simpson, 1980; Gaudin, 2004; Gardner, 2007), são eles Cingulata, pertencente à ordem Cingulata e Folivora e Vermilingua, pertencentes à ordem Pilosa.

O grupo Cingulata, representada por tatus, é o grupo mais antigo e contém o maior número de espécies descritas, tanto fósseis como atuais. Os Cingulata possuem o corpo recoberto quase totalmente por uma carapaça óssea, característica que compartilham com as espécies extintas. As espécies atuais pertencem à família Dasypodidae e apresentam bandas móveis em suas carapaças, que permite com que tenham uma maior capacidade de movimentação corporal (Paula Couto, 1979; Möller-Krull et al., 2007). O grupo apresenta diversificados hábitos alimentares e uma grande distribuição geográfica, conseqüentemente ocupam diversos habitats. (Redford, 1985; Eisenberg e Redford, 1999; Gardner, 2007).

O grupo Folivora é representado por preguiças. No passado, o grupo foi bastante diversificado e apresentava muitas espécies que hoje encontram-se extintas. Atualmente, o grupo possui apenas dois gêneros: *Bradypus* (preguiça de três dedos) e *Choloepus* (preguiça de dois dedos), os dois apresentam pequeno porte, são arborícolas e prevalentemente folívoros (Vizcaino et al., 2008).

Dentre as preguiças extintas (Folivora) encontram-se as famílias Mylodontidae, Megalonychidae, Nothroteriidae e Megatheriidae (Gaudin, 2004). As espécies destas famílias tinham, muitas vezes, dimensões agigantadas (Toledo, 1998; Vizcaino et al., 2008). Acredita-se que a diversidade alimentar dos diferentes grupos extintos era ampla, podendo incluir folhas, gramíneas, frutos, tubérculos e raízes. Algumas espécies eram capazes de escavar o solo e ao menos uma espécie era semiaquática (Muizon e McDonald, 1995; Bargo et al., 2000, 2006; Green, 2009).

Os Vermilingua são representados por tamanduás e possuem um escasso registro fóssil. O conhecimento sobre esse grupo se restringe quase totalmente às espécies atuais (Simpson, 1980; Eisenberg e Redford, 1999; Benton, 2000), compostas por três gêneros: *Cyclopes*, que possuem hábitos arborícolas, *Tamanduá*, semiarborícola e *Myrmecophaga*, estritamente terrestre.

Entre as espécies de Xenarthra no Brasil, segundo Portaria MMA nº 148, de 07 de junho de 2022, o *Priodontes maximus* (Tatu Canastra), *Bradypus torquatus* (preguiça de três dedos) e o *M. tridactyla* (Tamanduá-bandeira) estão listados como “vulneráveis” e o *Tolypeutes tricinctus* (Tatu-bola-do-nordeste) está listado como “em risco de extinção”. Já segundo a lista vermelha atualizada em 2013 da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), todos os animais citados são listados como “vulneráveis” com tendência decrescente da população.

Os xenartras, assim como outras espécies animais, são acometidos por inúmeras doenças e assim como outros animais de vida livre, podem ser hospedeiros de agentes patogênicos humanos, como protozoários do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* sendo importantes na epidemiologia de diversas doenças parasitárias por serem considerados disseminadores de zoonoses (Shaw, 1985).

1.2 Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, que juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida) compõem o

filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981, 1993). A família Trypanosomatidae pertence à subordem Trypanosomatina, composta exclusivamente por parasitas, diferenciando-se da subordem Bodonina, composta por espécies parasitas e espécies de vida livre (Lom 1976; Vickerman 1976).

Os tripanosomatídeos apresentam uma grande distribuição geográfica e uma ampla diversidade de hospedeiros, parasitando animais invertebrados e vertebrados de quase todas as ordens (Vickerman, 1976; 1994; Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2006).

Considerando a morfologia dos tripanosomatídeos, nota-se diferenças quanto à forma, comprimento do corpo e flagelo, tamanho e posição do núcleo e cinetoplasto. No ciclo de vida, a localização do cinetoplasto em relação ao núcleo e a presença ou não de membrana ondulante são características determinantes das diferenças apresentadas por esses flagelados: tripomastigota, promastigota, amastigota, opistomastigota, epimastigota e coanomastigota (Wallace, 1966; Wallace et al., 1983).

A família Trypanosomatidae pode apresentar indivíduos monoxênicos, que utilizam apenas um hospedeiro durante seu ciclo de vida, ou heteroxênicos, que utilizam mais de um hospedeiro durante seu ciclo de vida. Os tripanosomatídeos estão divididos nos seguintes gêneros: *Argomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas*, *Rynchoidomonas* e *Wallaceina* que compreende protozoários monoxênicos parasitas de insetos (Hoare, 1972; Lukeš et al., 2014; Votýpka et al., 2014; Sadlova et al., 2019), *Phytomonas* que parasita invertebrados e espécies vegetais (Hoare & Wallace, 1966; Vickerman, 1994, Camargo, 1999), *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum* que apresentam forma heteroxênica, parasitando invertebrados e animais vertebrados durante seu ciclo de vida (Albanaz, 2021; Lukes et al., 2014; Espinosa et al., 2018)

Uma diversidade de estudos filogenéticos busca compreender a origem dos tripanosomatídeos e o modo de vida dos parasitas com ciclos heteroxênicos. Dentre as hipóteses evolutivas levantadas, é possível que um bodonídeo de vida livre tenha sido ingerido por insetos e, então, se adaptado ao trato intestinal, dando origem aos tripanosomatídeos monoxênicos. Com o início da hematofagia, os insetos podem ter inoculado esses parasitas nos vertebrados e os que se adaptaram a este modo de parasitismo passaram a circular em invertebrados e vertebrados (Hamilton et al., 2004, 2007).

Várias espécies de tripanossomatídeos são conhecidas como agentes de doenças de interesse médico e veterinário, dentre os gêneros que parasitam vertebrados destacam-se os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (Hoare, 1972; Maia da Silva et al., 2004a, 2010).

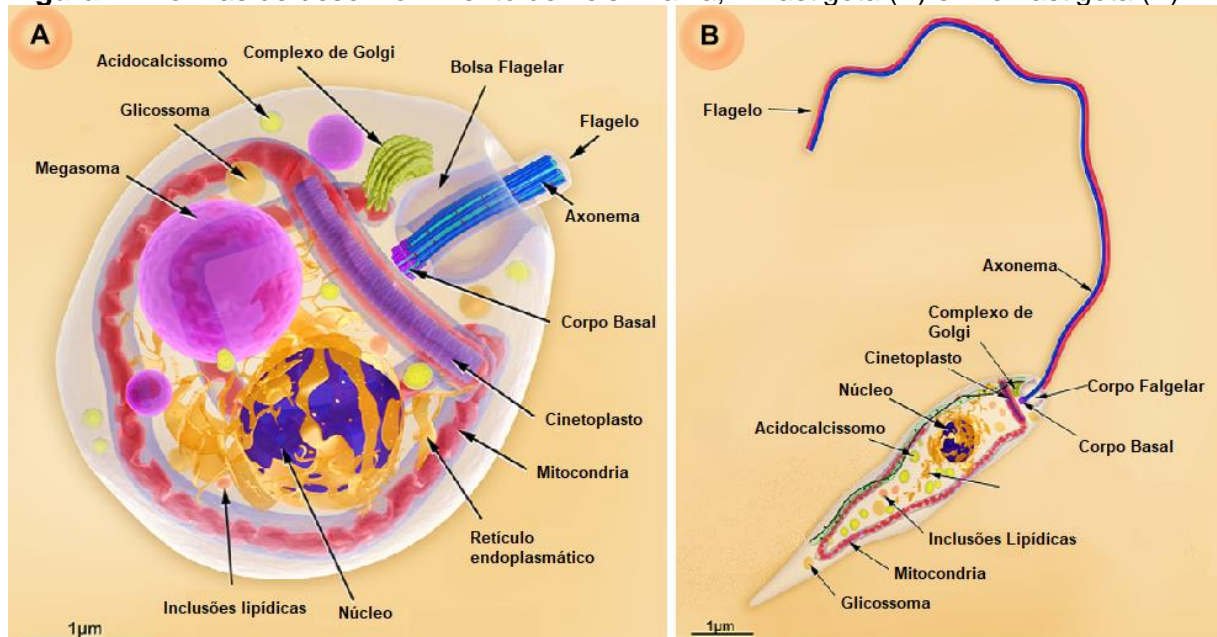
1.3 Gênero *Leishmania*

Os tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios que podem determinar diferentes manifestações clínicas no hospedeiro, dependendo tanto da quantidade de parasitos inoculados pelo flebotomíneo como da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro (Oliveira, et al., 2012; Banuls, et al., 2007).

O gênero *Leishmania* infecta diferentes espécies de mamíferos e apresenta aproximadamente 30 espécies diferentes, destas, pelo menos 20 espécies têm sido encontradas parasitando seres humanos (Ashford, 2000; Azevedo et al., 2020). O gênero é amplamente distribuído no Velho e no Novo Mundo, com exceção da Oceania, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Desjeux, 2004a).

Esses parasitas são organismos heteroxênicos, completam o seu ciclo evolutivo passando pelo menos em dois hospedeiros, vivendo tanto nos fagócitos do retículo endotelial de mamíferos, na forma amastigota, quanto no trato intestinal do inseto vetor, na forma promastigota (Akhoundi et al., 2016). As formas do protozoário se diferenciam morfológicamente de acordo com posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, presença de flagelo livre e pela membrana ondulante (figura 1) (Hoare, 1972; Vickerman, 1994).

Figura 1 - Formas de desenvolvimento de *Leishmania*; Amastigota (A) e Promastigota (B)



Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013.

As espécies de *Leishmania* inicialmente foram divididas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, os quais foram definidos pelas diferenças observadas em relação ao desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo dos insetos vetores, onde o parasita na forma promastigota se desenvolve até a forma infectante (Lainson e Shaw, 1978). O subgênero *Viannia* é restrito ao Novo Mundo, enquanto *Leishmania* (*Leishmania*) está presente no Novo Mundo e no Velho Mundo (Kerr, 2000). Recentemente, foi proposto um novo subgênero, *Mundinia*, para abrigar as espécies *L. enrietti*, e *L. martiniquenses* (Espinosa et al., 2018).

Tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* são transmitidos por dípteros hematófagos da família Psychodidae subfamília Phlebotominae. No Velho Mundo, o vetor mais associado a transmissão de leishmaniose são espécies do gênero *Phlebotomus*, enquanto no Novo Mundo é transmitida por espécies do gênero *Lutzomyia*, popularmente esses insetos são conhecidos como mosquito-palha, birigui, cangalha ou tatuquira (Shaw, 1985; McIntyre et. al., 2017).

As várias espécies do gênero *Leishmania* infectam milhares de pessoas no mundo todo, causando um amplo conjunto de doenças coletivamente denominadas leishmanioses, as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomas (Herwaldt, 1999).

As principais formas clínicas observadas em seres humanos no Brasil, podem ser classificadas como Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar,

a forma mais grave da doença, que acomete o sistema mononuclear fagocítico, podendo ser fatal se não tratado, causada sobretudo pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* do Novo Mundo (Marcili et al., 2014; Azevedo, 2020) e Leishmaniose Tegumentar (LT), que pode apresentar lesões na pele e/ou mucosas, As lesões mucosas são mais frequentes no nariz, boca e garganta, causadas principalmente pelas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia.) braziliensis*, *Leishmania.(Viannia) guyanensis*. (Gontijo, 2003; Azevedo, 2020).

As leishmanioses são doenças negligenciadas, relacionadas à pobreza e a conflitos sociais (Desjeux, 2001, 2004b; Yamey & Torreele, 2002; Bañuls et al., 2007; Lynn & McMaster, 2008). Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e que, a cada ano, 500 mil desenvolvam a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença. Entretanto, esse número pode estar subestimado, uma vez que as leishmanioses são notificadas somente em 33 dos 88 países nos quais elas ocorrem (WHO, 2006). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de distribuição das leishmanioses tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Desjeux, 2004b; WHO, 2006).

Segundo Roque e Jansen (2014), em uma revisão sobre os reservatórios silvestres e sinantrópicos de *leishmania*, diversas ordens da classe Mammalia podem ser consideradas reservatórios potenciais para *Leishmania*. A ordem Pilosa que inclui as preguiças-de-dois-dedos (*Choloepus didactylus*) consideradas hospedeiras de *L. guyanensis*; *Leishmania shawi*, as preguiças-de-garganta-pálida (*Bradypus tridactylus*) consideradas hospedeiras de *L. shawi*, as preguiças-de-dois-dedos de Hoffmann (*Choloepus hoffmanni*) consideradas hospedeiras de *Leishmania colombiensis*; *Leishmania equatorensis*; *Leishmania panamensis*, os tamanduás-mirim (*T. tetradactyla*) considerados hospedeiros de *L. guyanensis*; *L. amazonenses*; *L. infantum*. Já na ordem Cingulata os tatus-galinha (*D. novemcinctus*) que são considerados hospedeiros de *Leishmania naiffi* e *L. guyanensis*.

Além de mamíferos silvestres, os seres humanos e os cães domésticos são considerados importantes hospedeiros vertebrados do gênero *Leishmania*. Do ponto de vista epidemiológico a Leishmaniose canina é considerada uma das doenças de maior importância médica, pois, além de ter uma alta prevalência, o animal pode permanecer por muitos anos com o parasitismo de forma assintomática, favorecendo o ciclo de transmissão para os indivíduos da espécie humana, uma vez que esses

animais estão próximos às habitações humanas ou mesmo vivendo dentro das habitações humanas, atuando como reservatório do parasita no ciclo de transmissão. (Moreno e Alvar, 2002; Dantas-Torres et al., 2007; Laurenti et al., 2013).

1.4 Gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* infectam invertebrados e todas as classes de cordados: anfíbios, aves, mamíferos, peixes e répteis (Hoare, 1972; Cooper et al., 2017; Spodareva et al., 2018). A maioria das espécies se desenvolvem em artrópodes hematófagos, pertencentes à diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas, flebotomíneos e mosquitos (culicídeos) (Hamilton et. al., 2007; Viola et al., 2008).

Muitas espécies de *Trypanosoma* são agentes parasitários de doenças de grande importância médica, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. O *Trypanosoma vivax* infecta ungulados (mamíferos dotados de casco) na África e América do Sul; *Trypanosoma brucei gambiense* causa tripanossomíase humana africana; *Trypanosoma cruzi* causa doença de Chagas na América Latina. Dentre as grandes variedades de espécies de tripanossomas, apenas algumas espécies infectam o homem, sendo elas, *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, nas Américas Central e do Sul e *T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* na África, sendo que apenas *T. rangeli* não é considerada patogênica ao homem (Hoare, 1972; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2007, 2009; Da Silva et al., 2004, 2010).

Devido as estratégias de dispersão de *Trypanosoma* spp. Hoare (1972) dividiu os parasitas de mamíferos de acordo com o seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e com a sua via de eliminação das formas infectantes nas seguintes secções: Salivaria e Stercoraria.

A secção Salivaria compreende apenas tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo e glândulas salivares do vetor, dípteros do gênero *Glossina* (mosca tsé-tsé), sendo transmitidos as formas metacíclicas via repasto sanguíneo desses vetores, presentes nas glândulas salivares, exceto o *Trypanosoma evansi* e o *T. vivax* que se adaptaram a transmissão mecânica, além de serem os únicos que possuem ocorrência fora do continente africano.

A secção Salivaria alberga os subgêneros *Duttonella* (espécies do tipo *T. vivax*), *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Pycnomonas*

(*Trypanosoma suis*) e *Tajeraia* que foi o último a ser disposto nesta secção e apresenta apenas *T. rangeli* como seu representante. (Hoare, 1972; Baker, 1983).

A secção Stercoraria compreende os subgêneros Schizotrypanum (espécie-tipo: *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*) e *Megatrypanum* (*Trypanosoma theileri*), esses se desenvolvem, exclusivamente, no tubo digestivo do inseto vetor e são transmitidos pela contaminação por fezes contendo a forma infectante tripomastigotas metacíclicas. Os tripanossomas desta secção apresentam extensa distribuição geográfica (Hoare, 1972).

Através de análises moleculares filogenéticas foi demonstrado que o gênero *Trypanosoma* é monofilético, atualmente, esse gênero tem sido dividido em pequenos grupos denominados clados, sendo eles o Clado de *T. cruzi*, Clado *T. brucei*, Clado Aquático, Clado de *T. theileri*, Clado de *T. lewisi*, Clado *Trypanosoma grayi*, Clado de *Trypanosoma cyclops*, Clado de *Trypanosoma avium/Trypanosoma corvi*, Clado de tripanossomas de cobras-lagartos e o clado *Trypanosoma terrestres*.

O Clado de *Trypanosoma cruzi*, além do *T. cruzi* reúne tripanossomas de mamíferos do Velho e do Novo Mundo, onde está associado a transmissão por triatomíneos e cimicídeos (Stevens et al., 2001; 2008; Hamilton et al., 2004; 2007; Lima et al., 2012).

O Clado *Trypanosoma brucei* inclui espécies que causam doenças em humanos e outros animais com transmissão dos parasitas associada às moscas do gênero *Glossina*, *Tabanus* ou *Stomoxys*. Na espécie humana o *T. brucei gambiense*, causa a Tripanossomiase Africana, conhecida como “Doença do Sono”. Já em outros animais, alguns tripanossomas causam a doença Nagana, distribuída pelo cinturão tsé-tsé, essa doença acomete principalmente os bovinos, causando prejuízos na produção pecuária. (Connor, 1994; Abebe et al., 2017).

O Clado Aquático, possui Tripanossomas associados à animais aquáticos e semiaquáticos como anfíbios, peixes, répteis e ornitorrincos. Neste clado também foi encontrado um tripanosoma (*Trypanosoma thereziene*) identificado em uma espécie terrestre de camaleão, demonstrando uma modificação evolutiva do parasita (Stevens et al., 2001). Sanguessugas e flebotomíneos são considerados vetores deste clado (Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2008).

Clado de *Trypanosoma theileri*, abrange tripanossomas que infectam bovinos (bubalino e bovino) (Hamilton et al., 2005, 2007; Da Silva et al., 2010), recentemente

T. theileri foi descrito no morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Ramírez et al., 2014).

Clado de *Trypanosoma lewisi*, corresponde a tripanossomas encontrados em espécies de mamíferos das ordens lagomorpha, Iodentia e insetivora. Pulgas são vetores confirmados de alguns tripanosomas deste clado (Da Silva et al., 2010; Ortiz et al., 2018).

Clado *Trypanosoma grayi*, composto por tripanossomas de crocodilianos da África e América do Sul. Moscas tsé-tsé são vetores de alguns tripanosomas deste clado (Hamilton & Stevens, 2017).

Clado de *Trypanosoma cyclops* é composto por isolados de diferentes espécies de vertebrados, como o macaco da Malásia, o canguru *Wallabia bicolor* da Austrália, uma espécie de anuro e diversas espécies de sanguessugas, sugerindo que elas sejam vetores invertebrados da transmissão deste tripanossoma (Hamilton et. al., 2005; Ellis 2021).

O Clado de *Trypanosoma avium/Trypanosoma corvi*, abrange tripanossomas descritos em uma variedade de espécies de aves, com associação de mosquitos e insetos da família Simuliidae como vetores (Votypka et. al., 2012; Cooper et al., 2018).

O Clado de tripanossomas de cobras-lagartos inclui espécies que parasitam répteis e espécies de mamíferos foram inclusas neste mesmo clado. Ainda pouco se sabe sobre o ciclo de transmissão desses tripanossomas. (Hamilton et. al., 2007; Ferreira et. al., 2008; Viola et al., 2008; Ferreira et. al., 2017).

O Clado *Trypanosoma Terrestris* é composto apenas pela espécie *T. terrestres*, isolado de antas (*Tapirus terrestris*) no estado do Espírito Santo, Brasil. O vetor deste tripanossoma permanece desconhecido (Acosta et. al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

O território brasileiro possui cerca de 60% do seu total constituído por formações vegetais nos diferentes biomas (IBGE, 2012). Entretanto, nos últimos anos com o crescimento da populacional e a demanda global por recursos naturais levaram a um aumento da exploração animal e, conseqüentemente, ao uso de terras antes habitadas pela fauna (Peñuela S et al., 2012). As estradas estão entre as principais alterações antrópicas ao meio ambiente e representam uma grande ameaça à fauna (Spellberg, 1998; Trombulak e Frissel, 2000), principalmente devido aos efeitos das colisões/atropelamento (Van Der Zande et al., 1980; Kuiken, 1988; Philcox et al., 1999; Trombulak e Frissel, 2000) e o efeito de barreira e a fragmentação/alteração de habitats naturais (Pinto Santos J; Barcelos Sobansk M, 2014).

As alterações geradas pelas construções de rodovias impactam uma grande variedade de grupos animais, dentre estes grupos destacamos os xenartros, que são característicos da fauna do continente americano e são amplamente distribuídos. Os xenartros possuem grande relevância devido à capacidade de atuarem como reservatórios de vários agentes zoonóticos, dentre os quais os parasitas do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*. No Brasil, como na América do Sul, existem poucos estudos sobre esse grupo de parasitas em algumas espécies de Xenartros impossibilitando o conhecimento da prevalência desses parasitas nessas espécies de mamíferos.

3. OBJETIVOS

Determinar a ocorrência e a diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em Xenarthras monitorados e que foram encontrados atropelados em rodovias do estado do Mato Grosso do Sul.

3.1 Objetivos específicos

Isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* em xenartros monitorados e que foram atropelados em estradas do estado do Mato Grosso do Sul.

Caracterização molecular dos isolados obtidos e de amostras diretas (tecidos) colhidas dos xenartros monitorados e que foram atropelados em estradas do estado do Mato Grosso do Sul.

Posicionamento filogenético baseado em sequencias dos genes ribossômico (SSUrDNA) e gliceraldeído fosfato desidrogenase (gGAPDH).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP sob Nº. 8180050520

4.1 Obtenção de amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas e cedidas por pesquisadores do Projeto Bandeiras e Rodovias, que busca compreender a alta taxa de mortalidade de Xenarthras, com ênfase em tamanduás e diminuir as taxas de colisão veicular em rodovias brasileiras, proporcionando estradas mais seguras para a fauna e usuários das rodovias.

O Projeto Bandeiras e Rodovias abrange diversas rodovias brasileiras e amostra principalmente o tamanduá-bandeira e outros Xenarthras atropelados. Atualmente, são amostradas as rodovias BR262 (rodovia transversal que liga os estados de Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul), BR267 (rodovia transversal que corta os estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul) e MS040 (rodovia que corta o estado do Mato Grosso do Sul).

As amostras provêm de diversos Xenarthras, principalmente tamanduás monitorados pelo Projeto Bandeiras e Rodovias, as amostras são compostas de tecidos provenientes do fígado, baço e linfonodos mesentéricos dos animais encontrados mortos por atropelamento.

A maior parte das amostras, por se tratarem de animais encontrados atropelados em rodovias, já apresentavam um alto estado de degradação.

As amostras coletadas foram conservadas em etanol, em micro tubos de 1,5 ml e encaminhadas para o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo e armazenados em congeladores à -20°C, para a realização desta pesquisa.

4.2 Extração de DNA e Reações de amplificação

Para a realização da extração do DNA das amostras de tecidos, coletados dos Xenarthras atropeladas em rodovias brasileiras utilizados neste trabalho, foi utilizado

o kit comercial de extração de DNA Kit PureLink® (ThermoFisher), baseado nas recomendações e protocolos do fabricante.

Algumas amostras randomizadas extraídas foram submetidas a quantificação de DNA em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) para validar a extração.

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 (Da Silva et. al., 2004; 2010; Rodrigues et. al., 2006; Marcili et. al., 2009a, 2009b; 2009c; Hamilton et. al., 2004, 2007; Brisse et al., 2003; Silva et al., 2019).

4.3 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).

5. RESULTADOS

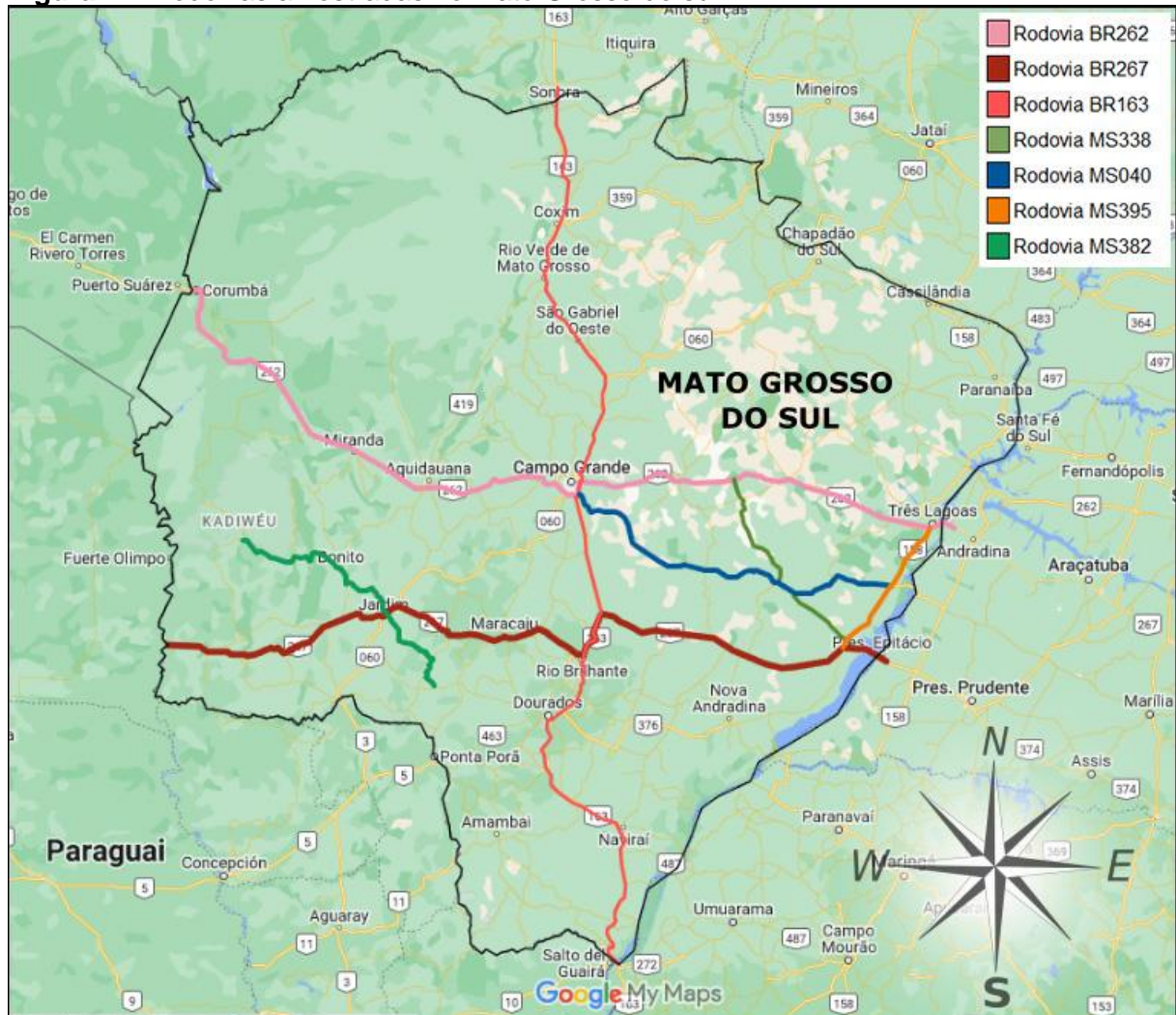
Um total de 218 amostras foram analisadas pelo método de PCR convencional para diferentes marcadores moleculares. Das 218 amostras, 72 amostras eram provenientes de baço, 74 de fígado e 72 de linfonodo mesentérico e obtidas de 74 animais (Tabela1), sendo 44 tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (131 amostras), 12 tamanduás-mirim (*T. tetradactyla*) (34 amostras), 9 tatus-peba (*E. sexcinctus*) (27 amostras), 6 tatus-galinha (*D. novemcinctus*) e 3 tatus-rabo-mole (*Cabassous unicinctus*) (9 amostras).

Todas as amostras são de Xenarthras oriundos do Mato Grosso do Sul, encontrados mortos, por atropelamento, nas rodovias BR262, BR267, BR163, MS338, MS040, MS395 e MS382 (Figura 2), com exceção de um tamanduá-mirim que foi encontrado na avenida Presidente Ernesto Geisel, que é uma das principais avenidas da cidade de Campo Grande, MS e um tamanduá-bandeira que foi encontrado próximo ao aeroporto de Campo grande, MS.

Tabela 1 - Espécies de animais e tecidos utilizados por amostra

| Espécie | Nome popular | Identificação | Tecido |
|--------------------------------|-------------------|---|---|
| <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Tamanduá Bandeira | NEC18; NEC22; NEC24; NEC25; NEC26; NEC28; NEC30; NEC31; NEC32; NEC34; NEC35; NEC36; NEC37; NEC39; NEC40; NEC41; NEC43; NEC44; NEC55; NEC58; NEC61; NEC62; NEC63; NEC64; NEC65; NEC66; NEC67; NEC69; NEC70; NEC71; NEC73; NEC77; NEC81; NEC82; NEC83; NEC87; NEC88; NEC89; NEC90; NEC92; NEC96; NEC97; NEC100; NEC74 | Fígado/Baço/Linfonodo mesentérico Fígado/Linfonodo mesentérico |
| <i>Tamandua tetradactyla</i> | Tamanduá Mirim | NEC16; NEC19; NEC21; NEC33; NEC60; NEC78; NEC85; NEC93; NEC94; NEC99 NEC56 NEC68 | Fígado/Baço/Linfonodo mesentérico Fígado Fígado/Baço |
| <i>Cabassous unicinctus</i> | Tatu-de-rabo-mole | NEC38; NEC42; NEC48 | Fígado/Baço/Linfonodo mesentérico |
| <i>Dasyus novemcinctus</i> | Tatu galinha | NEC17; NEC20; NEC52; NEC75; NEC91 NEC72 | Fígado/Baço/Linfonodo mesentérico Fígado/Baço |
| <i>Euphractus sexcinctus</i> | Tatu peba | NEC23; NEC45; NEC49; NEC50; NEC51; NEC57; NEC59; NEC80; NEC86 | Fígado/Baço/Linfonodo mesentérico |

Figura 2 – Rodovias amostradas no Mato Grosso do sul.



Fonte: adaptado de Google Maps.

As 218 amostras extraídas foram amplificadas para os genes V7V8, Citocromo B, gGAPDH para detecção de tripanossomatídeos em geral e Catepsina L-like para detecção de *Leishmania infantum*. Também foi realizada outra reação de PCR, utilizando o gene Citocromo B para mamíferos, de forma randomizada, para validar a eficácia da extração de DNA, que confirmou uma extração de DNA satisfatória dos tecidos.

Os resultados obtidos pelas análises do gene V7V8 revelam uma ocorrência de 18,18 % (8 animais) de animais infectados em *M. tridactyla* (Tamanduá-bandeira) e 8,3% (1 animal) em *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim). Para as análises do gene gGAPDH, constatou-se a ocorrência de 22,22% (2 animais) de animais infectados em *E. sexcinctus* (tatu-peba), 16,66% (1 animal) em *D. novemcinctus* (tatu-galinha),

16,66% (2 animais) em *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim) e 2,27% (1 animal) em *M. tridactyla* (Tamanduá-bandeira) (Tabela2).

Todas as 218 amostras testadas para os genes Citocromo B e Catepsina L-like apresentaram resultados negativos.

Tabela 2 - Resultados das ampliações

| Espécie | Identificação | Tecido | V7V8 | gGAPDH | Citocromo B | Catepsina L-like |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------|-------------|------------------|
| <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | NEC24 | Baço | + | - | - | - |
| | NEC34 | Fígado | + | - | - | - |
| | NEC40 | Baço | + | - | - | - |
| | NEC44 | Baço | + | - | - | - |
| | NEC70 | Baço | + | - | - | - |
| | NEC71 | Fígado | + | - | - | - |
| | NEC73 | Baço | + | - | - | - |
| | | Fígado | + | - | - | - |
| | NEC87 | Linfonodo mesentérico | - | + | - | - |
| | NEC89 | Baço | + | - | - | - |
| <i>Tamandua tetradactyla</i> | NEC19 | Fígado | - | + | - | - |
| | | Linfonodo mesentérico | - | + | - | - |
| | NEC78 | Baço | - | + | - | - |
| | NEC85 | Baço | + | - | - | - |
| <i>Dasyus novemcinctus</i> | NEC17 | Fígado | - | + | - | - |
| | <i>Euphractus sexcinctus</i> | NEC23 | Linfonodo mesentérico | - | + | - |
| NEC50 | | Baço | - | + | - | - |

Ao todo, os resultados revelam uma prevalência de tripanossomatídeos de 25% (3 animais) em *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim), 22,22% (2 animais) em *E. sexcinctus* (tatu-peba), 20,45% (9 animais) em *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira) e 16,66% (1 animal) em *D. novemcinctus* (tatu-galinha). Sendo que dos tamanduás-mirim positivos, 66,66% (2 animais) eram do sexo masculino e 33,33% (1 animal) eram do sexo feminino. Dos tatus-peba positivos, 100% (2 animais) eram do sexo feminino. Dos tamanduás-bandeira positivos, 66,66% (6 animais) eram do sexo masculino e 33,33% (3 animais) eram do sexo feminino. O tatu-galinha positivo era do sexo masculino (Tabela 3).

Todas os fragmentos de DNA positivos foram purificados e submetidos à sequenciamento, obtendo-se resultados inconclusivos.

Tabela 3 - Sexo e maturidade sexual dos animais testados positivo para marcadores de tripanossomatídeos.

| Espécie | Nome popular | Identificação | Sexo | Maturidade |
|--------------------------------|-------------------|---------------|-----------|------------|
| <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Tamanduá-Bandeira | NEC24 | Masculino | Filhote |
| | | NEC34 | Masculino | Adulto |
| | | NEC40 | Masculino | Adulto |
| | | NEC44 | Masculino | Adulto |
| | | NEC70 | Masculino | Adulto |
| | | NEC71 | Feminino | Jovem |
| | | NEC73 | Feminino | Adulto |
| | | NEC87 | Masculino | Adulto |
| | | NEC89 | Feminino | Adulto |
| <i>Tamandua tetradactyla</i> | Tamanduá-Mirim | NEC19 | Feminino | Adulto |
| | | NEC78 | Masculino | Adulto |
| | | NEC85 | Masculino | Adulto |
| <i>Euphractus sexcinctus</i> | Tatu-Peba | NEC23 | Feminino | Adulto |
| | | NEC50 | Feminino | Adulto |
| <i>Dasypus novemcinctus</i> | Tatu-Galinha | NEC17 | Masculino | Adulto |

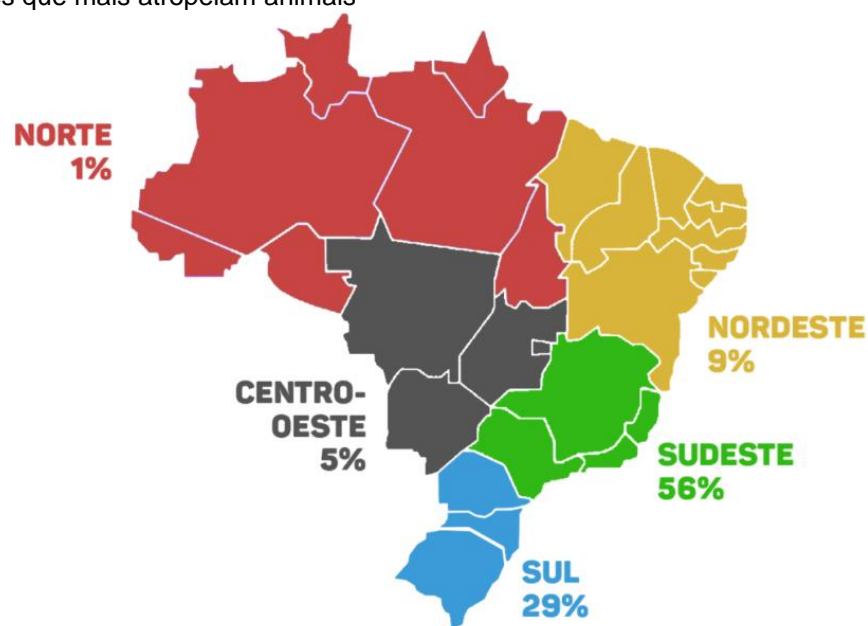
6. DISCUSSÃO

O Projeto Bandeiras e Rodovias pertence ao Instituto de Conservação de Animais Silvestres (ICAS), uma organização sem fins lucrativos dedicada à conservação da biodiversidade. O Projeto Bandeiras e Rodovias é composto por pesquisadores empenhados em compreender os impactos das rodovias em Xenarthras do Mato Grosso do Sul, monitorar a saúde animal e avaliar o comportamento das espécies em sua estrutura populacional, dedicando-se principalmente aos tamanduás-bandeira.

As principais ameaças à biodiversidade identificadas em Xenarthras são o atropelamento em rodovias, injúrias térmicas (tanto queimadura direta como inalação de fumaça), redução de habitat, efeito de barreira, caça e doenças infecciosas (Zimbres, 2010; Torres, 2019).

Segundo os dados do sistema Urubu (sistema brasileiro de monitoramento de colisões de veículos com animais silvestres), anualmente no Brasil, 475 milhões de animais sofrem atropelamentos em rodovias, deste total, 56% ocorrem na região sudeste, 29% na região sul, 9% na região nordeste, 5% na região centro-oeste e 1% na região norte do país (figura 3). Dos animais vitimizados pelos atropelamentos, 90% são de pequeno porte, 9% de médio porte, como a maioria das espécies de tatus e 1% de grande porte, como o tamanduá-bandeira.

Figura 3 - Regiões que mais atropelam animais



Fonte: Adaptado de Sistema Urubu, 2022.

Além do impacto para a fauna silvestre, as colisões veiculares com animais de grande porte são uma ameaça à segurança humana e representam um custo econômico para a sociedade, pois podem causar danos materiais, psicológicos e físicos, e em alguns casos são responsáveis por óbitos humanos (Abra, 2019).

Tais dados corroboram com estudos anteriores que evidenciam que as estradas instituem barreiras para o movimento natural da fauna silvestre, devido à atenuação de conectividade entre habitats, ocasionado a redução das populações, o declínio de suas taxas de reprodução, a diminuição de sua viabilidade genética e uma alta mortalidade, principalmente por colisões. Esses dados evidenciam que existe uma crescente necessidade de serem adotadas medidas de mitigação dos danos e barreiras que as estradas e rodovias representam para a conservação da biodiversidade (Borghi et al., 2012; Costa, 2018; Abra, 2019).

Em diversos países, medidas de mitigação das colisões veiculares com a fauna silvestre têm sido adotadas, normalmente divididas em duas categorias. Em uma categoria estão as medidas que visam influenciar o comportamento da fauna, como o planejamento e a construção de passagens inferiores e superiores para a fauna, bueiros adaptados, viadutos elevados, pontes e pontilhões para a fauna, tuneis para pequenos animais e cercamentos das rodovias. Na outra categoria estão as medidas que visam influenciar o comportamento do motorista, como melhorias na sinalização, indicação de passagem de animais silvestres, redutores de velocidade e sistemas de detecção animal que avisam o usuário sobre a presença de animais na via.

Também são necessárias adoções de medidas mais simples e de baixo custo, relacionadas à educação para o trânsito e à conscientização social, para que os motoristas respeitem os limites de velocidade, tenham mais atenção e evitem trafegar no período noturno, principalmente nos trechos onde há uma maior ocorrência de animais trafegando em rodovias (Borghi et al, 2012).

Por meio do monitoramento constante das colisões veiculares com animais silvestres a equipe do projeto Bandeiras e Rodovias disponibiliza amostras de tecidos e sangue de *Xenarthras* para colaboradores parceiros, colaborando com possíveis descobertas de doenças infecciosas e oportunizando uma melhor compreensão do ciclo de diversas doenças e dos impactos antrópicos diretos e indiretos no ciclo natural desses animais.

Atualmente há um crescente interesse em aprofundar o conhecimento do ciclo de doenças em animais silvestres, por parte dos profissionais que atuam na saúde

pública e na saúde animal, principalmente porque grande parte dos patógenos destes animais estão frequentemente associados a infecções em animais domésticos e a infecções humanas (Worbeser et al., 2005; Torres, 2019).

São poucos os estudos com foco na pesquisa de patógenos em animais atropelados. No Brasil são registrados 7 estudos e realizados, na grande parte, na malha rodoviária do estado de São Paulo (Richini-Pereira et al., 2008; Richini-Pereira et al., 2010; Richini-Pereira et al., 2014; Losnak et al., 2018; Kluiber et al., 2020; Navas-Suarez et al., 2021; Caldart et al., 2021). Sendo, apenas dois estudos, objetivando o estudo de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* (Richini-Pereira et al., 2014; Caldart et al., 2021).

Para o presente trabalho, as amostras foram cedidas para ser estudada a prevalência de tripanossomatídeos, através de análises moleculares, uma vez que os Xenarthras possuem grande relevância devido à capacidade de atuarem como reservatórios de vários agentes zoonóticos, dentre os quais os parasitas do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*

As análises pelo método molecular de PCR convencional demonstraram que há um grande número de amostras positivas para *Trypanosoma spp.*, porém os resultados não refletem necessariamente a prevalência total de tripanossoma com potencial de infecção aos humanos ou animais domésticos, pois as amostras obtidas tiveram uma baixa quantidade de DNA viável para que fosse possível realizar o sequenciamento e o posicionamento filogenético, a maioria das amostras apresentavam um elevado grau de degradação.

Amostras de material biológico em degradação, devido à exposição à fatores ambientais ou químicos, geram um desbalanceamento das amplificações pelo método de PCR convencional, impedindo a obtenção eficiente dos perfis gênicos para a realização do sequenciamento. (Hara et al., 2015; Arenas et al., 2017; Zavala et al., 2019).

O tamanduá-bandeira é o animal com o maior número amostral deste trabalho, uma vez que essa é a espécie com maior número de animais monitorados pela equipe do Projeto Bandeiras e Rodovias, além disso, esses animais possuem hábitos terrestres, comportamentos de forrageamento, são relativamente lentos e possuem baixa visão e baixa audição (Drumond, 1994), o que os tornam mais vulneráveis às colisões veiculares.

Foram analisados pelo método molecular de PCR convencional amostras de 44 *M. tridactyla* (tamanduás-bandeira) e de 12 *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim). Desses animais, 12 testaram positivo para marcadores de tripanossomatídeos, 9 tamanduás-bandeira e 3 tamanduás-mirim.

Estudos anteriores relatam infecções por tripanossomatídeos em tamanduás, como uma infecção mista tripla de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *L. infantum* em um *T. tetradactyla* capturado no Brasil (De Araújo et al., 2013) a infecção de *T. rangeli* em uma amostra de tamanduá-mirim analisado pelo método de Eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), em um estudo realizado na região da usina hidrelétrica Petit Saut na Guiana francesa (Derure, 2001) e a infecção de *T. Lageri* (atualmente *T. rangeli* B) em 44% das amostras de *T. tetradactyla*, em um estudo de hemoparasitoses, também na Guiana francesa (Thoisy, 2000).

Outros estudos, através de parâmetros morfológicos e moleculares, apontam infecção de *T. cruzi* em tamanduás nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Como a infecção de formas similares ao *T. cruzi* em tamanduás no Piauí, identificada através de análises morfológicas (Bento, 1992) e a infecção de *T. cruzi* em *T. tetradactyla* no estado do Pará, identificada através de análises moleculares (De Araújo et al., 2013).

Os tatus são os animais com o número amostral mais baixo deste trabalho: nove tatus peba, seis tatus galinha e três tatus-do-rabo-mole. Apesar do baixo número amostral, foi possível observar uma alta prevalência de tripanossomatídeos nos animais analisados, com exceção do *Cabassous unicinctus* (tatu-do-rabo-mole), pois todos os indivíduos analisados obtiveram resultados negativos.

Os tatus possuem uma temperatura corpórea baixa, sistema imunológico frágil e possuem hábitos de viver imersos no solo e/ou matéria orgânica, além de compartilhar suas tocas com outros animais, favorecendo uma relação constante com diversos grupos de patógenos e vetores. Devido à sua ecologia, esses animais tem um grande potencial para se tornarem hospedeiros de inúmeras doenças com caráter zoonótico, como coccidiodomicose, hanseníase, toxoplasmose e doença de Chagas (Souza, 2016).

Os tatus em geral são considerados uma preocupação à saúde pública, uma vez que estes animais são alvos de caça para práticas como artesanatos, uso medicinal e principalmente para a alimentação, aumentando os riscos de transmissão de doenças ao ser humano (Roque; Jansen, 2014; Desbiez et.al, 2022.).

Há pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas infectando Xenarthras, porém há poucas descrições disponíveis sobre infecções de *Leishmania* em tatus. Apenas duas espécies de *Leishmania* (*L. naiffi* e *L. guyanensis*) foram descritas em infecções em *D. novemcinctus*, ambas causadoras da forma tegumentar da leishmaniose (Shaw, 1999, 2006.). Atualmente, o único isolado de *L. naiffi* identificado em um hospedeiro não humano foi descrito em um *D. novemcinctus*.

Diversos estudos, realizados através de morfologia, xenodiagnóstico ou análises moleculares, variando o método conforme o estudo, descrevem uma ampla distribuição de *T. Cruzi* infectando tatus, encontrados na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela e no sul de Luisiana nos Estados Unidos (Hoare, 1972; Miles et al, 1981; Barr, 1991; Fernandes et al., 1999; Yeo et al., 2004; Roque et al., 2008; Lisboa et al., 2009; Llewellyn et al., 2009; Alvarado-Otegui et al., 2012; Morocoima et al., 2012; Orozco et al., 2013; Ramírez et al., 2013; Tenorio et al., 2014; Martins et al., 2015; Acosta et al., 2017; Enriquez et al. 2022). Estes dados demonstram que os tatus são hospedeiros do *T. cruzi*, parasita que causa a doença de chagas e que possui grande relevância para a saúde pública.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, através dos testes moleculares, evidenciaram uma grande quantidade de tamanduás e tatus infectados por tripanossomatídeos e são amparados pelos estudos anteriores que revelam uma alta prevalência de tripanossomatídeos em Xenarthras.

No entanto, ao interpretar os resultados obtidos, a origem das amostras utilizadas neste trabalho deve ser considerada, que por se tratarem de amostras coletadas de animais atropelados, conseqüentemente já em estado de degradação incerto, não permitiram a obtenção do sequenciamento e conseqüentemente impossibilitaram a realização do posicionamento filogenético das espécies de tripanossomatídeos contidos nas amostras.

Evidenciando-se assim a necessidade de que estudos posteriores sejam realizados, para que seja possível compreender de forma mais ampla quais espécies de patógenos estão circulando nas populações de Xenarthras brasileiros e caracterizá-las proporcionando assim uma maior compreensão dos ciclos naturais das doenças parasitárias e dos efeitos das ações antrópicas dentro dos ecossistemas.

8. REFERÊNCIAS

ABEBE, Rahmeto; GUTE, Solomon; SIMON, Ijigu. Bovine trypanosomosis and vector density in Omo-Ghibe tsetse belt, South Ethiopia. **Acta tropica**, v. 167, p. 79-85, 2017.

ABRA, Fernanda Delborgo et al. Pay or prevent? Human safety, costs to society and legal perspectives on animal-vehicle collisions in São Paulo state, Brazil. **Plos One**, v. 14, n. 4, p. e0215152, 2019.

ACOSTA, Igor da Cunha et al. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2013.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALBANAZ, Amanda TS et al. Genome analysis of *Endotrypanum* and *Porcisia* spp., closest phylogenetic relatives of *Leishmania*, highlights the role of amastins in shaping pathogenicity. **Genes**, v. 12, n. 3, p. 444, 2021.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ARENAS, Miguel et al. Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair. **PLoS genetics**, v. 13, n. 9, p. e1006960, 2017.

ASHFORD, Richard W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

AZEVEDO, Roberta et al. Leishmaniose Visceral no Brasil: o que é preciso saber. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 1, n. 3, p. 24-31, 2021.

BAKER, J. R. The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man and Domestic Animals. DH Molyneux and RW Ashford.(1983). ISBN 0 85066 2427. Cloth, 294 pp.,£ 16.00. London: Taylor & Francis, Ltd., 4 John St., London WC1N 2ET. 1983.

BANULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-458, 2007.

BARGO, M. Susana et al. Limb bone proportions, strength and digging in some Lujanian (Late Pleistocene-Early Holocene) mylodontid ground sloths (Mammalia, Xenarthra). **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 20, n. 3, p. 601-610, 2000.

BARGO, M. Susana; TOLEDO, Néstor; VIZCAÍNO, Sergio F. Muzzle of South American Pleistocene ground sloths (*Xenarthra*, Tardigrada). **Journal of Morphology**, v. 267, n. 2, p. 248-263, 2006.

BARNOSKY, Anthony D.; LINDSEY, Emily L. Timing of Quaternary megafaunal extinction in South America in relation to human arrival and climate change. **Quaternary International**, v. 217, n. 1-2, p. 10-29, 2010.

BARR, S. C. et al. The lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums and armadillos from southern Louisiana. **The Journal of parasitology**, p. 624-627, 1991.

Benton, M.J., Vertebrate paleontology. Blackwell Science, Oxford. 2000.

BININDA-EMONDS, Olaf RP et al. The delayed rise of present-day mammals. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 507-512, 2007.

BORGHI, C. E. et al. Efeitos indiretos sobre a fauna do corredor bioceânico central em uma área protegida do deserto do Monte: PP Ischigualasto. **Ecologia de Estradas: Tendências e pesquisas. Lavras (ed) UFLA, Lavras**, v. 314, p. 237-252, 2012.

BORRERO, Luis Alberto et al. The Pleistocene–Holocene transition and human occupations in the southern cone of South America. **Quaternary International**, v. 49, p. 191-199, 1998.

BRISSE, Sylvain et al. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, genetics and evolution**, v. 2, n. 3, p. 173-183, 2003.

BUCHMANN, Francisco Sekiguchi; LOPES, Renato Pereira; CARON, Felipe. Icnofósseis (paleotocas e crotovinas) atribuídos a mamíferos extintos no sudeste e sul do Brasil. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v. 12, n. 3, p. 247-256, 2009.

CAMARGO, Erney Plessmann. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1999.

CARTELLE, C. Pleistocene mammals of the Cerrado and Caatinga of Brazil. Mammals of the Neotropics, the Central Neotropics, vol. 3, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. 1999.

CARTELLE, Cástor; DE IULIIS, Gerardo; PUJOS, François. A new species of Megalonychidae (Mammalia, Xenarthra) from the quaternary of Poço Azul (Bahia, Brazil). **Comptes Rendus Palevol**, v. 7, n. 6, p. 335-346, 2008.

Connor RJ. The impact of nagana. *Onderstepoort J Vet Res.*61(4):379–83, 1994.

COOPER, Crystal et al. A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into cross-continental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2017.

COOPER, Crystal et al. Next generation sequencing reveals widespread trypanosome diversity and polyparasitism in marsupials from Western Australia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2018.

COSTA, Bruno Ferreira de Oliveira. Análise da percepção das medidas mitigatórias para preservação da fauna nas rodovias brasileiras. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Administração)—Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

DA SILVA, F. Maia et al. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *lewisi* from domestic rats to primates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 522-529, 2010.

DA SILVA, F. Maia et al. 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**, v. 129, n. 5, p. 549-561, 2004a.

DA SILVA, F. Maia et al. 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**, v. 128, n. 3, p. 283-294, 2004a.

DA SILVA, Ryan Emiliano et al. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DE ARAUJO, Vitor Antonio L. et al. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 140, n. 4, p. 455-460, 2013.

DE THOISY, Benoît et al. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1035-1040, 2000.

DE TOLEDO, Peter Mann. **Locomotory patterns within the Pleistocene sloths**. University of Colorado at Boulder, 1996.

DE VIVO, Mario; CARMIGNOTTO, Ana Paula. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. **Journal of Biogeography**, v. 31, n. 6, p. 943-957, 2004.

DELSUC, Frédéric et al. Molecular phylogenetics unveils the ancient evolutionary origins of the enigmatic fairy armadillos. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 673-680, 2012.

DELSUC, Frédéric; STANHOPE, Michael J.; DOUZERY, Emmanuel JP. Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 28, n. 2, p. 261-275, 2003.

DEREURE, J. et al. Trypanosomatidae from wild mammals in the neotropical rainforest of French Guiana. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 157-166, 2001.

DESBIEZ, Arnaud Leonard Jean et al. O que sabemos sobre os tatus do Pantanal? Revisão do conhecimento sobre ecologia, biologia, morfologia, saúde, conservação, distribuição e métodos de estudo. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 17, n. 1, p. 11-69, 2022.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004b.

DRUMOND, Maria Auxiliadora. **Padrões de forrageamento do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no Parque Nacional da Serra da Canastra: dieta, comportamento alimentar e efeito de queimadas**. 1992. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

EISENBERG, John F.; REDFORD, Kent H. **Mammals of the Neotropics, Volume 3: Ecuador, Bolivia, Brazil**. University of Chicago Press, 1989.

ELLIS, John et al. A new subspecies of *Trypanosoma cyclops* found in the Australian terrestrial leech *Chtonobdella bilineata*. **Parasitology**, v. 148, n. 10, p. 1125-1136, 2021.

ENRIQUEZ, Gustavo Fabián et al. Over-dispersed *Trypanosoma cruzi* parasite load in sylvatic and domestic mammals and humans from northeastern Argentina. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2022.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.

FERREIRA, Juliana IGS et al. New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado. **Acta tropica**, v. 176, p. 249-255, 2017.

FERREIRA, Robson C. et al. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia 1. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 427-435, 2008.

FRANCO, Jose R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 257, 2014.

GARDNER, A. L. Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats. **Mammals of South America**, v. 1, 2007.

GARDNER, A. L. Order Cingulata. In: Wilson DE, Reeder DM. (Ed.). Mammal species of the world. v.1. Baltimore, The Johns Hopkins University Press; 94-9 p, 2005.

GAUDIN, Timothy J. Phylogenetic relationships among sloths (Mammalia, Xenarthra, Tardigrada): the craniodental evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 2, p. 255-305, 2004.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GREEN, Jeremy L. Dental microwear in the orthodontine of the Xenarthra (Mammalia) and its use in reconstructing the palaeodiet of extinct taxa: the case study of *Nothrotheriops shastensis* (Xenarthra, Tardigrada, Nothrotheriidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 1, p. 201-222, 2009.

HAMILTON, P. B. et al. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81-86, 2009.

HAMILTON, Patrick B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393-1404, 2004.

HAMILTON, Patrick B.; GIBSON, Wendy C.; STEVENS, Jamie R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 1, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, Patrick B.; STEVENS, Jamie R. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. Elsevier, p. 321-344, 2017.

HARA, M. et al. Relationship between DNA degradation ratios and the number of loci detectable by STR kits in extremely old seminal stain samples. **Legal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 391-393, 2015.

HOARE, Cecil A. et al. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.**, 1972.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. **The Lancet**, p.354:1191-9.1999

HOARE, Cecil A.; WALLACE, Franklin G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385-1386, 1966.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil detém segunda maior área florestal do planeta. **Editorial Meio ambiente**. www.brasil.gov.br. Publicado: 06/12/2012, última modificação: 23/12/2017.

KAUFER, Alexa; STARK, Damien; ELLIS, John. A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. **International journal for parasitology**, v. 50, n. 6-7, p. 449-460, 2020.

KERR, Sara F. Palaeartic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 75-80, 2000.

KOCH, Paul L.; BARNOSKY, Anthony D. Late Quaternary extinctions: state of the debate. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, 2006.

KUIKEN, M. Consideration of environmental and landscape factors in highway planning in valued landscapes: an Australian survey. **Journal of Environmental management**, v. 26, n. 3, p. 191-201, 1988.

LAURENTI, Márcia Dalastra et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LEJON, Veerle; BENTIVOGLIO, Marina; FRANCO, José Ramon. Human African trypanosomiasis. **Handbook of clinical neurology**, v. 114, p. 169-181, 2013.

LIMA, Luciana et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. **Protist**, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LUKEŠ, Julius et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

LYNN, Miriam A.; MCMASTER, W. Robert. Leishmania: conserved evolution—diverse diseases. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 3, p. 103-105, 2008.

LYONS, S. Kathleen; SMITH, Felisa A.; BROWN, James H. Of mice, mastodons and men: human-mediated extinctions on four continents. **Evolutionary Ecology Research**, v. 6, n. 3, p. 339-358, 2004.

MAIA DA SILVA, F. et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 16, p. 3361-3373, 2007.

MALVY, D.; CHAPPUIS, François. Sleeping sickness. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 986-995, 2011.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641-655, 2009a.

MARCILI, Arlei et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIlc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1265-1274, 2009b.

MARCILI, Arlei et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 615-623, 2009c.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKY, W. A. Relações parasito, parasitismo e hospedeiro. **John DT, Krotoski WA. Parasitologia médica. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 6-7, 2003.

MARSHALL, Larry G. et al. Mammalian evolution and the great American interchange. **Science**, v. 215, n. 4538, p. 1351-1357, 1982.

MCDONALD, H. Gregory. Paleoecology of extinct xenarthrans and the Great American Biotic Interchange. **Bulletin of the Florida Museum of Natural History**, v. 45, n. 4, p. 313-333, 2005.

MCINTYRE, Shannon et al. 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. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2017.

MIRANDA, Flavia R. et al. Taxonomic review of the genus *Cyclopes* Gray, 1821 (Xenarthra: Pilosa), with the revalidation and description of new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 3, p. 687-721, 2018.

MÖLLER-KRULL, Maren et al. Retroposed elements and their flanking regions resolve the evolutionary history of xenarthran mammals (armadillos, anteaters, and sloths). **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 11, p. 2573-2582, 2007.

MORENO, Javier; ALVAR, Jorge. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MUIZON, C. de; MCDONALD, H. G. An aquatic sloth from the Pliocene of Peru. **Nature**, v. 375, n. 6528, p. 224-227, 1995.

OLIVEIRA, M. A.; RABELLO, A.; AFONSO, L. C. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1850, 2012.

OROZCO, M. Marcela et al. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 872, 2013.

ORTIZ, Paola A. et al. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of rodents. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 380-390, 2018.

PEÑUELA-GÓMEZ, S. M. et al. Conocimiento y Gestión de las Enfermedades de los Animales Silvestres en Colombia. **Asoc. Veterinarios de Vida Silvestre (VVS)-Wildlife Conservation Society (WCS)(Bogotá)**. 220p, 2012.

PHILCOX, C. K.; GROGAN, A. L.; MACDONALD, D. W. Patterns of otter *Lutra lutra* road mortality in Britain. **Journal of applied Ecology**, p. 748-762, 1999.

Pinto Santos J; Barcelos Sobansk M. Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade - Vol. 2: **Congestas**. 2014. ISSN 2318-760.

RAMÍREZ, Juan David et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 250-256, 2014.

REDFORD, K. H. Food habits of armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). In *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermitinguas* (ed. G. G. Montgomery), pp. 429–437. **Smithsonian Institution Press**, Washington, D.C, 1985.

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**.132(Pt 2):215-24, 2006.

ROQUE, André Luiz R.; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

SHAW, J. J. et al. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. **Contributions to**

the knowledge of Diptera: a collection of articles on Diptera commemorating the life and work of Graham B. Fairchild., p. 503-517, 1999.

SHAW, Jeffrey J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHAW, Jeffrey J. The hemoflagellates of sloths, vermilinguas (anteaters), and armadillos. **The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas (GG Montgomery, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, DC**, p. 279-292, 1985.

SIMPSON, Alastair GB; STEVENS, Jamie R.; LUKEŠ, Julius. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

SIMPSON, George Gaylord. **Splendid isolation: the curious history of South American mammals**. New Haven: Yale University Press, 1980.

Sistema urubu. Disponível em <<https://sistemaurubu.com.br/dados/>> Acessado em 01/11/2022.

SOUZA, Danilo Kluyber de. **Avaliação da prevalência de patógenos zoonóticos de importância para a saúde pública em tatus de vida livre-Mato Grosso do Sul-Brasil**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SPELLERBERG, I. A. N. Ecological effects of roads and traffic: a literature review. **Global Ecology & Biogeography Letters**, v. 7, n. 5, p. 317-333, 1998.

SPODAREVA, Viktoria V. et al. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

STEVENS, J. R. et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 1-53, 2001.

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

SUPERINA, M. Um passeio pela biologia dos tamanduás. In: FLÁVIA MIRANDA F. (Ed) Manutenção de tamanduás em cativeiro. 1a ed. Cubo: São Carlos, São Paulo, p.26-37. 2012

SUPERINA, Mariella; LOUGHRY, W. J. Life on the half-shell: consequences of a carapace in the evolution of armadillos (Xenarthra: Cingulata). **Journal of Mammalian evolution**, v. 19, n. 3, p. 217-224, 2012.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TORRES, Alexandre Augusto Arenales et al. Estudo observacional de afecções da superordem Xenarthra de vida livre e cativeiro no Brasil, Dissertação (Mestrado em ciências animal) - Universidade Federal de Minas Gerais. 2019.

TROMBULAK, Stephen C.; FRISSELL, Christopher A. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. **Conservation biology**, v. 14, n. 1, p. 18-30, 2000.

VAN DER ZANDE, A. N.; TER KEURS, W. J.; VAN DER WEIJDEN, W. J. The impact of roads on the densities of four bird species in an open field habitat—evidence of a long-distance effect. **Biological conservation**, v. 18, n. 4, p. 299-321, 1980.

VAN DIJK, Marjon AM et al. The virtues of gaps: Xenarthran (Edentate) monophyly supported by a unique deletion in α A-crystallin. **Systematic biology**, v. 48, n. 1, p. 94-106, 1999.

VICKERMAN, K. W. H. R. The diversity of the kinetoplastid flagellates. **Biology of the Kinetoplastida**, p. 1-34, 1976.

VICKERMAN, Keith. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International journal for parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317-1331, 1994.

VIOLA, Laerte B. et al. 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**, v. 135, n. 5, p. 595-605, 2008.

VIZCAÍNO, Sergio F.; LOUGHRY, William James. **Biology of the Xenarthra**. University Press of Florida, 2008.

VOTÝPKA, Jan et al. Kentomonas gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. **Protist**, v. 165, n. 6, p. 825-838, 2014.

VOTÝPKA, Jan et al. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by Culex mosquitoes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt_3, p. 745-754, 2012.

WORBESEN, G.A. Introduction. In: WORBESEN, G.A. Essentials of wild animals diseases, 1a ed. Ames, Iowa:Wiley-Blackwell, p.3-10, 2005.

World Health Organization, Control of Leishmaniasis, **World Health Organization** 2006. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_4-en.pdf>. Acesso em: 05/03/2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization**, 2012.

YAMEY, Gavin. The world's most neglected diseases. **Bmj**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

YEO, Matthew et al. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225-233, 2005.

ZAVALA, Elena I. et al. Impact of DNA degradation on massively parallel sequencing-based autosomal STR, iiSNP, and mitochondrial DNA typing systems. **International Journal of Legal Medicine**, v. 133, n. 5, p. 1369-1380, 2019.

ZIMBRES, Bárbara de Queiroz Carvalho. **Efeito da fragmentação sobre a comunidade de tatus e tamanduás (Mammalia: Xenarthra) no cerrado brasileiro: uma abordagem da ecologia de paisagens**. 2010. vii, 119 f., il. Dissertação (Mestrado em Ecologia) -Universidade de Brasília, Brasília, 2010.