

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**Medicina Veterinária e Bem estar animal**

**Bruno Bernal Szpeiter**

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E FILOGENIA DE PARASITAS DO  
GÊNERO *TRYPANOSOMA* EM VERTEBRADOS SILVESTRES DA  
RESERVA EXTRATIVISTA TAPAJÓS ARAPIUNS NO ESTADO DO  
PARÁ.**

**São Paulo**

**2016**

**Bruno Bernal Szpeiter**

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E FILOGENIA DE PARASITAS DO  
GÊNERO *TRYPANOSOMA* EM VERTEBRADOS SILVESTRES DA  
RESERVA EXTRATIVISTA TAPAJÓS ARAPIUNS NO ESTADO DO  
PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2016

**Bruno Bernal Szpeiter**

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E FILOGENIA DE PARASITAS DO  
GÊNERO *TRYPANOSOMA* EM VERTEBRADOS SILVESTRES DA  
RESERVA EXTRATIVISTA TAPAJÓS ARAPIUNS NO ESTADO DO  
PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo, 20 de Agosto de 2016

---

Dr. Jonas Morais Filho

---

Dra. Fernanda Aparecida Nieri Bastos

---

Dr. Arlei Marcili

<b>Conceito Final</b>
-----------------------

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço aos meus amigos que considero como uma família Fernanda Tonolli, Caio Vinicius, Adalberto Campos e Carolina Monteiro por toda ajuda, atenção e parceria principalmente durante o mestrado;

Aos Meus pais pelos vários conselhos e por me apoiarem em minhas escolhas;

Aos colegas na empresa onde trabalho, principalmente a Renata Brito e Cibele de Jesus que me incentivaram e tiveram uma participação de forma direta ou indireta;

Ao Dr. Arlei Marcili que não tenho palavras em agradecer pela orientação, dedicação, paciência, confiança e incentivo durante todo percurso;

A professora Cidéli Coelho por toda ajuda e atenção durante todo o curso;

A Profa. Dra. Solange Maria Gennari e ao Prof. Dr. Antonio Humberto Hammad Minervino pela colaboração no trabalho de campo.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP por propiciar o desenvolvimento deste projeto.

A Universidade Federal do Pará por facilitar o trabalho de campo no município de Santarém

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro

## RESUMO

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias. Os tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, associados com os hospedeiros e seus respectivos ecótopos. A maioria das espécies não patogênicas, *T. cruzi* é a única espécie patogênica para o homem nas Américas. Estudos realizados com algumas espécies de tripanossomas apontam uma grande complexidade do ciclo silvestre em biomas. Ressalta-se o fato que existem poucos trabalhos realizados no estado do Pará em animais silvestres. Até o momento, poucos estudos avaliaram os pequenos mamíferos terrestres e morcegos como reservatórios silvestres destes parasitas neste estado, com ausência de estudos com outros grupos de vertebrados. O presente projeto teve como objetivo principal, o conhecimento da diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em animais silvestres da Reserva Extrativista Tapajós Arapiuns no estado do Pará através do isolamento, caracterização molecular e estudos filogenéticos com marcadores tradicionais utilizados para o grupo. Foram capturados 111 morcegos pertencentes a 11 espécies e 9% estavam positivos para parasitas com morfologia do gênero *Trypanosoma* e todas as culturas positivas foram criopreservadas. A filogenia baseada na região V7V8 SSUrDNA identificaram a presença de *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* nos morcegos da Reserva.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma*. Filogenia. Morcegos.

## ABSTRACT

The species of the genre *Trypanosoma* parasitize vertebrates of all the classes (fishes, amphibians, reptiles, birds and mammals) and cycles of life with alternance between vertebrates and invertebrates. The majority of the species develop on vertebrate hematophagous that can belong to various orders and families. The trypanosomes circle the wild ambient as enzootias, associated with the host and its respective biotope. The majority of species are not pathogenic, *T.cruzi* is the only pathogenic species of the Americas. Studies made with some species of *trypanosoma* point out one big complexity of the circle of wilds. Just out the fact that few fulfilled works evaluate the little terrestrial mammals and bats as wild reservoirs of these parasites in this state, with absence of studies with other vertebrate groups. The present project had as main objective, the knowledge of the diversity of parasites of the *Trypanosoma* genre of wild animals of Extrativista Tapajos Arapius Reserve at the state of Pará through isolation, molecular characterization and filogenetic studies with traditional markers utilized by the group. 111 bats were captured belonging to 11 species and 9% were positive as for parasites with the morphology of the *Trypanosoma* genre and all positive cultures were cryogenized. The phylogeny based in the region V7V8 SSUrDNA identified the presence of *T.cruzi marinkellei* and *T.dionisii* on the bats of Reserva.

**Keywords:** *Trypanosoma*. Phylogeny. Bats.

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Área de estudo.....	16
3.2 Captura e identificação dos animais.....	18
3.3 Isolamento de tripanossomatídeos.....	18
3.4 Preservação dos tripanossomatídeos na coleção de culturas.....	18
3.5 Extração de DNA e reações de amplificação.....	19
3.6 Purificação e sequenciamento.....	19
3.7 Alinhamento das sequências obtidas e inferências filogenéticas.....	19
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	





## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida<sup>1</sup>. Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida) formam o filo Euglenozoa<sup>2</sup>. Os organismos da ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens: a) Bodonina, que compreende parasita e espécie de vida livre; b) Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas.

A família Trypanosomatidae alberga protozoários flagelados do Filo Euglenozoa, classificados tradicionalmente na ordem Kinetoplastida. Esses organismos compreendem espécies de importância médica humana e veterinária e são de interesse ecológico e ambiental, devido a considerável preocupação e cuidado com as espécies em risco de extinção, bem como a importância em conhecer o que tais animais silvestres podem transmitir ao ser humano, torna-se exponencialmente maior o interesse nos impactos que essas doenças causam na vida selvagem; sendo também de suma importância para o controle de "epidemias" e infecções em massa em animais domésticos e de criações em grande escala<sup>3</sup>. Esse grupo de protistas está posicionado nas árvores filogenéticas em um grande clado de flagelados denominado Excavata, que é formado além do filo Euglenozoa, por protozoários que não apresentam mitocôndria (exemplo, *Giardia* e *Trichomonas*) e pelos flagelados denominados "jakobids"<sup>4</sup>.

O filo Euglenozoa é um dos maiores grupos de eucariotos, compreendendo eucariotos unicelulares flagelados com formas e tamanhos diferentes e grande diversidade. Os membros desse filo apresentam múltiplos estilos de vida, incluindo organismos de vida-livre e parasitas de todas as classes de vertebrados, de invertebrados e de plantas. O filo Euglenozoa contém espécies fotossintéticas autotróficas, como *E. gracilis*, espécies heterotróficas de vida livre como *Bodo saltans* e parasitas obrigatórios, como as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*<sup>5-11</sup>.

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. Estes organismos, depois dos nematóides, são os eucariotos que apresentam a maior

variedade de hospedeiros e distribuição geográfica<sup>12-14,11</sup>. Os tripanossomatídeos podem ser parasitas monoxênicos ou heteroxênicos e, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, estão distribuídos em quatorze gêneros. Dez gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Sergeia* e *Blechomonas*); quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas em cujos ciclos ocorre alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmaniae* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados, insetos fitófagos, e um hospedeiro vegetal (*Phytomonas*)<sup>15-18,12</sup>. O gênero *Endotrypanum* apresenta espécies exclusivas de preguiças encontradas no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e América Central. As espécies deste gênero, assim como algumas espécies de *Leishmania*, são transmitidas por flebotomíneos. Preguiça, tamanduá, tatú, roedores e marsupiais são reservatórios de *Leishmania*<sup>19</sup>. Algumas espécies dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* são geneticamente muito relacionadas, gerando controvérsias sobre o posicionamento filogenético destes organismos<sup>20</sup>.

Hipóteses fundamentadas em reconstruções baseadas em filogenia molecular e dados biogeográficos e paleontológicos tentam explicar a origem do parasitismo dos tripanossomatídeos e dos ciclos heteroxênico dos tripanossomas e leishmanias. Os estudos filogenéticos indicam diferentes histórias evolutivas para os cinetoplastídeos, dependendo do número de amostras, dos grupos externos utilizados, dos genes e seqüências 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<sup>13,21,14,22,23</sup>.

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (mamíferos, peixes, anfíbios, répteis e aves) com ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos. *T. evansi* e *T. vivax* são transmitidos apenas mecanicamente nas Américas. As espécies desse gênero

apresentam vários estágios, presentes em diferentes combinações, no sangue e/ou tecidos, nos hospedeiros vertebrados e invertebrados<sup>16, 13, 14, 11</sup>.

Centenas de espécies de tripanossomas já foram descritas em mamíferos de praticamente todas as ordens, em todos os continentes. Porém, apenas *T. brucei* ssp., na África, e *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas, infectam o homem. Os tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, transmitidos por hematófagos associados com os hospedeiros e seus respectivos ecótopos. A maioria das espécies não é patogênica, *T. cruzi* e *T. brucei* são as únicas espécies patogênicas para o homem<sup>16,14,22,23</sup>. As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitas de mamíferos foram separadas em Seções Salivaria e Stercoraria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor. A Seção Stercoraria compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*)<sup>16</sup>. Apenas *Schizotrypanum* se mostrou um grupo monofilético, embora ainda com controvérsias. Os subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* se revelaram polifiléticos, confirmando que os parâmetros taxonômicos tradicionais não são suficientes para classificar os tripanossomas em subgêneros<sup>14, 24, 25,26</sup>.

Além de *T. cruzi*, que infecta o homem, mamíferos silvestres e domésticos, apenas algumas espécies de tripanossomas de morcegos são classificadas no subgênero *Schizotrypanum*. As espécies deste subgênero são morfologicamente indistinguíveis. Porém, enquanto *T. cruzi* parasita uma grande variedade de mamíferos, inclusive morcegos, as demais espécies desse subgênero são exclusivas de morcegos e possuem uma ampla distribuição em todo o mundo<sup>16</sup>. Morcegos têm sido encontrados infectados na África, Europa, Ásia e Américas, com diversas descrições no Brasil, por tripanossomas dos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*<sup>27</sup>.

A Doença de Chagas é causada por *T. cruzi*, comum em animais silvestres (mais de 110 espécies de várias ordens descritas infectadas). No ciclo silvestre, a transmissão é mantida por triatomíneos que habitam palmeiras, fendas em árvores e rochas, e abrigos de animais. Há três ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi*: a) exclusivamente silvestre (raramente envolve o homem); b) doméstico, envolve o homem, animais domésticos e silvestres do peridomicílio e triatomíneos domicilados; c)

peridoméstico, com a sobreposição dos ciclos silvestre e domiciliar. Pessoas infectadas são encontradas do México até região central da Argentina e Chile. Como enzootia, a tripanossomíase americana é mais amplamente distribuída do que a infecção humana, estendendo-se do Sul dos USA até o Sul da Argentina e do Chile<sup>28</sup>.

*Trypanosoma cruzi* compreende populações altamente heterogêneas que diferem em características biológicas, patológicas (virulência, mortalidade, tropismo celular, etc), clínicas (formas cardíaca e/ou digestiva, megassíndromes), bioquímicas e moleculares<sup>28,29</sup>. Apesar do polimorfismo intraespecífico, os isolados de *T. cruzi* foram agrupados em duas linhagens principais. As análises de isoenzimas evidenciaram grupos que foram denominados Z1, Z2 e Z3<sup>30</sup>. Estes grupos foram redefinidos com marcadores dos genes ribossômicos e de mini-exon, que indicaram duas linhagens principais: *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TCII), que correspondem aos zimodemas Z1 e Z2<sup>31,32</sup>. O grupo Z3 também foi definido com marcadores do gene de mini-exon e subdividido nos subgrupos A e B baseado em polimorfismo de ITSrDNA<sup>33,34,35,36</sup>. Estudos com um maior número de isolados e de marcadores moleculares, corroborados por inferências filogenéticas, agruparam Z3 com TCII e revelaram uma grande heterogeneidade dessa linhagem, que foi subdividida em 5 sublinhagens: TCI; Ib, TCII d e TCII e (ambiente antroponótico); TCII a, TCII c (ambiente silvestre)<sup>37,38,39,40</sup>. A linhagem TCI, que circula nos ambientes silvestre e doméstico com ampla distribuição geográfica, não foi, até o momento, subdividida em sublinhagens devido a pequena heterogeneidade de seus isolados<sup>28</sup>.

Os estudos realizados apontam para uma grande complexidade do ciclo silvestre de *T. cruzi*<sup>41-47</sup>. O estudo de um grande número de isolados de diversas espécies de mamíferos e vetores e de 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. Diferentes hipóteses baseadas em inferências filogenéticas (SSUrRNA) foram formuladas a fim de explicar a evolução intraespecífica de *T. cruzi*<sup>48,39,40,49,50-52</sup>. Baseado nos ecótopos e na evolução dos triatomíneos e na associação destes com determinados mamíferos, foi proposta a seguinte história evolutiva para as linhagens de *T. cruzi*: TCI está associado com marsupiais (gênero *Didelphis*) e triatomíneos (gênero

*Rhodnius*) de ecótopos arbóreos, enquanto as linhagens TCII e Z3 estão associadas com triatomíneos dos gêneros *Triatoma* (domiciliado) e *Panstrongylus* (habita buracos e fendas de rochas) e vertebrados de hábitos terrestres (tatús e marsupiais *Monodelphis*)<sup>53,50</sup>.

O subgênero *Herpetosoma* compreende tripanossomas que não são patogênicos para seus hospedeiros mamíferos. As espécies deste taxon constituem dois grupos principais: grupo constituído por *T. lewisi*, parasita de rato e mais de 80 espécies de animais silvestres; grupo relacionado com *T. rangeli*, constituído por isolados humanos, de triatomíneos e de animais silvestres<sup>16</sup>. *T. rangeli* compartilha com *T. cruzi* a capacidade de infectar mamíferos de praticamente todas as ordens, parasitando primatas, inclusive o homem, roedores, morcegos, marsupiais e dentados.

Esse tripanossoma só é encontrado nas Américas Central e do Sul<sup>54</sup>. No Brasil, *T. rangeli* foi descrito em diferentes mamíferos e triatomíneos, principalmente na Amazônia onde foram descritos os únicos casos humanos nesse país<sup>55,24,25</sup>. Análises filogenéticas baseadas em seqüências de SSUrDNA indicaram que *T. rangeli* é mais relacionado com *T. cruzi* do que com os tripanossomas africanos, apesar de ser transmitido de forma inoculativa como os membros do grupo Salivaria<sup>56,14,48,24,25</sup>. Os isolados de *T. rangeli* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas podem ser divididos em pelo menos 4 linhagens<sup>24</sup>. Análises filogenéticas baseadas no gene ribossômico (SSU e ITS) confirmaram o polimorfismo dessa espécie<sup>57</sup> e corroboraram 4 grupos filogenéticos<sup>25</sup>.

O subgênero *Megatrypanum* se caracteriza pela grande diversidade de espécies de tripanossomas e de seus hospedeiros mamíferos e invertebrados. Os tripanossomas deste subgênero infectam animais domésticos e silvestres, abrangendo praticamente todas as ordens de mamíferos, incluindo diversas espécies de animais silvestres das ordens Artiodactyla, Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Edentata e Primata. Os animais domésticos mais freqüentemente infectados por *Megatrypanum* pertencem à família Bovidae (bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, etc). A espécie-tipo desse taxon é *T. theileri*, encontrada em bovídeos e cervídeos no mundo todo (*T. theileri*-like). Isolados de cabra, ovelha e cervos têm sido classificados como diferentes espécies de acordo com o hospedeiro<sup>16</sup>. Isolamos e caracterizamos diversos isolados de bois e búfalos e

definimos marcadores para esses isolados<sup>58</sup>. Embora um número reduzido de isolados tenha sido analisado, estudos filogenéticos baseados no gene ribossômico indicam que este subgênero é polifilético<sup>14,22,23,26</sup>.

A maioria das descrições das espécies de tripanossomas de morcegos é baseada em caracteres morfológicos e origem do hospedeiro e não foram incluídos em estudos evolutivos. Estudos filogenéticos em tripanossomas de morcegos são escassos e apenas *T. dionisi*, *T. vespertilionis*, *Trypanosoma* sp. bat (isolado na África) e *T. cruzi marinkellei* foram incluídos em árvores genéticas<sup>14,56,23</sup>. Recentemente, *T. erneyii* e *T. livingstonei*, espécies identificadas em morcegos africanos, foram descritas e posicionadas em árvores filogenéticas e *T. wauwau* em *Pteronotus parnellii* em algumas regiões amazônicas principalmente o estado de Rondônia<sup>59,60,61</sup>.

No Brasil, estudos realizados identificaram *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* em diferentes biomas<sup>45,62-64</sup>. Populações de *Trypanosoma cruzi* estão divididas em seis grupos (TCl para TCVI) e Tcbat<sup>45,65</sup>, e apenas TCl e Tcbat são encontrados em morcegos. O grupo TCl está restrito aos morcegos amazônicos e Tcbat em hospedeiros de Pantanal e Mata Atlântica<sup>62,45</sup>. *Trypanosoma dionisii* foi detectado em Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Molossidae de morcegos em todos os biomas analisados entre o norte e o sul do Brasil, enquanto *T. cruzi marinkellei* foi encontrado em espécies das famílias Phyllostomidae e Vespertilionidae no nordeste, sudeste, e Brasil central, e *T. cruzi* em quatro famílias (Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Thyropteridae) de morcegos na Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica<sup>45,63</sup>. No subgênero *Herpetosoma*, uma nova linhagem *T. rangeli* (Lineage E) tem sido descrita em morcegos do Pantanal<sup>66</sup>.

No norte do Brasil foram realizados diversos estudos para o conhecimento dos reservatórios silvestres de parasitas do gênero *Trypanosoma*. Estudos realizados visando o isolamento e posicionamento filogenético de *T. cruzi* evidenciaram a existência de três linhagens (Tcl, TcIII e TVI) e outras espécies de tripanossomas<sup>45,46,47,62,67</sup>.

Existem poucos de estudos com vertebrados silvestres nesta região do Pará. Os estudos realizados na região do Rio Tapajós tiveram como objetivo o estudo da biologia dos vetores da Doença de Chagas (triatomíneos do gênero *Rhodnius*)<sup>68</sup>, mas não foram

realizados estudos para a detecção, isolamento e estudos moleculares e filogenéticos dos parasitas que estes vetores podem albergar<sup>69</sup>. Assim, são escassos os trabalhos realizados que visavam o isolamento, caracterização molecular e posicionamento filogenético das espécies isoladas. Além disso, o município de Santarém no estado do Pará está localizado em uma região pouco estudada em relação aos parasitas objetivados neste projeto, bem como seus reservatórios e vetores.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente projeto teve como objetivo principal o conhecimento da diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em animais silvestres da Reserva Extrativista Tapajós Arapiuns no estado do Pará.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Isolamento de parasitas do gênero *Trypanosoma* de animais silvestres capturados na Reserva Extrativista Tapajós Arapiuns no estado do Pará;
2. Caracterização molecular e morfológica dos isolados obtidos e de amostras diretas colhidas dos animais silvestres capturados na Reserva Extrativista Tapajós Arapiuns no estado do Pará;
3. Posicionamento filogenético baseado em sequencias do barcode para tripanossomatídeos (região V7V8 - SSUrDNA).

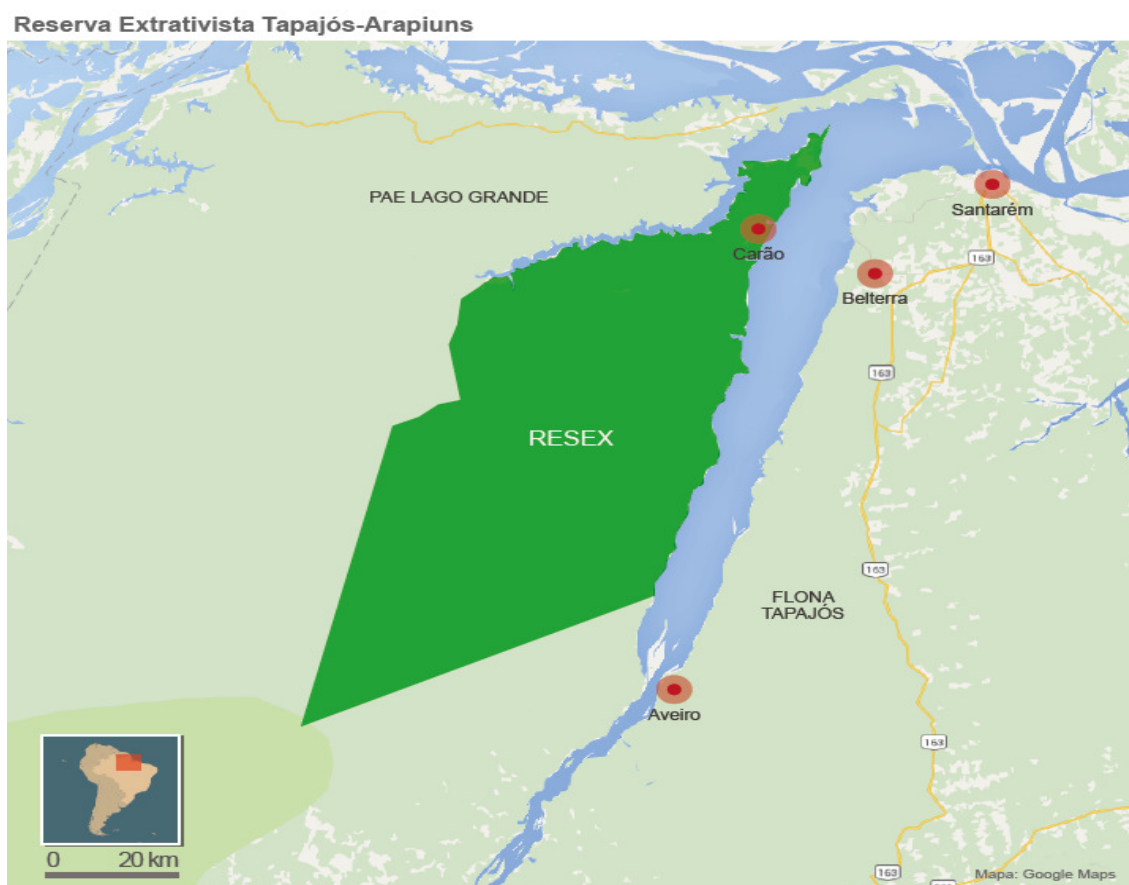


### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

A Reserva Extrativista (Resex) Tapajós Arapiuns fica as margens do Rio Tapajós na região de Alter do Chão foi criada no ano de 1998 e possui uma área de 647610ha localizada nas coordenadas de 02º 20' a 03º 40' Sul, e 55º 00' a 56º 00' Oeste. A Resex é composta de floresta Ombrófila Densa (Bioma Amazônico).

**Figura 1. Mapa da Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns vista de cima gerado pelo programa Google Maps.**



Fonte:(Google maps).

A região possui um clima tropical úmido com temperaturas que variam entre 26 – 27 °C durante o ano, sendo que a umidade relativa do ar se mantém em torno de 86% junto com uma precipitação anual de 1.287 entre 2.538 mm. Sua estação chuvosa se

estende de dezembro a julho e a estação seca se encontra entre agosto a novembro podendo ser prolongado o que acarreta em uma vegetação vulnerável a incêndios florestais. Possui poucos trabalhos sobre o estudo de fauna da região do lado esquerdo do rio Tapajós, porém estudos indicam que possui uma grande biodiversidade. Sendo que várias espécies são utilizadas como meios de subsistência pelas comunidades existentes<sup>70</sup>.

**Figura 2 - Foto do Rio Arapiuns que atravessa a Reserva extrativista do Tapajos.**



Fonte:(Fotos Arlei Marcili).

**Figura 3-Foto das margens da Reserva Extrativista (Resex) vista de dentro do barco.**



Fonte:(Fotos Arlei Marcili).

### **3.2 Captura e identificação dos animais**

Para a captura dos animais silvestres foram utilizados diferentes métodos de acordo com as espécies pretendidas. Para a captura de morcegos foram utilizadas redes de neblina (“mist nest”) com 3,0 X 6,0 m de comprimento, que foram armadas no início do entardecer e mantidas abertas por um período de 5 a 6 horas. Para algumas espécies de morcegos foram realizadas buscas ativas em abrigos e os animais capturados foram transportados em sacos de pano. Os animais foram identificados com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais. Alguns exemplares de animais cuja identificação da espécie não foi possível no campo de coleta foram sacrificados, fixados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Vertebrados e vetores foram identificados por especialistas de cada grupo. Os animais silvestres capturados foram anestesiados para a coleta de sangue que foi realizada por punção cardíaca, pela veia caudal ou pela veia cefálica, além de alíquotas de sangue e de tecidos foram coletadas para estudos moleculares. Foi realizada uma campanha de campo de um mês no primeiro ano do projeto e cada coleta teve a duração de 10 dias. Este estudo foi aprovado pela Instituto Chico Mendes/IBAMA (Licença número 47093-3) e pela comissão de ética da Universidade de Santo Amaro.

### **3.3 Isolamento de tripanossomatídeos**

As espécies de tripanossomatídeos foram isolados de amostras de sangue coletadas por punção cardíaca, que foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (contendo soro fetal bovino e antibióticos). Lâminas de vidro com esfregaços de sangue para estudos morfológicos e ainda amostras de sangue em etanol foram preparados para estudos moleculares quando o isolamento não for possível.

### **3.4 Preservação dos tripanossomatídeos na coleção de culturas**

As espécies de tripanossomatídeos foram mantidas criopreservadas coleção Brasileira de Tripanossomatídeos do Departamento de Medicina Veterinária

Preventiva e Saúde Animal FMVZ-USP. Os isolados foram mantidos congelados em N<sub>2</sub> líquido e cultivados a 25-28°C.

### **3.5 Extração de DNA e Reações de amplificação**

Foi utilizado o método clássico de fenol-clorofórmio para extração de DNA e diversos métodos de extração e purificação de DNA diretamente de sangue. Os oligonucleotídeos e condições das reações que foram utilizadas para a amplificação da SSU rDNA estão descritos em trabalhos anteriores<sup>24,67,26,45,46,47,22,23</sup>.

### **3.6 Purificação e sequenciamento**

Fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Gel-Red (Biotium). Os fragmentos foram cortados dos géis e os DNAs purificados através do Kit Exosap-Iit. Fragmentos de DNA amplificados por PCR e purificados foram submetidos a reações de seqüenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante. As reações foram submetidas a 30 ciclos: 15 s 96°C; 15 s 50°C; 4 min 60°C, com um ciclo inicial de 1 min 96°C.

### **3.7 Alinhamento das seqüências obtidas e inferências filogenéticas**

As seqüências obtidas, por PCR, dos diferentes genes utilizados como alvo foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelos programas programa Clustal X<sup>71</sup> alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01<sup>72</sup>. As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos análise bayeseana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP\* v. 4.0b10<sup>73</sup> 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<sup>74</sup>. Foram empregadas 1000.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e 4

categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 150 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com o programa MrBayes. 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>.

#### 4 RESULTADOS

Foram capturados 111 indivíduos da Ordem Chiroptera pertencentes a três famílias (Phyllostomidae, Molossidae e Emballonuridae); 11 gêneros e 12 espécies.

**Tabela 1 - Espécies e número de espécimes amostrados e positividade para *Trypanosoma*.**

Ordem Chiroptera	Hospedeiros		No. de indivíduos	
	Gênero	Espécie	Examinados/Positivos HE	Total <sup>a</sup>
	<i>Artibeus</i>	<i>obscurus</i>	1/0	0
	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	53/8	8
	<i>Glossophaga</i>	<i>Soricina</i>	2/1	1
	<i>Lichonycteris</i>	<i>Degener</i>	1/0	0
	<i>Mimon</i>	<i>crenulatum</i>	1/1	1
	<i>Molossus</i>	<i>Ater</i>	1/0	0
		<i>molossus</i>	40/0	0
	<i>Platyrrhinus</i>	<i>Lineatus</i>	1/0	0
	<i>Rhynchonycteris</i>	<i>Naso</i>	1/0	0
	<i>Saccopteryx</i>	<i>gymnura</i>	1/0	0
	<i>Sturnira</i>	<i>Lilium</i>	4/0	0
	<i>Vampyressa</i>	<i>Pusilla</i>	7/0	0
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>111/10 (9%)</b>	<b>10</b>

<sup>a</sup> Total de isolados estabelecidos e criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT)

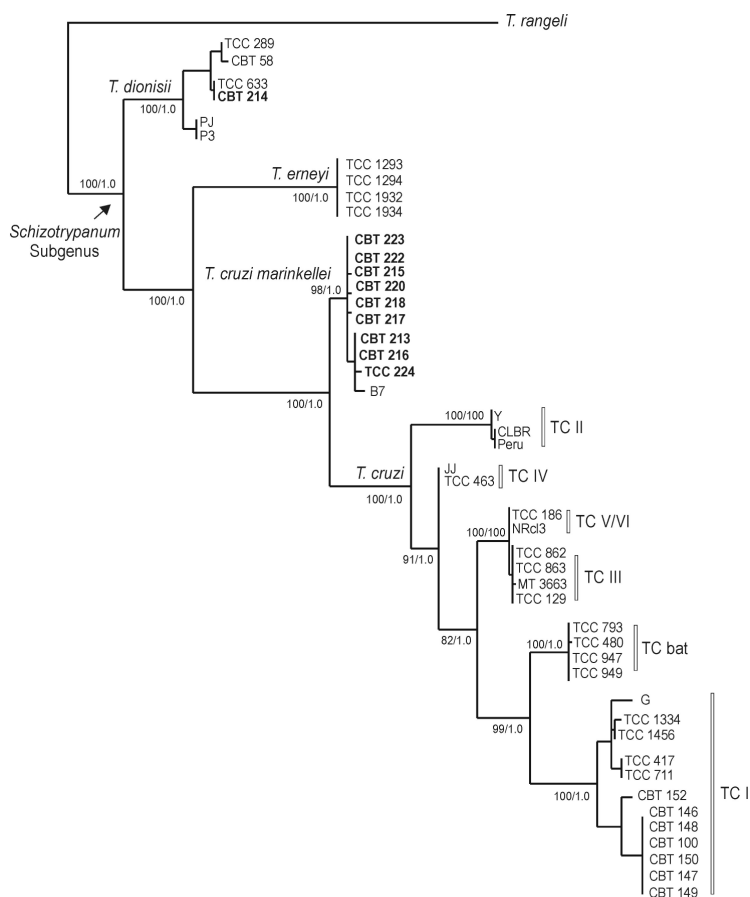
Apesar do esforço e tentativas não foi possível a captura de pequenos mamíferos terrestres no período da campanha, sendo capturados somente morcegos.

A prevalência de tripanossomas presentes nos morcegos, avaliada através de hemocultura, foi de 9% (N = 10). Foram obtidas dez hemoculturas positivas, pertencentes a famílias dos morcegos Phyllostomidae. Todas as amostras positivas foram isoladas e criopreservadas, 100% de sucesso, na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos.

Todas as hemoculturas positivas apresentam formas tripomastigotas de cultura e epimastigotas com morfologia compatível com o gênero *Trypanosoma*. Além disso, a morfologia e comportamento dos parasitas em monocamadas de células Vero sugerem que os isolados pertencem ao subgênero *Schizotrypanum*.

Relações filogenéticas com base na V7V8 SSUrDNA (região barcode) foram inferidas por meio de máxima parcimônia e análise bayesiana e topologias congruentes foram geradas para tripanossomas *Schizotrypanum* (Figura 1). 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: nove isolados (CBT 213, CBT 215, CBT 216, CBT 217, CBT 218, CBT 220, CBT 222, CBT 223 e CBT 224) foram agrupados com a cepa de referência (B7) de *T. cruzi marinkellei* (98% de bootstrap e 1,0% de probabilidade Bayesiana a posteriori) (Figura 1); um isolado (CBT 214) foi identificado no ramo de *T. dionisii*.

**Figura 4 -** Árvore filogenética implementada pelos métodos de Máxima Parcimônia e Bayesiana e baseada na região V7V8 SSUrDNA de parasitas do gênero *Trypanosoma*. *Trypanosoma rangeli* foi utilizado como outgroup. Os valores nos nós equivalem ao bootstrap e probabilidade a posteriori (MP/B), respectivamente.



## 5 DISCUSSÃO

A região da Amazônia se divide em nove estados que englobam Tocantins, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão, Amazonas, Amapá, Acre e o foco do estudo o Pará. A floresta Amazônica pode ser dividida entre três grupos de vegetação: mata de várzeas que são periodicamente inundadas; matas de igapó que são permanentemente inundadas e por fim as terras secas que representam as regiões de cerrado<sup>75,76</sup>.

A Resex Tapajós-Arapiuns mantém uma grande quantidade de recursos naturais que são utilizados como fonte de subsistência de inúmeras famílias desde a alimentação (caça) até a confecção de artesanato<sup>77</sup>. A exploração da área sem controle poderá causar a expulsão/migração ou extinção local de muitas espécies silvestres, diminuindo a diversidade e densidade de diversas espécies<sup>78</sup>. A diminuição de fontes naturais de alimentação dos triatomíneos pode favorecer a migração destes vetores para novas áreas, que incluem áreas de peridomicílio e domicílio, em busca de novas fontes de alimentação<sup>79</sup>. Além disso, a densidade de animais domésticos, silvestres e a população humana em áreas endêmicas desenvolvem um potencial trófico para a manutenção de populações de triatomíneos<sup>80,81</sup>.

A transmissão vetorial é, historicamente, a principal forma de transmissão da doença. Há casos registrados com 80% de chances que tenham acarretado por esta via de transmissão. Outros fatores, como características biológicas dos vetores, condições precárias de residências e alterações no ambiente estão diretamente ligadas a este fato<sup>82,83</sup>. Além disso, no estado do Pará são registrados diversos surtos de infecção oral por *T. cruzi* associados ao consumo de açai<sup>84</sup>.

Entre as espécies de animais silvestres que servem de reservatórios para o parasita, os quirópteros possuem grande importância, por sua grande capacidade de adaptação ao ambiente modificado e áreas domiciliares se tornando assim um ótimo vetor dentro do ambiente doméstico<sup>85</sup>. As espécies *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* são comumente em morcegos na região amazônica, porém recentemente uma nova espécie denominada *T. wauwau* foi descrita em *Pteronotus parnelli*<sup>86</sup>.



Entretanto, estado do Pará registra a maior diversidade de espécies de quirópteros, mas os estudos sobre a diversidade tripanosomas em morcegos são escassos<sup>86,23</sup>.

A prevalência de morcegos na área da Resex foi de 9%, valor comparável a outros estudos conduzidos no bioma Amazônico<sup>62,63</sup>. Entretanto o sucesso de isolamento foi de 100%, valor bem maior do que os registrados em estudos que visam o isolamento de tripanossomas de morcegos.

O resultado do estudo realizado sobre esses parasitas pode se tornar uma grande ferramenta para a avaliação da biodiversidade de uma região, podendo mostrar uma variada gama de informações como a biologia de seu hospedeiro e da relação de parasita-hospedeiro-ambiente<sup>87,88</sup>.

Os morcegos neotropicais são excelentes indicadores da qualidade dos diferentes ecossistemas<sup>89,90</sup>. No Panamá, a fragmentação do habitat tem aumentado a prevalência de *Trypanosoma* em *Artibeus jamaicensis*, quando comparado os morcegos capturados em fragmentos e áreas de floresta contínua<sup>91</sup>.

Os parasitas respondem a mudanças ambientais geralmente mais rápido que seus hospedeiros, se tornando ótimo meio de avaliar os níveis de estresse ambiental e criando um regulador de densidade para a população do seu hospedeiro gerando um grande impacto sobre o ambiente e comunidades onde vivem esses animais<sup>92</sup>.

Variações no aumento ou diminuição da quantidade de parasitismo pode ser um indicador para ações humanas tanto positivas como negativas dentro do ambiente que podem influenciar positivamente ou negativamente o desenvolvimento do parasita<sup>93</sup>. Além de serem indicativos para o estudo biológico de seus hospedeiros podendo informar aspectos de comportamento alimentar a filogenia<sup>87</sup>.

Estudos que visam o isolamento e a caracterização molecular de tripanossomas de morcegos em áreas nunca estudadas são de extrema importância para o conhecimento da diversidade destes parasitas em morcegos, bem como a identificação de espécies patogênicas e gerar subsídios para medidas de controle. Além disso, estudos devem ser conduzidos e corroborar o papel destes parasitas como bioindicadores de degradação ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool* 10: 20-63, 1963.
2. Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 1993; 57(4):953-94.
3. Simpson, V.R. Veterinary advances in the investigations of wildlife diseases in Britain. *Res. Vet. Sci.*, v.69, p.11-16, 2000.
4. Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life. *Proceedings: Biological Sciences*, 271:1251-1262.
5. Dolezel D, Jirku M, Maslov DA, Lukes J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50:1943–51.
6. Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51:751–8.
7. Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol.* 2002; 55:757–67.
8. Busse I, Preisfeld A. Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *Org Divers Evol.* 2003; 3:1–12.

9. Von der Heyden S, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomemid flagellates and the evolution of euglenozoa. *J Eukaryot Microbiol.* 2004; 51(4):402-16.
10. Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol.* 2004; 30:201–12.
11. Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):168-74.
12. 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.
13. Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994; 24(8):1317-31.
14. Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasit.* 2001; 48:1-56.
15. Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966; 18:124-93.
16. Hoare CA. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
17. Camargo EP. *Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit.* *Adv Parasit.* 1998; 42:29-112.
18. Votyckyka, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, Yurchenko V. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea, Trypanosomatidae) parasitizing fleas

(insecta ,Siphonaptera)and description of new genus Blechomonas gen.n.Protist, V.164,n,6,p.763-81.2013.

19. Lainson R, Shaw JJ, Naiff RD. Chagas' disease in the Amazon basin: speculations on transmission per os. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1980; 22(6):294-7.
20. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. 2000. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. Parasitol Today. 16(4):142-4.
21. Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. Parasitol Today. 1995; 11(1): 1995. M.G. Buck, G.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M., 2015. Genetic diversity of Trypanosoma cruzi in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 151, 166–177.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. 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.
27. Molineux, I.J. Host-parasite Interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol.* 3:230-236, 1991.
28. 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.
29. Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 2003; 5(5):419-27.
30. Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978; 272(5656): 819-21.
31. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
32. 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.

33. 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.
34. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraeve 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.

39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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. 2009a. *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.* 39(5):615-23.
46. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM. 2009b. 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.* 136(6):641-55.
47. 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. 2009c. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 9(6):1265-74.
48. 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.
49. 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.
50. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillo's hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):225-33.
51. Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A. and Sturm, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 2005; 171:527-543.



52. 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.
53. Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(4):557-65.
54. Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - An updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:435-42.
55. 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.
56. Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology.* 1999; 118:107-16.
57. Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Miniexon-gen sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 1999; 118: 375-382.
58. Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, Teixeira 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.
59. Lima L, Silva FM, Neves L., Attias M, Takata CS, Campaner M, de Souza, Hamilton PB, Teixeira MMG. Evolution insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma*

(*Shizotrypanum*) *erneyi* sp.nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and Allied Species. *Prostit.* 2012.

60. Lima L., Espinosa-Álvarez O., Hamilton P.B., Neves L., Takata C.S., Campaner M., Attias M., de Souza W., Camargo E.P., Teixeira M.M. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasite Vectors.*; 6:1–17, 2013.
61. Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M., 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting *Tc*bat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 151, 166–177.
62. Cavazzana M., Jr., A. Marcili, L. Lima, F. M. da Silva, A. C. Junqueira, H. H. Veludo, L. B. Viola, M. Campaner, V. L. Nunes, F. Paiva et al. 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (*ssrRNA* and *gGAPDH*) and mitochondrial (*cyt b*) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology* 40.
63. Marcili, A., da Costa, A.P., Soares, H.S., Acosta Ida, C., de Lima, J.T., Minervino, A.H., Melo, A.T., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., Gennari, S.M., 2013. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. *J. Parasitol.* 99, 1071–1076.
64. Costa J, Correia NC, Neiva VL, Goncalves TCM, Felix M (2013) Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 785–789.

65. Zingales B, Andrade, S.G, Briones, M.R. Cambell, D.A, Chiari, E, Fernandes, O et al, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 1051-1054.
66. Maia da Silva, F., Marcili, A., Lima, L., Cavazzana Jr., M., Ortiz, P.A., Campaner, M., Takeda, G.F., Paiva, F., Nunes, V.L.B., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. Acta Trop. 109, 199–207.
67. Maia da Silva F, F., Junqueira A.C., Campaner, M., Rodrigues, A.C., Crisante, G., Ramirez, L.E., Caballero, Z.C., Monteiro, F.A., Coura, J.R., Añez, N. and Teixeira, M.M.G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol. 2007; 16, 3361-73.
68. Dias FB, Quartier M, Diotaiuti L et al. Ecology of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in *Attalea* palm trees of the Tapajós River Region (Pará State, Brazilian Amazon). Parasites and Vectors, 7, 154, 2014.
69. Pinto AS, Bento DNC. The palm tree *Copernicia cerifera* (Carnaúba) as an ecotope of *Rhodnius nasutus* in rural areas of the state of Piauí, Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1986, 19: 243-245.
70. Oliveira, A.C.M., Carvalho JR, O. Chaves, R. Gestão participativa e a atividade de caça na Reserva Extrativista do Tapajós-Arapiuns, Santarém, PA. Raízes 23 (1-2); 2005, 42-51.

71. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* v25; 4876-4882, 1997.
72. Nicholas, KB, Nicholas HB Jr., e Deerfield, DW II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS*, 1997, 4:14.
73. Swofford JR. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sunderland: Sinauer Associates; 1998.
74. Ronquist F, Huelsenbeck JP. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19. 1572-1574, 2003.
75. Rebelo, J.M., Barros, V.L.L., Mendes, W.A. Espécies de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Maranhão. *Bras. Cad. Saúde Públ. (Rio de Jan.)* 14, 187–192, 1998.
76. Ziccardi, M., Lourenc, o-Oliveira, R., Lainson, R., Brígido, C.O.M., Muniz, J.A.P.C., 2000. Trypanosomes of non-human primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 157–159.
77. Mello, N. A. DE. Políticas Territoriais na Amazônia. São Paulo: Annablume, 2006.
78. Mueller, C. C. Os Economistas e as Relações Entre o Sistema Econômico e o Meio Ambiente. Brasília: UNB, 2007.
79. Gurgel-Goncalves, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med*, v. 2012, p. 705326, 2012. ISSN 1687-9694. [Acesso em 30 de julho de 2016]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523500>.

80. Luitgards-Moura, J.F., Vargas, A.B., Almeida, C.E., Magno-Esperança, G., Agapito-Souza, R., Folly-Ramos, E., Costa, J., Tsouris, P., Rosa-Freitas, M.G., 2005. A *Triatoma maculata* (Hemiptera Reduviidae) population from Roraima, Amazon Region, Brazil, has some bionomic characteristics of potential Chagas disease vector. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 47, 131–137.
81. Souza-Lima, R.C., Barbosa, M.G.V., Coura, J.R., Arcanjo, A.R.L., Nascimento, A.S., Ferreira, J.M.B.B., Magalhães, L.K., Albuquerque, B.V., Araujo, G.A.N., Guerra, J.A.O., 2013. Outbreak of acute Chagas disease in the Rio Negro Region, Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 510–514.
82. Aras, R.; Gomes, I.; Veiga, M.; Melo, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.3, p.359-363, 2003.
83. Brasil, Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e parasitárias. Guia de bolso. 8th Ed. Brasília: Secretaria de vigilância em saúde. 2010.
84. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Jungueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:47-56.
85. Thomas, M.E; Rasweiler, I.J.J.; D'alessandro, A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v102, p.559-565, 2007.
86. Bernard E; Tavares, V.C.; Sampaio, E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica*, 2011. [Acesso em 30 julho 2016] Disponível: [<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/abstract?article+bn00611012011>]. Acesso em :30 julho, 2016.

87. Galli, P.; Crosa, G.; Mariniello, L.; Ortis, M.; D'amelio, S. Water quality as a determinant of the composition of fish parasites communities. *Hydrobiologia*, v. 452, p.173-179, 2001.
88. Madi, R. R.; M. T. Ueta. Parasitas de peixes como indicadores ambientais. In: Silvasouza, A.T.; M. A. P.; Lizama, M.A.P.; Takemoto, R.M. (Eds.). *Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*. Maringá: Massoni, 2012. p. 33-58.
89. Medellín, R. A; Esquihua, M.; Amin, M.A. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in Neotropical Rainforests. *Conservation Biology*, v14, n.6, p.1666-1675, 2000.
90. Willig, M.; Presley, YS.; Bloch, C.; Hice, C.; Yanoviak, S.; Días, M.; Chauca, L; Pacheco, V.; Weaver, S. Phyllostomid bats of lowland Amazonia: effects of habitat alteration on abundance. *Biotropica*, v.39, n.6, p.737-746, 2007.
91. Cottontail, V.M.; Wellinghausen; KALKO, E.K.V. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panama. *Parasitology*, v.136, p.1133-1145, 2009.
92. Silva-Souza, A. T.; Shibatta, O. A.; Matsumura-Tundisi, T.; Tundisi, J.G. Dupas, F.A. Parasitas de peixes como indicadores de estresse ambiental e Eutrofização. In: TUNDISI; J.G.; MATSUMURA-TUNDISI; T.; GALLI, P. (Org.). *Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias para gerenciamento e controle*. São Carlos: Instituto Internacional de Ecologia, 1 ed., 2006. p. 373-386.
93. Lafferty, K.D.; Kuris, A.M. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnological Oceanographic*, v. 44, n.3, 925–931, 1999.