



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Lívia Maísa Guiraldi

**PESQUISA DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM PRIMATAS DE
CATIVEIRO DO PARQUE ZOLÓGICO MUNICIPAL DE
BAURU, SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

**Botucatu
2016**

Lívia Maísa Guiraldi

**PESQUISA DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM PRIMATAS DE
CATIVEIRO DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE
BAURU, SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guiraldi, Livia Maísa.

Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do
Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo / Livia Maísa
Guiraldi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis Coorientador:
Virgínia Bodelão Richini Pereira Capes: 21300003

1. Tripanosomatídeos. 2. Primatas não humanos. 3.
Macaco. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Técnica
indireta de fluorescência para anticorpo.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leishmanioses; Macacos;
Tripanossomíase.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adroaldo e Sonía,

Os maiores amores da minha vida, os que me ensinaram o valor de cada conquista e se este trabalho se tornou possível, com certeza foi graças à vocês, que sempre me incentivaram, confiaram e estiveram ao meu lado. Tenho orgulho de dizer que

Amo vocês!

A minha irmã, Láisa,

Pelo carinho e compreensão ao longo dessa jornada, pela amizade de irmã e por ser essa pessoa única que completa minha vida,

Te Amo!

A meu tio Pécio e meu primo Percinho,

Sempre se fizeram presentes em minha vida, me apoiando e auxiliando em todos os momentos,

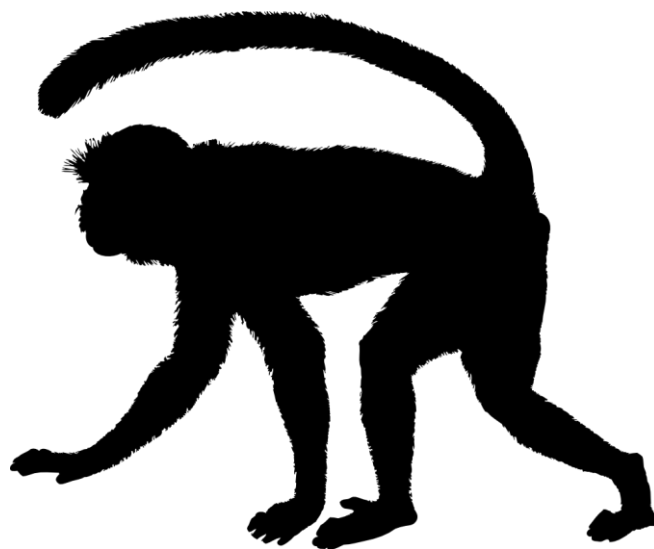
Adoro Vocês!

A minha querida e eterna avó, Iracema,

Com o coração cheio de saudade, mas com a esperança de que um dia voltaremos a nos encontrar, pois o amor da vida terrena pode ultrapassar barreiras maiores do que imaginamos. Com carinho e amor eterno, Amo Você!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos primatas não-humanos do Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP que mesmo sem compreender o que realmente estava acontecendo, tomamos todos os cuidados necessários para não ferir o que os animais têm de melhor a nos oferecer, o amor!



AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a fé de todos os dias e me fazer crer que o amanhã sempre acontece para aquele que acredita!

Aos meus queridos amigos da faculdade, pela lealdade, cumplicidade, carinho e confiança! Foram momentos únicos os quais convivi ao lado de pessoas especiais, galgando caminhos repletos de conhecimento e acima de tudo de amizade e união.

*Agradeço às pessoas que tive o prazer de intitular de AMIGOS, os quais me auxiliaram em momentos difíceis e sempre estiveram presentes para que isso se tornasse realidade. Em **resumo**, os amigos são nossas riquezas. Mesmo sem **objetivo específico**, fazem parte de nossa vida e nos fazem ter a confiança de que tudo dará certo. Não há **material** e nem **métodos** infalíveis que nos tornem próximos dos verdadeiros amigos; estes a gente sabe reconhecer e o **resultado** dessa união só podia ser um: companheirismo. Eles são e sempre serão nossas **referências** a seguir e em meus eternos **agradecimentos** só podiam estar: Maria Fernanda (Nandinha) pelas risadas, ensinamentos, histórias de vida e carinho; Mirian (Paixão) por sempre “pegar no meu pé” pois sei que isso é amor de amigo, pelos conhecimentos compartilhados e pela alegria de todos os dias; Gabriela (a estrangeira), pela cumplicidade e por deixar o ambiente de laboratório sempre harmônico com as músicas da rádio peruana; Daniela (Dani) pela cumplicidade no trabalho, me auxiliando com seus conhecimentos ímpar e pela sua lealdade, ao Fábio, pela amizade verdadeira e a querida amiga novata, Amanda.*

Obrigada por serem especiais!

Obrigada aos meus do “segundo laboratório” que tive o prazer de conhecer. Agradeço a querida Débora (gêmea) que aprendi a amar cada dia mais; a Bárbara (Bah) pela pessoa fofa que és e pelo sorriso único e encantador de todos os dias; a Franciellê (Fran) pela amizade, carinho e por ser muito especial, a Kethlyn (Keth) pelas conversas e incentivos de sempre, a Aghata pela alegria e carisma de todas as horas e a Laís pelos debates científicos que ajudaram a enriquecer meu trabalho.

Agradeço!

Ao meu querido amigo da Pós-Graduação Tião; não somente pela amizade, mas por ser o médico humano que todos procuram! Você é uma pessoa incrível!

Quero agradecer a minha querida orientadora, Simone Lucheis, pela confiança depositada em mim durante todo o processo de ensinamentos que me concedeu. Sempre com um sorriso no rosto, disposta a me auxiliar, com uma compreensão incrível.

Muitíssimo obrigada!

Um agradecimento especial a minha co-orientadora, Virgínia Pereira, que me ensinou a ser paciente com os problemas relacionados a pesquisa. Que sempre esteve disposta a me auxiliar e o fez prontamente. Obrigada pelos jantares deliciosos e principalmente pela sua amizade.

Agradeço com carinho!

A minha amiga-irmã Talita (Tabi), amiga de infância em quem eu sempre pude confiar. Amizades como a sua, eu tenho o prazer de conservar. Te amo, amiga!

Obrigada a minha querida professora Gislaine Burgarelli, você sempre esteve ao meu lado, não apenas compartilhando seus ricos conhecimentos, mas principalmente se tornando essa amiga maravilhosa. Obrigada pelo incentivo depositado em mim.

Com apreço, agradeço!

Obrigada de coração a Maristela, Edison e Stéfany por me acolherem como membro dessa família incrível e honrada. Vocês sempre me auxiliaram, estiveram presentes em minha vida e me ofereceram carinho sincero.

Obrigada!

Aos meus familiares, jóias raras que amo de paixão. Aos meus amados pais, Adroaldo e Sonia que sempre souberam ser pais de verdade, que me ensinaram a caminhada da vida, me fizeram alcançar a felicidade e os que sempre estão em meus pensamentos; a minha irmã, Láisa que mesmo aparentando ser a mais nova, sabemos que seu conselhos e experiências me fizeram ser uma pessoa melhor; ao meu tio Percio que se faz presente em todos os momentos especiais da minha vida, participando sempre; ao meu primo Percinho (gordinho) que me ensinou que amor de primo é como amor de irmão e que mesmo judiando da caçula da família, ainda assim eu te amo; a minha avó paterna, Alice pelo carinho, amor e alegria.

Com todo o meu amor, obrigada!

*Obrigada embargada de lembranças e saudade, àqueles que nos deixaram.
Ao meu avô paterno, Renato que sempre me proporcionou carinho e amor;
aos meus avós maternos, Albino e Iracema, que auxiliaram em minha
criação e eu sei que hoje eu sou o que sou, graças à vocês. Obrigada pelas
brincadeiras da infância regadas com cuidado e amor. Mesmo longe, vocês
sempre estão bem pertinho, dentro do meu coração.*

Amo e sempre amarei vocês!

*Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) pelo apoio financeiro que auxiliou a realização desse trabalho!*

*Ao meu grande amor, Wesley J. Santos, que me ensinou muito além de uma
amizade, me ensinou a verdadeira compreensão, lealdade, confiança e o
respeito de todos os dias. Obrigada por ser exatamente quem és! Você é e
sempre será a peça fundamental nesse jogo que chamo de vida.*

Te Amo ♡

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Resumo

Guiraldi, LM. **Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo.** 117p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2016.

A família Trypanosomatidae inclui agentes etiológicos responsáveis por ocasionar doenças em humanos e demais animais, englobando dezenas de protozoários pertencentes a diferentes gêneros, destacando-se os protozoários representantes dos gêneros *Leishmania*, causadores das leishmanioses e *Trypanosoma*, causador de tripanosomíase. Enquanto a transmissão das leishmanioses ocorre devido à picada de insetos fêmeas de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, a transmissão da tripanossomíase depende da espécie de tripanosoma envolvida na infecção, podendo ocorrer pela picada de insetos adultos do gênero *Glossina*; pelas fezes de triatomíneos, sobretudo do gênero *Triatoma* e mecanicamente por moscas hematófagas, principalmente do gênero *Stomoxys*. Além dos humanos, animais domésticos e silvestres podem atuar como reservatórios de tripanosomatídeos, incluindo os primatas não humanos, os quais estão associados com o ciclo enzoótico das leishmanioses e tripanosomíase, sendo que a infecção natural por protozoários do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* em mamíferos selvagens é comum na natureza. O objetivo do trabalho foi pesquisar tripanosomatídeos em primatas de cativeiro procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP por meio de anticorpos contra o parasito e pela amplificação do DNA do protozoário. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue de 39 primatas. A técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi aplicada na pesquisa de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, utilizando-se *primers* espécie-específicos, direcionados à região do kDNA dos parasitos, sendo todos os animais negativos. Porém, com a utilização de *primers* para a região ribossomal (ITS-1), específicos para a família Trypanosomatidae, 37 dos 39 (94,9%) animais foram positivos para *Trypanosoma* spp. Realizou-se também a prova sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, revelando um animal da espécie *Erythrocebus patas* (macaco-pata) positivo para *Leishmania braziliensis* com título 160. Os resultados demonstram que os primatas do zoológico estão susceptíveis à infecção por tripanosomatídeos, alertando-se para a necessidade de busca ativa de vetores flebotomíneos e triatomíneos nos recintos e arredores, como medida preventiva para o risco de infecção aos funcionários e visitantes.

Palavras-chave: leishmanioses, tripanossomíases, macacos, diagnóstico.

Abstract

Guiraldi, LM. **Research of trypanosomatids in captive primates from Municipal Zoological Park of Bauru, São Paulo.** 117p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2016.

The family Trypanosomatidae includes etiological agents responsible for causing diseases in humans and other animals. There are dozens of protozoa belonging to different genres, especially protozoa representatives of *Leishmania* genre, which causes leishmaniasis and *Trypanosoma*, responsible for trypanosomiasis. While the transmission of leishmaniasis is due to the bites of female sand flies belonging to the genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World, the transmission of trypanosomiasis depends on the species of trypanosome involved in the infection. It may occur by the bite of adult insects of the genus *Glossina* or by the feces of insects, especially by the genus *Triatoma* and mechanically by bloodsucking flies, especially the *Stomoxys* genus. In addition to humans, domestic and wild animals can act as trypanosomatids reservoirs, including non-human primates, which are associated with the enzootic cycle of leishmaniasis and trypanosomiasis; the natural infection by *Trypanosoma* and *Leishmania* protozoa in wild mammals is common in nature. The aim of the study was to investigate trypanosomatids in captive primates coming from Municipal Zoological Park of Bauru by antibodies against the parasite and the amplification of the DNA of the parasite. For this, blood samples were collected from 39 primates. The molecular technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied in research for *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* using species-specific primers directed to the region of kDNA parasites; all animals were negative by this technique. However, with the use of primers for the ribosomal region (ITS-1) specific to Trypanosomatidae family, 37 of 39 (94.9%) animals were positive for *Trypanosoma* spp. It was also conducted serological evidence by the Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) for *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, revealing one (01) animal *Erythrocebus patas* (patas monkey) positive for *Leishmania braziliensis*, with titer 160. The results show that primates from Municipal Zoological Park of Bauru are susceptible to infection by trypanosomatids, alerting the need for active search for sandfly vectors and triatomines in the grounds and surrounding areas, as a preventive measure for the risk of infection for staff and visitors.

Key-words: leishmaniasis, trypanosomiasis, monkey, diagnosis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
REVISÃO DA LITERATURA	17
OBJETIVO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO 2	51
MANUSCRITO	52
CONCLUSÃO	72
ANEXOS	74
APÊNDICES	88

Capítulo 1

REVISÃO DA LITERATURA

Tripanosomíases

Nas últimas décadas, as alterações ambientais ocasionadas pelos humanos, desde as atividades agropecuárias às expansões do perímetro urbano em direção ao ambiente silvestre, culminaram em uma maior exposição dos humanos a diferentes espécies de parasitos que anteriormente circulavam apenas nesses ambientes, visto que hospedeiros e uma diversidade de espécies de insetos que podem atuar como vetor passaram a conviver em áreas peridomiciliares. Assim, humanos e animais domésticos são utilizados por esses vetores como fonte de repasto sanguíneo, podendo transmitir diversos parasitos, como protozoários do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* (1).

A ordem Kinetoplastida inclui protozoários flagelados notoriamente conhecidos pela presença do cinetoplasto, caracterizado por ser uma estrutura que contém DNA extracelular de forma condensada. Dentro dessa ordem, destaca-se a família Trypanosomatidae, a qual apresenta agentes etiológicos que são responsáveis por ocasionar doenças tanto em humanos como em outros animais. Essa família exhibe gêneros que parasitam plantas (*Phytomonas*), insetos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*), répteis (*Sauroleishmania*) e mamíferos (*Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania*) (2).

A família Trypanosomatidae é um grupo filogenético amplamente diversificado e engloba dezenas de espécies de protozoários pertencentes a diversos gêneros. Podem infectar mais de 900 espécies de vertebrados e 500 espécies de invertebrados, os quais podem atuar como transmissores desses protozoários (3). Entre os membros dessa família, destacam-se os protozoários pertencentes aos gêneros *Leishmania*, causador das leishmanioses e *Trypanosoma*, causador da tripanossomíase; ambos apresentam ciclo de vida bastante complexo envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores (4).

Enquanto a transmissão das leishmanioses ocorre pela picada de insetos fêmeas de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho mundo e ao *Lutzomyia* no Novo Mundo (5), os tripanosomas são divididos em dois grupos, Salivaria e Stercoraria, os quais diferenciam-se não somente pela morfologia, mas também devido ao modo de transmissão do parasito (6). Os tripanosomas pertencentes ao agrupamento Salivaria são aqueles que apresentam parte de seu ciclo de vida no interior de glândulas salivares do inseto vetor e são transmitidos aos vertebrados pelo repasto sanguíneo durante a alimentação dos insetos adultos, já os protozoários pertencentes ao grupo Stercoraria são aqueles transmitidos por meio do conteúdo fecal ou pela urina do inseto vetor, particularmente triatomíneos, que ao realizar o repasto sanguíneo, o edema ocasionado pela picada constitui-se em porta de entrada para o parasito (7).

De acordo com Hoare, tripanosomas pertencentes ao agrupamento Salivaria estão alocados em quatro subgêneros: 1. *Trypanozoon*, que inclui o protozoário responsável pela doença do sono, *Trypanosoma brucei*, encontrado apenas na África, além de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equinum* e *Trypanosoma equiperdum* os quais parasitam principalmente cavalos e são encontrados nas Américas; 2. *Nannomonas* que engloba *Trypanosoma congolense*, responsável por parasitar bovinos, ovinos e caprinos e também *Trypanosoma simiae* encontrado em porcos e primatas não humanos; 3. *Duttonella*, o qual compreende apenas uma espécie descrita até o momento, *Trypanosoma vivax*, responsável por parasitar principalmente bovinos e 4. *Pycnomonas* que inclui *Trypanosoma suis*, caracterizado por parasitar porcos. Dentre os tripanosomas pertencentes ao grupo Stercoraria, são descritos três subgêneros: 1. *Megatrypanum*, incluindo *Trypanosoma theileri*, o qual está associado à infecção em bovinos, *Trypanosoma melophagium* responsáveis por parasitar carneiros, *Trypanosoma conorhini* que já foi encontrado em ratos e primatas não humanos e *Trypanosoma freitasi* responsável pela infecção em gambás; 2. *Herpetosoma* cujas espécies de tripanosomas

descritas neste subgênero são responsáveis por parasitar principalmente roedores, como no caso de *Trypanosoma lewisi* descrito em ratos e *Trypanosoma musculi* em camundongos e 3. *Schizotrypanum*, este subgênero inclui o parasito causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (8).

Muitos dos protozoários do gênero *Trypanosoma* são responsáveis por ocasionar doenças que apresentam importância médica e veterinária, e que de acordo com o agente etiológico, o hospedeiro e o local de sua ocorrência, pode ser denominada como Tripanosomíase Africana ou Doença do Sono, ocorrendo na África e a que ocorre na América Latina, Tripanosomíase Americana ou Doença de Chagas (1).

A Tripanosomíase Humana Africana ocorre em 36 países da África Sub-Sahariana, local onde há presença dos vetores, os quais compreendem moscas do gênero *Glossina*, conhecidas popularmente por tsé-tsé, sendo que a população de maior risco é aquela que vive em áreas rurais. Dependendo do protozoário parasito, a Tripanossomíase Humana Africana se distingue de duas formas, aquela ocasionada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*, a qual é encontrada em 24 países da África Ocidental e Central e é o agente responsável por mais de 98% dos casos da doença crônica. A outra forma é ocasionada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense*, responsável pela forma aguda da doença e está presente em 13 países da África Oriental e Austral; atualmente esse agente acomete menos de 2% da população com a doença (9). Outro protozoário responsável pela tripanossomíase Africana é *Trypanosoma brucei brucei*, o qual normalmente infecta animais domésticos e silvestres, mas não os humanos (10).

Muitos dos casos de Tripanossomíase Humana Africana podem permanecer assintomáticos ou evoluir para o estágio crônico da doença, com o comprometimento do sistema nervoso, ocasionando distúrbios neurológicos e psíquicos e, em casos mais graves, levando o indivíduo ao estágio de coma (11). A apresentação clínica da doença compreende

diversos sintomas. A infecção ocasionada por *Trypanosoma brucei rhodesiense* inicialmente tende a formar um cancro que se desenvolve no local da picada pela mosca tsé-tsé, caracterizado por ser uma ulceração na pele ocasionando um edema de tamanho variável, com poucos milímetros ou até mesmo alguns centímetros de diâmetro e que aparecem dentro de duas ou três semanas após a picada (10).

O diagnóstico da Tripanosomíase Humana Africana baseia-se na pesquisa direta do parasito em microscopia do fluido corporal. *Trypanosoma brucei rhodesiense* são mais facilmente encontrados no sangue, em biópsias de linfonodo e cancro. Como a detecção do parasito em microscopia é eficaz, não se utiliza testes sorológicos no diagnóstico. Já o método clássico de detecção de *Trypanosoma brucei gambiense* consiste na identificação do parasito em exames microscópios a partir do aspirado de linfonodo. Na maioria das vezes, como a carga parasitária de *Trypanosoma brucei gambiense* no sangue é baixa, dificilmente são detectados em microscopia a partir de esfregaço sanguíneo, sendo necessários testes sorológicos (12).

A Tripanossomíase Americana é uma enfermidade endêmica na América, sobretudo na América Latina, ocasionada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Descrita pela primeira vez em 1909 pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas, a doença afeta mais de seis milhões de pessoas nas Américas, sendo cerca de três milhões apenas no Brasil. A principal forma de transmissão do parasito se dá por um inseto vetor triatomíneo, de diferentes espécies, sendo o mais conhecido, *Triatoma infestans* que, durante repasto sanguíneo, defeca liberando formas infectantes do parasito que adentram a corrente sanguínea do vertebrado pela ferida ocasionada pela picada do inseto (13).

A doença é caracterizada principalmente por seu longo período crônico, com o paciente chagásico assintomático por vários anos, ou com o aparecimento de sintomas, como cardiomiopatias, além de megacólon e megaesôfago. Nos últimos anos, outras vias de infecção

foram relatadas na literatura, como transmissão por transplante de órgãos sólidos (14), transmissão congênita (15) e transmissão oral por consumo de alimentos *in natura*, mal higienizados (16), ou ocorrendo o processamento de alimentos juntamente com triatomíneos, como no caso do consumo da polpa de açaí na região Norte do país (17; 18) e do caldo de cana em Santa Catarina (19).

Além disso, casos de doença de Chagas por transfusão sanguínea foram registrados em países não endêmicos (20), sobretudo nos EUA e Europa. A mobilidade da população latino-americana para essas regiões pode ser um dos fatores para que casos da doença sejam relatados nesses locais (21).

Além dos humanos, *T. cruzi* pode infectar uma variedade de animais domésticos (22) e silvestres, como marsupiais, morcegos, tamanduás, tatus, preguiças, roedores e primatas não humanos (23), os quais assumem grande importância em saúde pública, já que podem atuar como reservatórios do parasito.

O diagnóstico da Tripanosomíase Americana pode ser realizado pela pesquisa direta do parasito, quando o indivíduo se encontra na fase aguda da doença, por meio de esfregaço sanguíneo, hemocultura e xenodiagnóstico; pela técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase, amplificando fragmentos específicos do DNA do protozoário e pelos testes sorológicos indireto, que objetivam a identificação de anticorpos contra o parasito, os quais auxiliam no diagnóstico da fase crônica da enfermidade, como a Imunofluorescência Indireta e Ensaio de Imunoabsorção enzimática (24).

Leishmanioses

As leishmanioses constituem-se em doenças negligenciadas e são consideradas um sério problema de saúde pública, sendo uma das seis doenças de maior importância de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Endêmica em 98 países ao redor do mundo, cuja

estimativa é de 20.000 a 30.000 mortes por ano, classificando-a em nono lugar das doenças infecciosas (25).

São doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, sendo causadas por diversas espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. De acordo com a espécie envolvida e a relação do protozoário com o seu hospedeiro, pode apresentar diversas formas clínicas (26). Dentre essas formas, destacam-se a mucocutânea, cutânea ou tegumentar e a visceral (27).

A transmissão da doença ocorre por diferentes espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na Europa, África e Ásia (28). No Brasil já foram identificadas 274 espécies de flebotomíneos, sendo que 10% delas estão envolvidas na transmissão das leishmanioses. Grande parte dessas espécies são endêmicas da região Amazônica brasileira, uma vez que a imensa biodiversidade, bem como a presença de inúmeros hospedeiros mamíferos que vivem nessa região, contribuem com a instalação e adaptação dos vetores (29).

A infecção ocorre pela picada do inseto popularmente conhecido como mosquito-palha, cangalhinha, birigui, dentre outros. Nos flebotomíneos, o hábito de hematofagia é exclusivo das fêmeas, já que são elas que necessitam de sangue para a maturação de seus ovos. Assim, ao se alimentar de um indivíduo com leishmaniose, a fêmea do mosquito pode ingerir macrófagos infectados. No trato digestório do flebotomíneo, passam a residir as formas promastigotas do parasito. Ao realizar repasto sanguíneo em outros vertebrados, a fêmea do flebotomíneo inocula saliva juntamente com as formas promastigotas. Uma vez no organismo do vertebrado, tais formas são fagocitadas pelos macrófagos e, em seu interior, perdem seus flagelos, devido à acidez nos fagolisossomos, e residem na forma de amastigotas quando então são encontrados nos tecidos (30). O período de incubação da leishmaniose em humanos pode

variar de dez dias a vinte e quatro meses, tendo em média uma incubação entre dois e seis meses (31).

É uma parasitose amplamente distribuída, encontrada em diversos países, exceto no continente Antártida. Atualmente ganhou destaque de doenças emergentes devido às alterações climáticas, migração da população e também pela dificuldade de eliminação da infecção em animais que agem como reservatório (32). O desmatamento e as adaptações comportamentais dos vetores e dos reservatórios têm contribuído para a expansão da leishmaniose no Brasil, dando destaque ao elevado número de animais infectados, tantos os que vivem no ambiente urbano, como silvestre (33). Além disso, uma ampla variedade de espécies de flebotomíneos foram capazes de adaptar-se a diferentes habitats, elevando o número de insetos que passaram a ser encontrados cada vez mais próximos às habitações humanas (34). Isso faz com que a doença venha assumindo um papel importante para a saúde pública, já que a crescente urbanização reflete um número cada vez maior de novos casos (35).

Aproximadamente 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença em 88 países endêmicos do mundo, sendo que 72 destes são considerados países em desenvolvimento (36).

Estimativas indicam que a prevalência global de leishmaniose é de 12 milhões de pessoas, com uma incidência anual em países endêmicos de 200 mil a 400 mil casos de leishmaniose visceral e de 700 mil a 1.2 milhão para leishmaniose tegumentar (37).

Cerca de dois milhões de pessoas são infectadas a cada ano, uma vez que a comunicação de informação referente aos novos casos é obrigatória em apenas 33 países, permitindo com que a leishmaniose continue a ser uma das principais doenças negligenciadas no mundo (27).

O município de Bauru, localizado no interior do Estado de São Paulo, possui áreas fragmentadas de florestas que estão sob constante desequilíbrio ecológico pela ação do homem, o que leva a evasão de animais selvagens a ocupar áreas urbanas. Quando estes animais encontram abrigo e alimento nestas áreas, acabam por incorporarem-se a estas áreas como seu próprio habitat. Esta situação ocorre no município de Bauru, com marsupiais do gênero *Didelphis* spp., popularmente conhecidos por “gambás”, encontrando-se bem adaptados a vários ambientes e frequentemente vistos na área urbana do município. Santiago et al. (38) encontraram uma proporção de 71% de animais positivos dentre 107 amostras de sangue e medula óssea examinadas no teste de ELISA e 91,6% de animais positivos à PCR para *Leishmania* spp. dentre 112 amostras testadas, sugerindo que *Didelphis* spp. pode participar no ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. em Bauru.

Leishmaniose Visceral (LV)

A transmissão da doença ocorre por diferentes espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. No Velho Mundo, as principais espécies transmissoras da LV são: *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus neglectus* (39) enquanto nas Américas, com exceção da Colômbia, a transmissão é quase que exclusivamente atribuída à *Lutzomyia longipalpis* (40), porém outras espécies como *Lutzomyia cruzi* (41) e *Lutzomyia migonei* também são de grande importância (42), dependendo da área geográfica.

A LV ocorre em cerca de 65 países, sendo 90% dos casos acometendo pessoas que vivem na área rural e de baixa condição financeira. Dentre os países com alta taxa de LV destacam-se Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (36). É uma importante zoonose caracterizada por ser uma doença crônica, ocasionada no Brasil, por *Leishmania (L.) infantum* (43).

Apesar dos canídeos domésticos serem considerados os principais reservatórios urbanos da LV, outras espécies de animais também podem ser infectadas, como os roedores domésticos, canídeos silvestres, entre outras (44). Dentre os mamíferos que se infectam naturalmente pela *Leishmania*, inclui-se os animais domésticos (45) e selvagens de vida livre (46) e também de cativeiro (47), que atuam como potenciais reservatórios da doença.

De acordo com Shaw (48), os hospedeiros distinguem-se em primários, os quais referem-se aos vertebrados que apresentam o protozoário no ambiente silvestre, sendo os responsáveis pela manutenção da infecção neste ambiente, mesmo sem a necessidade da co-existência de um outro vertebrado e os hospedeiros secundários, que diferentemente dos primários, são animais naturalmente infectados, mas incapazes de manter o ciclo enzooótico indefinidamente na natureza. Os mamíferos que representam os reservatórios primários tanto da leishmaniose visceral como da leishmaniose tegumentar pertencem a diferentes ordens, que incluem, Rodentia, Xenarthra, Didelphimorphia e os Primatas (humanos e demais primatas). Com o passar do tempo, a definição de reservatório mudou bastante, o que tornou necessário um estudo das zoonoses em uma perspectiva mais ampla, como exemplo das leishmanioses, sendo os parasitos mantidos por várias espécies de mamíferos que vivem na natureza (49).

Há um grande problema de saúde pública envolvendo a leishmaniose, principalmente devido à combinação da doença com a complexidade de sua epidemiologia, tornando-se cada vez mais necessário o esclarecimento de uma rede de transmissão, incluindo hospedeiros mamíferos não-humanos, para que se tenha estratégias de controle efetivo (49).

A intensa migração de pessoas de áreas rurais para as regiões urbanas, constituiu um fator importante de aceleração da expansão da doença (36). No país, a LV tem sido reportada em diferentes regiões e com diferentes taxas de prevalência. A região Nordeste se destaca por apresentar 40% dos casos anuais em humanos que ocorrem em todo o país. Nesta

área, os seres humanos, os animais que servem de reservatórios e parte dos vetores, compartilham o mesmo ambiente, o que contribui para a rápida expansão e persistência da doença (50).

Há relatos da enfermidade em 19 estados brasileiros, em especial no Nordeste, região que concentra mais de 90% de casos de leishmaniose humana. Há focos também em outras regiões, como Norte, Sudeste e Centro-Oeste. O número de casos da doença foi crescente desde quando foi notificada no estado de São Paulo, em 1998. Sua introdução resultou em uma epidemia na região de Araçatuba, apresentando mortalidade variando de 29,4% em 1999 a 9,3% em 2010 (51). O município de Araçatuba, localizado a noroeste do Estado de São Paulo, identificou pela primeira vez a LV em cães no ano de 1998 e em humanos em 1999 (52).

Segundo dados do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru (CCZ), durante o ano de 2006 foram registrados 65 casos humanos de leishmaniose e quatro óbitos. Devido a isso, algumas medidas de controle foram tomadas nesse mesmo ano, tendo-se realizado 4452 eutanásias em cães, dos quais 27% deles apresentaram diagnóstico positivo para leishmanioses, confirmados por análise laboratorial; 55% apresentavam os sintomas clássicos de LV e 18% apresentavam outras doenças (53). De janeiro a maio de 2015, foram realizadas no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, 1,6 mil coletas de sangue canino para inquérito epidemiológico, com a utilização de testes parasitológicos, sorológicos de RIFI e ELISA, além do teste rápido de triagem Dual Path Platform (DPP), com 156 (9,75%) animais positivos para leishmaniose visceral canina (54).

As manifestações clínicas da LV em humanos e em cães são bastante semelhantes e se caracterizam por febre irregular durante longos períodos, anemia, perda de peso e caquexia nos estágios finais da doença. Em cães, são evidentes as descamações da epiderme que ficam localizadas na região periocular e/ou auricular ou difusa por todo corpo, despigmentação

cutânea acompanhada por alopecia, pelame predominantemente seco, hiperqueratose e lignificação observadas nas áreas de proeminência óssea, pneumonia, miocardite, alguns distúrbios de locomoção, hemorragias espontâneas, onicogribose, lesões oculares, disfunções urinárias, hepáticas e também neurológicas (55).

Uma alta proporção de animais infectados, principalmente cães, podem não apresentar sinais clínicos da doença, mesmo depois de um longo período de incubação. Estes animais são tidos como assintomáticos, porém se existirem insetos vetores no mesmo ambiente de animais infectados, esses podem agir como reservatórios e com probabilidades de repassar a doença adiante, tendo em vista sua alta carga parasitária localizada na pele (56).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser efetuado por técnicas parasitológicas, para identificação morfológica do agente; sorológicas, que objetivam a identificação de anticorpos específicos contra o parasito e moleculares, amplificando fragmentos específicos do DNA (57). A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) possui habilidade de detectar o DNA parasitário, podendo ser utilizada em ampla variedade de amostras biológicas em humanos e animais (58), também sendo aplicável para espécies domésticas e silvestres. A combinação das técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de maior número de animais positivos para LV, em diferentes áreas endêmicas (59).

Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar (LT)

A LT ocorre tanto em países do Novo Mundo, como em países do Velho Mundo, sendo endêmica em países tropicais e neotropicais (60), com ocorrência em sete principais: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (36).

O protozoário causador da doença no ambiente urbano no Velho Mundo é principalmente da espécie *Leishmania tropica*, enquanto em ambientes mais secos e de áreas

desérticas, a principal espécie encontrada é *Leishmania major*. A transmissão da LT no Velho Mundo é atribuída a diferentes espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*. Já a LT, que ocorre na América Latina, é ocasionada por protozoários de dois subgêneros de *Leishmania*: *Leishmania* (*Leishmania*), que inclui *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis*; e o subgênero de *Leishmania* (*Viannia*), como por exemplo *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (61).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta como vetor diversas espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, sendo que, no Brasil, as principais espécies transmissoras são *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (62), *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* (63).

A LTA inclui a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucocutânea. A doença foi registrada pela primeira vez no município de Bauru, São Paulo, no ano de 1908 durante o desmatamento que houve na região para a construção da Estrada de Ferro Sorocabana. No início a doença ficou conhecida como “úlceras de Bauru” (64).

Dentre os animais que podem se infectar naturalmente, destacam-se aqueles pertencentes a superordem Xenarthra. (49). Esta superordem é nativa do continente americano e compreende a ordem Pilosa que tem como representantes os tamanduás e preguiças e a ordem Cingulata que inclui os tatus (65). Além destes, a ordem Didelphimorphia, que engloba a maioria dos marsupiais, como exemplo *Didelphis marsupialis*, o gambá comum, é considerado o principal reservatório urbano da LTA (66).

A relação do parasito com seu hospedeiro tem influência nas manifestações clínicas da doença, a qual pode ser assintomática ou apresentar ulcerações da pele ou mucosas. Essas úlceras podem se curar espontaneamente ou evoluir para quadros clínicos mais graves, com a presença de úlceras destrutivas generalizadas e que podem comprometer a vida do hospedeiro

(67). Dentre as manifestações clínicas da LT, destaca-se a presença de pequenos nódulos cutâneos, os quais podem evoluir e causar destruição de tecidos e mucosas (60).

O diagnóstico laboratorial da LT pode ser realizado a partir da visualização de formas amastigotas do protozoário em amostras de tecidos por meio de coloração histológica de secções do tecido (baço, fígado, rins entre outros); identificação do parasito em esfregaços de impressões de biópsias e também em esfregaços de raspagens dérmicas das margens das úlceras. Outros métodos de identificação do protozoário incluem aspirado das bordas das lesões cultivados em meio bifásico; aspirados inoculados em tecidos de hamster; cultura a partir do macerado de biópsias, além do teste de Montenegro (68).

Tripanosomatídeos em primatas não-humanos

A infecção natural por protozoários do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* em mamíferos selvagens é comum na natureza. Em relação aos primatas neotropicais, diferentes infecções são causadas por vários agentes que também acometem humanos, em particular, infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp (69).

No México, uma avaliação sorológica em dois locais distintos foi conduzida em 55 primatas das espécies *Alouatta pigra* (bugio) e *Alouatta palliata* (bugio), utilizando-se as técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA e Western blot, tendo-se observado uma prevalência de 17,5% para *T. cruzi* e 30% para *Leishmania mexicana*. Os achados deste trabalho demonstram que a espécie *Alouatta pigra* foi mais susceptível a desenvolver leishmaniose comparada com a *Alouatta palliata* e também a possibilidade destas espécies animais atuarem como reservatórios para ambas as zoonoses, somado ao fato de que os primatas se encontram cada vez mais em proximidade com os seres humanos, devido ao desequilíbrio ecológico (69).

Um estudo foi realizado em Camarões, país pertencente ao continente africano, em 1.141 amostras de sangue de animais silvestres de oito ordens, incluindo 407 espécimes de primatas. Foi utilizada a técnica molecular de PCR com o uso de *primers* específicos para *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma simiae* demonstrando que 18,7% dos 1.141 animais estavam infectados com pelo menos uma dessas espécies de tripanosomas. Maior porcentagem de infecção foi verificada para *T. vivax* (9,5%), sendo encontrado em todas as ordens estudadas. *Trypanosoma brucei* foi diagnosticado principalmente nas amostras de primatas e roedores. Porcentagem menores foram verificados para *T. simiae* (2,4%) e *T. congolense* (3,1%). Os animais silvestres do estudo infectados com tripanosomas foram principalmente primatas e roedores (70).

Para melhor compreensão da associação entre os genótipos de *T. cruzi* em primatas de vida livre e nascidos em cativeiro, foi realizada uma avaliação da infecção em 193 primatas de 14 gêneros de diferentes áreas da Amazônia e da Mata Atlântica brasileira: *Alouatta* (bugio); *Aotus* (macaco-da-noite); *Ateles* (macaco-aranha); *Brachyteles* (muriqui); *Callithrix* (sagui); *Callicebus* (sauá); *Cebus* (macaco-prego); *Chiropotes* (caxiú-preto); *Lagothrix* (macaco-barrigudo); *Leontopithecus* (mico-leão-dourado); *Macaca* (macaco-Rhesus); *Pithecia* (parauacu); *Saguinus* (sagui); *Saimiri* (macaco-de-cheiro), utilizando-se os exames parasitológicos de esfregaço sanguíneo e hemocultura, além do ensaio sorológico de Imunofluorescência Indireta. Os resultados demonstraram que os primatas podem se infectar naturalmente por *T. cruzi*, uma vez que o parasito foi isolado em 8 espécies de primatas da floresta Amazônica e em quatro da Mata Atlântica. Os resultados deste trabalho demonstram a possibilidade da infecção por *T. cruzi* em todos os gêneros de primata do estudo, e que a infecção ocorre independente do comportamento social, nicho e habitat desses animais, os quais podem desempenhar papel importante na manutenção do parasito na natureza (71).

Uma grande diversidade de espécies de animais silvestres pode atuar como reservatórios de agentes ocasionais de diversas zoonoses. Um estudo realizado no Centro de Conservação da Fauna Silvestre (CCWF) do município de Ilha Solteira, no estado de São Paulo, Brasil, conduzido em 103 animais silvestres, 38 animais de cativeiro (que incluía oito bugios da espécie *Alouatta caraya* e seis macacos-prego da espécie *Cebus apella*) e 65 animais de vida livre, objetivou identificar infecção natural por tripanosomatídeos em amostras de sangue desses animais pela técnica de PCR do sangue total e de hemocultura. Os resultados mostraram a presença de parasitos flagelados em hemocultura do primata da espécie *Alouatta caraya*, cujo resultados do sequenciamento demonstrou 90% de similaridade com *Trypanosoma minasense* (72).

Tripanosomas são os parasitos mais frequentemente encontrados em primatas do Novo Mundo. Um estudo foi realizado em 46 primatas do Centro Nacional de Primatas, no estado do Pará, Brasil. As espécies que fizeram parte desse trabalho: dez *Saguinus imperator* (sagui-imperador); sete *Callithrix penicillata* (sagui-de-tufos-pretos); seis *Saguinus fuscicollis* (choim-preto); seis *Alouatta caraya* (bugio); quatro *Saimiri boliviensis* (macaco-de-cheiro); quatro *Callimico goeldii* (mico-de-goeldi); três *Pithecia irrorata* (macaco-cabeludo); três *Chiropotes satanás* (caxiú-preto); dois *Cebuella pygmaea* (sagui-leãozinho) e um *Callicebus donacophilus* (sauá) capturados da região da Amazônia brasileira. Análises realizadas a partir de esfregaço sanguíneo, hemocultura e xenodiagnóstico revelaram infecção por tripanosomas das espécies *Trypanosoma rangeli* (14/46), *Trypanosoma devei* (12/46), *T. cruzi* (4/46) e *T. minasense* (2/46). Os resultados deste estudo confirmam a prevalência da infecção natural por tripanosomas nesses animais (73).

Alguns primatas estão associados com o ciclo enzoótico das leishmanioses, mais especificamente primatas da família Cebidae, como o macaco da espécie *Cebus apella* (macaco-prego) na região Amazônica, o qual está relacionado à *Leishmania (Viannia) shawi*,

responsável pela leishmaniose tegumentar, inclusive utilizado como modelo experimental para estudos deste tipo de infecção (74), já que estes animais são capazes de reproduzir os aspectos lesionais observados na leishmaniose tegumentar humana (75).

Na Argentina, uma avaliação molecular foi realizada em oito primatas, a fim de avaliar a dinâmica destas populações e estado de saúde dos mesmos. Estes primatas, oito macacos-coruja ou macaco-da-noite (*Aotus azarae*), eram adultos (quatro fêmeas e quatro machos). Esta espécie tem como característica a vida em grupo. Os primatas que foram capturados pertenciam a diferentes grupos, tendo-se observado quatro amostras positivas pela técnica de PCR para *Leishmania* (*Viannia*); quando submetidas ao ensaio de RFLP, obteve-se como resultado quatro amostras positivas para *Leishmania braziliensis* confirmadas por sequenciamento. Embora todos os primatas tenham sido capturados em uma mesma área geográfica e os exemplares pertencentes a diferentes grupos, deve-se ressaltar que essa proximidade espacial entre os grupos pode explicar os resultados obtidos (76).

No Brasil, no município de Maringá, estado do Paraná, região endêmica para Leishmaniose Tegumentar, foi realizado um trabalho com 65 mamíferos silvestres de oito espécies das famílias Canidae, Cebidae, Dasyproctidae, Dasypodidae, Didelphidae e Procyonidae, capturados no Parque do Ingá, no município de Maringá. Neste estudo, foram analisadas amostras de soro de quatro macacos-prego da espécie *Cebus apella*. Os resultados do teste sorológico de aglutinação direta (DAT) revelou título maior ou igual a 10 para 100% das amostras de macacos-prego com anticorpos contra *Leishmania* spp (77).

Um estudo realizado com 81 amostras de sangue de animais silvestres de vida livre e de cativeiro, incluindo primatas, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, revelou três primatas *Alouatta guariba* (bugio marrom) e dois canídeos *Speothus venaticus* (cachorro-do-mato-vinagre) positivos para *Leishmania* spp., destes, um primata e um carnívoro

foi positivo para *Leishmania (L.) infantum* pela técnica de PCR, demonstrando a necessidade do controle da leishmaniose, principalmente em áreas endêmicas, com a finalidade de conservação da fauna silvestre mantida em cativeiro (78).

Outro trabalho desenvolvido na região de Belo Horizonte (MG), dentre os 41 primatas mantidos em cativeiro em um zoológico, um primata da espécie *Callicebus nigrifrons* (sauá) foi positivo para *Leishmania chagasi* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e imunohistoquímica, tendo desenvolvido doença fatal com sinais clínicos e lesões compatíveis com leishmaniose visceral. Além deste, outros 17 primatas, incluindo seis *C. nigrifrons*, um *Alouatta guariba* (bugio-ruivo), três *Cebus xanthosternos* (macaco-prego-do-peito-amarelo), um *Leontopithecus crysomelas* (mico-leão-de-cara-dourada), um *Aotus nigriceps* (macaco-da-noite), dois *Pithecia irrorata* (parauacu) e três animais da espécie *Saguinus imperator* (sagui-imperador) apresentaram amostras de sangue positivas para *Leishmania* spp. pela técnica de PCR, embora não apresentassem sinais clínicos da doença (79).

Mais especificamente em Bauru-SP, área endêmica para leishmaniose e do presente estudo, um primata da espécie *Ateles paniscus* (macaco-aranha-preto) procedente do Parque Zoológico Municipal de Bauru apresentou sinais de perda de peso e membranas mucosas pálidas, sinais não patogênicos para a enfermidade. Pela técnica de PCR-RFLP observou-se padrão idêntico para *Leishmania amazonensis* (80).

A “Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora” inclui em sua lista todos os primatas neotropicais. Muitas vezes, estes programas incluem trocas, translocação do animal e reintrodução dos mesmos sem um conhecimento prévio de sua fauna parasitária, o que inclui *Leishmania* e demais tripanosomatídeos. Os achados científicos indicam que os primatas se infectam naturalmente com várias espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, e que esses mamíferos podem estar envolvidos na manutenção destes parasitos

na natureza (49). Levando-se em consideração o ciclo de transmissão do parasito, somado a falta de conhecimento com relação ao estado de saúde dos primatas que são realocados, pode-se facilmente resultar na introdução de mamíferos infectados em uma área, o que permite o estabelecimento de novos ciclos de transmissão de doenças (61).

Zoológico Municipal de Bauru

Mesmo com uma grande diversidade de espécies, o Brasil possui 103 zoológicos que abrigam diferentes espécies animais, a maior parte nativas e também espécies exóticas. Aproximadamente 40% dos zoológicos do Brasil localizam-se no Estado de São Paulo (81). O Parque Zoológico Municipal de Bauru, no interior paulista, é bem-conceituado no país. Vinte e quatro das 227 espécies existentes no zoológico de Bauru são de primatas, sendo vinte primatas do Novo Mundo e quatro do Velho Mundo (82).

A ordem dos primatas é subdividida em duas subordens, os Strepsirrhini (que engloba os lêmures) e os Haplorrhini (inclui todos os símios, que são os primatas do Novo Mundo, Velho Mundo e os humanos). Os primatas do Novo Mundo compreendem todos os aqueles pertencentes ao clado Platyrrhini e são todos oriundos das Américas. Dentro do grupo Platyrrhini estão várias famílias (Cebidae, Atelidae, entre outras). Já os primatas do Velho Mundo são todos aqueles vindos principalmente da África, todos pertencentes ao clado Catarrhini. Este grupo inclui diversas famílias, como os grandes primatas (gorilas, orangotango, chimpanzés e humanos). Uma das principais características que reúnem os primatas é o hálux oponível em relação aos demais dedos (83).

O Parque Zoológico Municipal de Bauru situa-se nas coordenadas 22°20'28'' de latitude sul e 49°01'18'' de longitude oeste. Possui licença IBAMA 1/35/91/2157; SMA 8000/2011 e CRMV-SP 01601. Foi inaugurado no dia 24 de agosto de 1980 e contava com um número restrito de espécies de animais, mas com o passar do tempo, sofreu diversas expansões

e hoje possui uma área de 20 alqueires, que está inserido em um ambiente de cerrado de mais de 200 alqueires (82).

Ciclos enzoóticos de tripanossomatídeos são comuns em áreas de cerrado, como *T. cruzi* (84). Em uma pequena unidade que alberga primatas no Zoológico de Brasília, foram encontrados uma colônia de triatomíneos, e que pode ter possibilitado a infecção dos animais na unidade (85). Portanto, a investigação e a busca de triatomíneos tornam-se necessárias, assim como para os flebotomíneos.

O Parque Zoológico de Bauru é considerado de grande destaque no País, principalmente devido a sua estrutura e preocupação ecológica. Possui um número equivalente a 880 animais e 227 espécies, recebendo cerca de 150.000 visitantes por ano. Os animais que residem no Zoológico representam diferentes locais do planeta, seja da África, Ásia, Austrália, Europa, Américas do Norte e do Sul, mas a maioria deles é proveniente da fauna brasileira (86).

Devido ao alto grau de semelhança filogenética entre os humanos e demais primatas (87), e também pela região proposta para realização do estudo ser considerada uma área endêmica para leishmanioses, é de extrema importância a realização de um levantamento de dados para fins de diagnóstico e para ampliar o conhecimento atual sobre a ocorrência de tripanossomatídeos nestas espécies animais. Portanto, deve-se considerar vários fatores relevantes para este estudo, tais como: a localização do Zoológico, o qual está inserido em uma vegetação de cerrado, que propicia a manutenção de vetores e por ser um ambiente comum entre as espécies de animais que vivem em cativeiro e outras espécies de vida livre, que tem acesso aos recintos devido ao zoológico estar inserido em uma região de mata; o número elevado de flebotomíneos na cidade; a presença de animais sinantrópicos na área urbana do município, como exemplo os gambás, principalmente devido à degradação ambiental e a crescente urbanização em direção às áreas silvestres, que tem como resultado o aparecimento

de animais sinantrópicos, os quais passaram a conviver mais próximos das habitações humanas, trazendo consigo muitos parasitos que anteriormente eram restritos ao ambiente silvestre; bem como o crescente aumento do número de doenças emergentes de importância em saúde pública devido a destruição de áreas de conservação ambiental, tornando-se favorável a aproximação de vetores, tanto de flebotomíneos como também de triatomíneos, nos recintos dos animais em cativeiro em ambientes de zoológico.

Objetivo

Objetivo:

- Pesquisar tripanosomatídeos em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP pela técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pela técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR).

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. Barret M, Burchmore R, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. Lancet. 2003; 362(9394):1469-80.
2. Vickerman K. Diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DS, editors. Biology of the Kinetoplastida. London: Academic Press; 1976.
3. Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol. 2001; 31:648-52.
4. Tirlens AGM, Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. Parasitol Today. 1998; 14(7):265-71.
5. Kato H, Cáceres AG, Hashiguchi Y. First evidence of a hybrid of *Leishmania (Viannia) braziliensis*/ *L.(V.)peruviana* DNA detected from the Phlebotomine sand fly *Lutzomyia tejadai* in Peru. Plos Negl Trop Dis. 2016; 10(1):e0004336.
6. Lukes J. *Trypanosoma* Gruby 1843. Version 02 January 2009 (under construction) [Internet]. 2009 [acesso 15 Fev 2016]. Disponível em: <http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
7. Stevens J, Gibson W. The evolution of Salivarian Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(2):225-8.
8. Barnett SF. The trypanosomes of mammals by CA Hoare. J Small Anim Pract. 1972; 13:671-2.
9. WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) [Internet]. 2016 [acesso 08 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

¹ Segundo normas Vancouver: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

10. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2010; 375(9709):148-59.
11. Coutrin D, Berthier D, Thevenon S, Dayo G.K, Garcia A, Bucheton B. Host genetics in African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol*. 2008; 8:229-38.
12. CDC. Parasites – African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness) [Internet]. 2012 [acesso 10 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/diagnosis.html>.
13. WHO. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness) [Internet]. 2016 [acesso 05 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
14. Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant*. 2013; 13(9):2418-25.
15. Raimundo SM, Massad E, Yang HM. Modelling congenital transmission of Chagas' disease. *BioSystems*. 2010; 99:215-22.
16. Pereira SK, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, et al. Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res*. 2010;59:63-85.
17. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo, WN. Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(4):653-655.
18. Ferreira RTB, Melandre AM, Cabral ML, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(2):190-195.

19. Cardoso AVN, Lescano SAZ, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Rev Inst Med trop. S. Paulo. 2006; 48(5):287-289.
20. Assal A, Corbi C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: um problème parasitaire émergent les pays non endémiques. Transfusion Clin Biol. 2011; 18:286-91.
21. Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. Acta Trop. 2016; 156:68-78.
22. Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005; 11(4):492-509.
23. Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da tripanossomose americana e suas consequências. Vet Soc Bras Med Trop. 1967; 1(4):167-74.
24. Pays JF. Le diagnostic biologique de la maladie de Chagas. RFL. 2011; (430):47-59.
25. WHO. Leishmaniasis [Internet]. 2015 [acesso 20 Fev 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
26. Gontijo B, Carvalho MDR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(1):71-80.
27. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauriarceo CH, Rodríguez-Vivas RI, et al. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. Comp Immunol Microb. 2012; 35:469-76.

28. Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kalazar) from an asymptomatic mother to her child. *Am Acad Pediatr*. 1999; 104(5):e65.
29. Galardo AKR, Galardo CD, Silveira GA, Ribeiro KAN, Hijjar AV, Oliveira LL, et al. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae): potential vectors of American cutaneous leishmaniasis agents in the area associated with the Santo Antônio Hydroelectric System in western Amazonian, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48(3):265-71.
30. Gushi LT. Estrutura populacional de *Lutzomya longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12S de DNA mitocondrial [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.
31. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
32. Longoni SS, Marin C, Sauri-Arceo CH, López-Céspedes A, Rodríguez-Vivas RI, Villegas N, et al. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, México. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11(7):815-21.
33. Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *Vet Res*. 2015; 11(71):1-7.
34. Tanure A, Peixoto JC, Afonso MMS, Duarte R, Pinheiro AC, Coelho SVB, et al. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57(4):321-4.

35. Nascimento BWL, Saraiva L, Neto RGT, Meira PCLS, Sanguinette CC, Tonelli GB, et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. *Acta Trop.* 2013; 125:262-8.
36. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microb.* 2004; 27:305-18.
37. Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande RU, Armignacco O, et al. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: implications for a European endemic country. *Plos One.* 2015; 10(6):e0129418.
38. Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol.* 2007; 150(4):283-90.
39. Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The biology of *Leishmania* - sand fly interactions. In: Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: after the genome*. London: Caister Academic Press Norfolk; 2008. p. 205-38.
40. Galati EAB, Nunes LB, Rego JR FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1997; 31(4):378-90.
41. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011; 27(9):403-409.
42. Silva RA, Santos FKM, Souza LC, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in na endemic area for visceral leishmaniasis. *Braz J Vet Parasitol.* 2014; 23(3):320-327.

43. Marzochi MCA. Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(2):147-149.
44. Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S, Evans DA, et al. Enzymatic typing of 11 strains of *Leishmania* isolated, in mainland Italy from the visceral murine, canine and vulpine forms: demonstration of an enzymatic variant in the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1982; 57:527-31.
45. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2008; 24(12):2948-2952.
46. Cardoso RM, Araújo NNSL, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mendes JD, et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasite Vctor.* 2015; 8(171): DOI 10.1186/s13071-015-0780-y.
47. Jusi MMG, Starke-Buzetti A, Oliveira TMFS, Tenório MS, Souza LO, Machado RZ. Molecular and sorological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011; 20(3): 219-222.
48. Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in diferente ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83: 486-490.
49. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014; 3:251-62.
50. Pimentel DS, Ramos RAN, Santana MA, Maia CS, Carvalho GA, Silva HP, et al. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in na endemic area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(4):491-3.

51. Abreu CR, Parpinelli AC, Lima RR, Dias LGGG, Pereira LF, Dias FGG. Description of six autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis diagnosed in Pedregulho (São Paulo, Brazil). *Braz J Vet Parasitol*. 2015; 24(2):216-9.
52. Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(5):594-5.
53. Gomieri CCB. Secretaria Municipal da Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. (Comunicação verbal, 2006).
54. JCNET. Leishmaniose: 1,6 mil cães passaram por exame “compulsório” em 2015. [Internet] [acesso 21 Mar 2016]. Disponível em: <http://www.jcnet.com.br/Geral/2015/05/leishmaniose-16-mil-caes-passaram-por-exame-compulsorio-em-2015.html>.
55. Marcondes JS, Feitosa FLF, Ikeda-Garcia FA, Lima VMF, Perri SHV, Feitosa MM. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Rev Bras Clin Vet*. 2006; 13(1):20-4.
56. Felipe IMA, Aquino DMC, Kuppinger O, Santos MDC, Rangel MES, Barbosa DS, et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(2):207-11.
57. Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*. 1995; 136:514-6.
58. Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol*. 2003; 113:99-103.
59. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005; 35:1169-80.

60. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Primez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(9):581-96.
61. Markle WH, Makhoul K. Cutaneous Leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician*. 2004; 69(6):1455-60.
62. Missawa NA, Maciel GBML, Rodrigues H. Distribuição geográfica de *Lutzomyia (Nyssomyia) Whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(4):369-373.
63. Pinheiro MPG, Silva MMM, Silva Jr JB, Silva JHT, Alves ML, Ximenes MFFM. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vectors of *Leishmania* protozoa, at the Atlantic Forest Conservation Unit in the municipality of Nísia Floresta, Rio Grande do Norte State, Brazil. *Parasite Vector*. 2016; 9(83): DOI 10.1186/s13071-016-1352-5.
64. Genaro O, Reis AB. Leishmaniose tegumentar americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA, organizadores. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 47-64.
65. Möller-Krull M, Delsuc F, Churakov G, Marker C, Superina M, Brosius J, et al. Retroposed elements and their flanking regions resolve the evolutionary history of Xenarthran Mammals (armadillos, anteaters, and sloths). *Mol Biol Evol*. 2007; 24(11):2573-82.
66. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1981; 76(3):279-86.
67. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 2009; 22:491-502.
68. Weigle KA, De Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36(3):489-96.

69. Rovirosa-Hernández MJ, Cortes-Ortíz L, García-Orduña F, Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Caba M, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico. *Am J Primatol*. 2013; 75(2):161-9.
70. Njiokou F, Simo G, Nkinin SW, Laveissière C, Herder S. Infection rate of *Trypanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in South Cameroon. *Acta Trop*. 2004; 92(2):139-46.
71. Lisboa CV, Mangia RH, Luz SLB, Kluczkowski Jr A, Ferreira LF, Ribeiro CT, et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006; 133: 603-11.
72. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Vet Parasitol*. 2014; 203:203-6.
73. Ziccardi M, Lourenço-Oliveira R, Laison R, Brígido COM, Muniz JAPC. Trypanosomes in non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(2):157-9.
74. Carneiro LA, Silveira FT, Campos MB, Brígido COM, Gomes CMC, Corbett CEP, et al. Susceptibility of *Cebus apella* monkey (primates: Cebidae) to experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2011; 53(1):45-50.
75. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Garcez LM, Souza AA, Braga RR, et al. Leishmaniose cutânea experimental: II-aspectos evolutivos da infecção no primata *Cebus apella* (Cebidae) pela *leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990; 23(1):5-12.
76. Arcadi SA, Rago MV, Liotta DJ, Fernandez-Duque E, Salomón OD. *Leishmania (Viannia)* DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet Parasitol*. 2013; 193:256-9.

77. Voltarelli EM, Arraes SMAA, Perles TF, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Serological survey for *Leishmania* sp. Infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. J Venom Anim Toxins Trop Dis. 2009; 15(4):732-44.
78. Lombardi MC, Turchetti AP, Tinoco HP, Pessanha AT, Soave SA, Malta MCC, et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. Pesqui Vet Bras. 2014; 34(12):1243-6.
79. Malta MC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira AL, Costa EA, Santos RL. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet Parasitol. 2010; 169:193-7.
80. Lima VM, Santiago ME, Sanches LC, Lima BD. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. J Zoo Wildl Med. 2012; 43(4):943-5.
81. Sociedade de Zoológicos e Aquários do Brasil. Zoos e aquários [Internet] [acesso 03 Maio 2014]. Disponível em: <http://www.szb.org.br/zoos-e-aquarios.html>.
82. Zoo Bauru. História do Zoo [Internet] [acesso 01 Maio 2016]. Disponível em: http://zoobauru.com.br/v2/?page_id=237.
83. Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, et al. Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. Mol Phylogenet Evol. 1998; 9(3):585-98.
84. Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Trop. 2015; 151:1-15.

85. Minuzzi-Souza TTC, Nitz N, Knox MB, Reis F, Hagström L, Cuba-Cuba CA, et al. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasite Vector*. 2016; 9(39):1-6.
86. Bauru. Zoo em números [Internet] [acesso 01 Maio 2016]. Disponível em: http://zoobauru.com.br/v2/?page_id=1017.
87. Bennett AJ, Lesch KP, Heils A, Long JC, Lorenz JG, Shoaf SE, et al. Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(1):118-22.

Capítulo 2

Manuscrito

1 **Trypanosomatids in captive primates in an area endemic for visceral leishmaniasis.**

2 Lívia Máisa Guiraldi¹, Wesley José dos Santos¹ (wesleysantos@fc.unesp.br), Mirian dos Santos
 3 Paixão¹ (mirianpaixao_2@hotmail.com), Maria Fernanda Alves-Martin¹
 4 (mariafernanda_bio@hotmail.com), Gabriela Pacheco Sanchez²
 5 (pacheco.sanchez.gabriela@gmail.com), Daniela Barbosa da Silva² (dbarsi@gmail.com),
 6 Virgínia Bodelão Richini-Pereira^{1,3} (virichini@yahoo.com.br), Simone Baldini Lucéis^{1,2,4}
 7 (silucéis@yahoo.com.br),

8 ¹ Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical School, Paulista
 9 State University - UNESP; District of Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

10 ² Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and
 11 Animal Science, Paulista State University - UNESP, Cx. Postal 560, District of Rubião Júnior
 12 s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

13 ³Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru, SP, Brazil, Rubens Arruda St., 6. Altos da
 14 Cidade, Bauru, SP 17015-110, Brazil.

15 ⁴ Paulista Agency of Agrobusiness Technology – APTA, Bauru, Brazil, Rodrigues Alves Av.,
 16 Horto Florestal, Bauru, SP 17030-000, Brazil.

17 ***Author for correspondence:** Tel.: +5516997389055

18 **E-mail address:** livia_maisa_g@hotmail.com

19 **Key words:** *Leishmania*, Monkey, Zoo, Diagnosis.

20 **Periodical:** Veterinary Parasitology

21 **Abstract**

22 Trypanosomatidae, prominent among families belonging to the order Kinetoplastida, is a highly
 23 diversified phylogenetic group that includes *Leishmania* and *Trypanosoma*, responsible for
 24 provoking diseases of great veterinary and human medical importance. The present study aimed
 25 to research trypanosomatids in non-human primates from a Brazilian zoo by means of antibodies
 26 against the parasite and by amplification of protozoan DNA. Blood samples from 39 primates
 27 were submitted to the molecular technique of conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) for
 28 researching *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* via the
 29 utilization of species-specific primers of the kinetoplast region or kDNA of the parasites, and also
 30 submitted to the serological technique of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). In addition,
 31 PCR was performed to research the family Trypanosomatidae, utilizing primers for the ribosomal
 32 region (ITS-1). One primate tested positive by IFAT for anti-*Leishmania braziliensis* antibodies,
 33 with titer 160. A PCR for the family Trypanosomatidae revealed 38 positive samples, with 37 of
 34 them (94.9%) returned similarity in genetic sequencing with gender *Trypanosoma*, but negative
 35 for the *Leishmania* species evaluated. This is the first study reporting a high circulation of
 36 trypanosomatids among zoo animals in Bauru, São Paulo state, Brazil, pointing to the presence
 37 of vectors that transmit these protozoa. Therefore, it is necessary to monitor sandflies and
 38 triatomines in the region, to avoid the risk of infecting other animal species, caretakers,
 39 veterinaries and the visiting public.

40

41 **Highlights**

- 42 • Natural infection by trypanosomatids in primates is common in nature.
- 43 • Captive animals inserted into tropical regions are highly susceptible to infection by
 44 parasitic protozoa.
- 45 • We found a high prevalence of captive primates positive for *Trypanosoma* spp.

46

47 **1. Introduction**

48 The order Kinetoplastida includes flagellate protozoa that present a kinetoplast, a structure that
49 contains extracellular DNA in a condensed form. Within this order, the family Trypanosomatidae
50 stands out as presenting etiological agents that are responsible for provoking diseases in both
51 humans and in other animals (Vickerman, 1976). This family is a diversified phylogenetic group
52 that encompasses dozens of protozoan species of different genera, able to infect more than 900
53 vertebrate species and 500 invertebrate ones, which can act as transmitters of these protozoa
54 (Podlipaev, 2001).

55 Prominent among the members of this family are two protozoa belonging to the genera
56 *Leishmania*, instigator of leishmaniasis, and *Trypanosoma*, provoker of trypanosomiasis, both of
57 which present a complex life cycle involving such vertebrate hosts as humans and other wild and
58 domestic animals and the vector insect (Tielens and Van Hellemond, 1998).

59 Leishmaniasis is transmitted by the bite of female sandflies of the genus *Phlebotomus* in the Old
60 World and *Lutzomyia* in the New World (Kato, 2016), depending on the parasite specie and on
61 the relation between the parasite and the host, the disease can present as visceral or cutaneous
62 (Longoni et al., 2012). Yet among the trypanosomes, depending on the specie involved in the
63 trypanosomiasis infection, the transmission may occur by means of a bite from an adult insects
64 of the genus *Glossina* (Jordan, 1974)) or via the feces of insects, especially those from the genus
65 *Triatoma* (Silveira, 2000).

66 Wild mammals, including non-human primates, can act as reservoirs of *Leishmanias* and
67 *Trypanosomas*, and present high susceptibility to infection by these parasites (Silveira, 1990;
68 Lisboa et al., 2006).

69 Natural infection by trypanosomatids in wild mammals is a common occurrence in nature.
 70 Neotropical primates suffer from infections that also occur in humans. (Rovirosa-Hernandez et
 71 al., 2013; Minuzzi-Souza et al., 2016).

72 Some studies have demonstrated natural infection by protozoa of the genera *Leishmania* and
 73 *Trypanosoma* in different primate species, including those in the wild and in captivity (Ziccardi
 74 et al., 2000; Njiokou et al., 2004; Malta et al., 2010; Lima et al., 2012; Arcadi et al., 2013;
 75 Rovirosa-Hernandez et al., 2013; Lombardi et al., 2014). The present study aimed to research
 76 trypanosomatids in non-human primates from the Municipal Zoological Park of Bauru, SP,
 77 Brazil, by means of antibodies against the parasite and by amplification of DNA from the
 78 protozoan.

79

80 **2. Material and Methods**

81 **2.1 Location of the research study**

82 The Municipal Zoological Park of Bauru is located in a tropical region, in the interior of the
 83 Brazilian state of São Paulo, in the city of Bauru, at the coordinates 22°20'28'' South latitude and
 84 49°01'18'' West longitude (Figure 1). It comprises an area of 484,000 m² that is within a savannah
 85 environment of more than 4,840,000 m², presenting an estimated number of 880 animals and 227
 86 species.

87 **2.2 Clinical exam and blood samples**

88 We used all primates representatives of the Old World and all the great primates neotropical,
 89 totaling 39 non-human primates belonged to the Municipal Zoological Park of Bauru, and were
 90 distributed among 13 different species, nine of which were New World species represented by 23
 91 individuals, and four Old World primate species with 16 specimens (Table 1). The study was
 92 approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals (CEUA/FMB nº 1103/2015) and by
 93 the System for Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO/ICMBio/MMA nº 45001-

2). For this, the animals were led to a holding area of a cage and contained with the aid of a hand net. With the use of a blowgun, the animals were anesthetized with Ketamine (10mg/kg) and sent to the surgical center of the Zoo. A brief clinical exam was performed on all of the animals, with the observation of skin lesion and alopecia; and also the observation of ocular mucosae and of the gums for verification of the presence of anemia and jaundice; the body score was analyzed to research obesity and cachexia; palpation of lymph nodes was performed in search of lymphadenopathy that would indicate possible infection; rectal temperature was measured and the body inspected for identification of lesions, fractures and the presence of ectoparasites. Blood collection procedures consisted of peripheral venous puncture and disinfection with 70% alcohol. A volume of 5mL of blood was collected from each animal. One aliquot of material was stored in vacutainer® tubes containing EDTA, for accomplishment of the molecular technique and the rest was placed into dry tubes for the obtainment of serum. The collections were performed in the second half of 2014.

2.3 Diagnostic Methods

2.3.1 The conventional Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA was extracted from blood samples by means of the commercial kit Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen® Scientific®, USA) according to the manufacturer's recommendations.

One instance of PCR was carried out to amplify the β -globulin gene to ensure the quality of amplification of the extracted DNA by utilizing the primers β -1 and β -2 (Lee et al., 2001) for all the samples, except for the genus *Papio*, which employed the primers GAPDH-F and GAPDH-R, which amplify the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene, according to Kullberg et al. (2006). The PCR procedure to research the family Trypanosomatidae, *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* was carried out under the following conditions: each 0.2mL reaction tube received PCR buffer (50mM KCl, 20mM Tris-HCl), 1.6 mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1U of Taq-polymerase (Platinum® Taq

119 DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.2µM of each primer, 1µL of tested sample and 8.3µL of
 120 ultrapure water (MIX-PCR). In this manner, each tube presented 11µL of MIX-PCR and 1µL of
 121 DNA extraction product. Amplification of the region ITS-1 (Internal Transcribed Spacer) of
 122 ribosomal DNA, to research the family Trypanosomatidae, was accomplished by analyses of the
 123 coding genes ssU rRNA and 5.8S rRNA, with the resultant products varying according to the
 124 parasite specie (El Tai et al., 2000). Also it was utilized primers that specifically amplify the
 125 kDNA from the complex *Leishmania infantum* corresponding to amplification of the segment
 126 containing the specific region of the gene 18S rDNA (Neto et al., 2012). The primers utilized for
 127 specific amplification of kDNA from the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex were those
 128 described by De Bruijn and Barker (1992).

129 Some modifications were necessary to perform PCR for researching *Leishmania amazonensis*.
 130 For this, each 0.2mL reaction tube received PCR buffer (50mM KCl, 20mM Tris-HCl), 1.6 mM
 131 MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1U of Taq-polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®),
 132 0.4µM of each primer, 1µL of the tested sample and 7.8µL of ultrapure water (MIX-PCR). Thus,
 133 each tube presented 11µL of MIX-PCR and 1µL of DNA extraction product. The primers utilized
 134 were those that amplify the kDNA from the complex *Leishmania (Leishmania) amazonensis* as
 135 described by Mimore et al. (1998).

136 **2.3.2 Electrophoresis in agarose gel**

137 The products amplified by PCR were identified by electrophoresis in 1.5% agarose gel (except
 138 for the study of *Leishmania amazonensis*, wherein the concentration was 3%). The sizes of the
 139 amplified fragments were compared visually with the molecular weight standards of the amplified
 140 products of strains of *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (L.)*
 141 *amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575) and *Leishmania (Viannia) braziliensis*
 142 (MHOM/BR/IOC/0566) utilized as positive controls. Sterile ultrapure water was utilized as the
 143 negative control.

144 2.3.3 Sequencing

145 The amplified products were purified with the aid of ExoSap (GE) – USB ExoSap – IT® (USB
146 Affymetrix, USA) according to the manufacturer’s instructions and sent for genetic sequencing
147 at the Institute of Biotechnology (IBTEC) of Paulista State University (UNESP), *campus*
148 Botucatu, São Paulo, Brazil. The sequences were aligned utilizing the program ClustalW by the
149 software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 6.0 for Windows®
150 (Tamura et al., 2011) and compared to the sequences deposited in the database NCBI (BLAST).

151 2.3.4 Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania* 152 *(L.) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*

153 Promastigote forms of *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonenses* and *Leishmania*
154 *braziliensis* were utilized as antigens. The parasites were obtained from the Collection of
155 *Leishmanias* from Oswaldo Cruz Institute – CLIOC/FIOCRUZ. Each slide was sensitized with
156 the antigen. The specific conjugate containing anti-antibody IgG monkey (IgG – γ -chain specific
157 - SAB3700765 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) was utilized, establishing a cutoff point for
158 the screening of positive animals starting from a dilution of 1:40. The IFAT technique was carried
159 out according to the description of Camargo (1966).

160

161 3. Results

162 3.1 Clinical exam

163 During a brief clinical exam of the animals, only one of them presented alopecia, another weight
164 loss and a third generalized body lesions. Despite having observed such clinical signs, not all the
165 animals presented clinical signs and none presented more than one of these signs.

166 3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) – region ITS-1 and kDNA

167 Of the 39 primate blood samples submitted to PCR to research the family Trypanosomatidae, 38
168 (97.4%) were positive, presenting approximately 250pb. Only the single representative of the
169 specie *Papio papio* was not positive. The 39 samples submitted to PCR to obtain species-specific
170 data on *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* were all
171 negative.

172 3.3 Sequencing

173 The data on nucleotide sequences reported in this article are available in the database GenBank™,
174 and demonstrated similarity with the genus *Trypanosoma* spp. (Access number: KC196658.1;
175 KU552356.1; JN673388.1) for the 37 samples positive for the family Trypanosomatidae, except
176 one primate sample from the specie *Alouatta caraya*, where the result of sequencing did not find
177 similarity.

178 3.4 Immunofluorescence Antibody Test (IFAT)

179 Five of the 39 animals in the study presented insufficient serum for the performance of the
180 serological test. Therefore, of the 34 animals tested, one serum sample (2.9%) from an animal of
181 the specie *Erythrocebus patas* was reactive to *Leishmania braziliensis* with a titer of 160.

182

183 4. Discussion

184 Added to the fact that the city of Bauru, in the state of Sao Paulo, Brazil, is considered a region
185 endemic for visceral leishmaniasis (Coiro et al., 2013), 16 cases have been reported in humans
186 within the municipality in 2015 (Bauru, 2016), wild mammals can be infected naturally by
187 protozoa of the genus *Trypanosoma* and *Leishmania*. Some neotropical primate species are
188 subject to different infections that are also common in humans, principally infections caused by
189 *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. (Roviroso-Hernandez et al., 2013).

190 Although dogs are considered the main urban reservoir of visceral leishmaniasis, diverse species
191 of mammals that live in zoos, yet they were diagnosed with the parasite, especially in zoos in
192 tropical regions, located in an area endemic for the disease (Souza et al., 2014).

193 The finding of a high percentage (94.9%) of animals positive in this study for *Trypanosoma* spp.
194 demonstrates that the site is highly endemic. However, given that the majority of the animals were
195 found to be healthy, it may be suggested not only that the protozoa present in the samples might
196 not be pathogenic to the primates but also that *Trypanosoma rangeli* may be non-pathogenic to
197 humans (Basso et al., 2007).

198 Although not pathogenic to primates, the trypanosomes present in the samples from the study
199 may parasitize other animals in the Zoological Park, and can present pathogenicity and also
200 provoke atypical human infections (Truc et al., 2013). Given the improvement in diagnostic
201 techniques, in particular in molecular tests, it has become possible to identify trypanosomes in
202 animals, which may lead to atypical infections in humans, as in the case of *Trypanosoma vivax*
203 (Hoare, 1972).

204 The elevated number of animals positive for trypanosomes may be indicative of the presence of
205 triatomines that feed upon the blood of primates, as well as the possibility of horseflies and flies
206 of the specie *Stomoxys calcitrans*, which are hematophagous insects capable of transmitting
207 trypanosomes, such as *T. vivax*; it should be noted that in South America, *T. vivax* is only
208 transmitted mechanically by hematophagous flies (Davila et al, 2003).

209 Everything indicates that the only animal reactive to *Leishmania braziliensis*, a primate of the
210 specie *Erythrocebus patas*, entered into contact with the agent in the city of Bauru, since this
211 primate was born in the zoo of the present study, which serves as a warning sign of possible
212 sandflies at the site and of the possibility that other animals living in captivity in this zoo have
213 had contact with the parasite or may yet become infected. The same animal was not positive by
214 the PCR molecular test, since the case may involve a chronic infection as indicated by the animal's
215 presentation of immunoglobulin G (IgG), which prevented the detection of parasite DNA in its
216 blood.

217 At the Municipal Zoological Park of Bauru, the enclosures holding the neotropical primates have
 218 concrete walls only in the back, with the lateral and frontal portions presenting steel grids. Such
 219 grids contain openings that permit the sandflies to circulate freely between the interior and
 220 exterior spaces of the enclosures. Yet the location of the Old World primates, despite presenting
 221 glass in the frontal portions and concrete in the lateral, the roof continues to be protected only by
 222 grids, permitting the flow of vector insects. At dusk and at night, when the sandflies present
 223 greater activity (Rivas et al., 2014), all the primates remain in the holding area, a location
 224 protected by grids. Likewise, other hematophagous vectors, such as triatomines and stable flies,
 225 may be circulating in the zoo environment, enabling the presence de trypanosomes. Episodes of
 226 trypanosomiasis verified in several regions of the Brazilian territory occur when an animal
 227 carrying parasitemia is introduced, a population of vectors sufficient to effect the transmission
 228 and animals susceptible to infection.

229 The zoological park is situated in a savannah region characterized by an accumulation of organic
 230 material in different stages of decomposition originating from vegetation itself (Dematte and
 231 Dematte, 1993). The local also presents conditions appropriate for the development of sandflies,
 232 such as amenable temperatures and humidity, ideal factors for their proliferation (Killick-
 233 Kendrick, 1999). Furthermore, the savannah vegetation provides for the maintenance of
 234 triatomines and other vectors, which can dwell primarily in palm trees, tree barks and bird nests
 235 (Diotaiuti et al, 1993).

236 The programs related to the “Convention on the International Trade in Threatened Fauna and
 237 Flora Species”, whose list presents all the neotropical primates, frequently include exchanges,
 238 translocations and reintroductions of animals into a new environment without first conducting a
 239 survey on its parasitic load, which may include trypanosomatids. Many of the scientific findings
 240 demonstrate that primates can be infected naturally by diverse species of *Leishmania* and
 241 *Trypanosoma* and can be involved in maintaining the parasite in nature (Roque and Jansen et al.,
 242 2014). Taken together, the protozoan transmission cycle coupled with the scarcity of knowledge
 243 on the health state of the primates, which are frequently reallocated, can result in the introduction

244 of infected animals into a new area, enabling the establishment of new transmission cycles of
245 diseases (Lisboa et al., 2006), as is the case in some primates that were introduced into the
246 Zoological Park in Bauru, coming from nature in diverse regions of Brazil, or even those that
247 lived in other zoos and were reallocated to the Bauru zoo.

248 A combination of serological techniques that aim to identify specific antibodies against the
249 parasite (Ferrer et al., 1995) and of a molecular technique that amplifies specific DNA fragments
250 of the protozoan can be employed in a variety of biological samples (Ikonomopoulos et al., 2003),
251 including wild species as is the case of primates. However, the detection of parasite DNA in
252 samples from wild animals is highly dependent on the parasite load in the blood of the animal
253 (Tenorio et al., 2014). The molecular technique for researching the protozoan in the blood of these
254 animals tends not to detect many parasites, since in the case of wild animals, the parasite load is
255 low (Jusi et al., 2011), besides the presence of inhibitors that prejudice the results of molecular
256 tests. Added to this, samples from wild animals, that are possibly co-infected with more than one
257 pathogenic species, when submitted to genetic sequencing, the sequences can be confused,
258 skewing the results. The low similarity found in the sequencing from the present study, may be
259 in relation to sequences not deposited in the GenBank®, so that our results are consistent with the
260 data already deposited in the database. However, in the case of primates in captivity, it would be
261 unfeasible to perform more robust molecular tests, from biopsies or from spinal puncture, since
262 animals that live in zoos are protected by environmental laws and cannot be submitted to surgical
263 techniques and / or invasive procedures, as would be the case in the present study. Therefore, the
264 association of serological and molecular techniques aid in the diagnosis of protozoan infections,
265 especially in endemic areas (Gramiccia et al., 2005).

266 In this study, the majority of animals did not present clinical signs characteristic of leishmaniasis
267 and trypanosomiasis, which occurs commonly since a large proportion of the infected animals
268 cannot present clinical signs compatible with the disease, even after a long period of incubation.
269 These animals are considered asymptomatic, but with the possibility of acting as reservoirs of the

270 parasite and if there are vectors in this same environment, with probable transmission of the
 271 disease to other animals in the zoo, to their caretakers and to visitors.

272

273 5. Conclusion

274 The results of this study enable the conclusion that zoos in tropical regions are highly susceptible
 275 to a large circulation of trypanosomatids, given that most of the animals in the study were positive
 276 in the molecular test for *Trypanosoma* spp. and one animal serologically reactive to *Leishmania*
 277 *braziliensis*. Thus, it can be inferred that animals from zoos placed in an environment where the
 278 presence of vectors is common are susceptible to infection by different zoonotic agents, such as
 279 trypanosomes and leishmanias, therefore necessitating frequent exams in such zoo animals and
 280 the need for active search for sandfly vectors, triatomines in the grounds and surrounding areas,
 281 as a preventive measure for the risk of infection for staff and visitors.

282

283 Acknowledgements

284 To Sao Paulo Research Foundation - FAPESP Process nº 2014/12187-0 for financial support and
 285 the veterinary physician Maria Emília Bodini Santiago, from Municipal Zoological Park of Bauru.

286

287 References

288 Alexander, B., Lozano, C., Barker, D.C., Mccann, S.H.E., Adler, G.H., 1998. Detection of
 289 *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations
 290 by PCR and DNA Hybridization. Acta Trop. 69, 41-50.

291 Arcadi, S.A., Rago, M.V., Liotta, D.J., Fernandez-Duque, E., Salomón, O.D., 2013. *Leishmania*
 292 (*Viannia*) DNA detection by PCR_RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus*
 293 *azarai azarai*) from Formosa, Argentina. Vet. Parasitol. 193, 256-259.

- 294 Basso, B., Castro, I., Introini, V., Gil, P., Truyens, C., Moretti, E., 2007. Vaccination with
 295 *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with
 296 *Trypanosoma cruzi*. Vaccine. 25, 3855-3858.
- 297 Bauru, 2016. Bauru confirma novo caso de leishmaniose referente a 2015. Disponível em:
 298 <http://www.bauru.sp.gov.br/materia.aspx?n=22580>. Acesso em: 25 Mar 2016.
- 299 Camargo, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American
 300 trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma*
 301 *cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 8, 227-234.
- 302 Coiro, C.J., Silva, R.C., Langoni, H., 2013. Utilização do kDNA PCR no diagnóstico molecular
 303 de Leishmanioses/using kDNA PCR for the molecular diagnosis of Leishmaniasis. Ars Vet. 29,
 304 86.
- 305 Dávila, A.M.R., Majiwa, P.A.O., Grisard, E.C., Aksoy, S., Melville, S.E., 2003. Comparative
 306 genomics to uncover the secrets of tsetse and livestock-infective trypanosomes. Trends Parasitol.
 307 19, 436-439.
- 308 De Bruijn, M.H.L., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection
 309 of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta
 310 Trop. 52, 45-58.
- 311 Dematte, J.L.I., Dematte, J.A.M., 1993. Comparações entre as propriedades químicas de solos
 312 das regiões da floresta Amazônica e do cerrado do Brasil Central. Sci. Agric. 50, 272-286.
- 313 Diotaiuti, L., Loiola, C.F., Falcão, P.L., Dias, J.C.P., 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in
 314 natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. Rev. Inst. Med.
 315 Trop. São Paulo. 35, 237-245.
- 316 El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G., 2000. Genetic heterogeneity
 317 of ribosomal internal transcribed space in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on

- 318 filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R
319 Soc Trop Med Hyg. 94, 575-579.
- 320 Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X., Portus, M., 1995. Serological diagnosis and treatment of canine
321 leishmaniasis. Vet. Rec. 136, 514-516.
- 322 Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to
323 disease control. Int. J. Parasitol. 35, 1169-1180.
- 324 Hoare, C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals: a Zoological Monograph. Blackwill
325 Scientific Publications, Oxford, 769 pp.
- 326 Ikonomopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G., 2003.
327 Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic
328 methods and the proposed assay on clinical samples. Vet. Parasitol. 113, 99-103.
- 329 Jordan, A. M., 1974. Recent developments in the ecology and methods of control of tsetse flies
330 (*Glossina* spp.) (Dipt., Glossinidae) – A review. Bull Entomol Res. 63, 361-399.
- 331 Jusi, M.M.G., Starke-Buzetti, W.A., Oliveira, T.M.F.S., Tenório, M.S., Souza, L.O., Machado,
332 R.Z., 2011. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from
333 Ilha Solteira, SP, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20, 219-222.
- 334 Kato, H., Cáceres, A.G., Hashiguchi, Y., 2016. First evidence of a hybrid of *Leishmania* (*Viannia*)
335 *braziliensis*/*L. (V.) peruviana* DNA detected from the Phlebotomine sand fly *Lutzomyia tejadaei*
336 in Peru. Plos Negl. Trop. Dis. 10, e000436.
- 337 Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol.
338 17, 279-289.
- 339 Kullberg, M., Nilson, M.A., Arnason, U., Harley, E.H., Janke, A., 2006. Housekeeping Genes for
340 Phylogenetic Analysis of Eutherian Relationships. Mol Bio Evol. 23, 1493-1503.

- 341 Lee, C.N., Cavanagh, H.M., Lo, S.T., Nq, C.S., 2001. Human papillomavirus infection in non-neoplastic
342 uterine cervical disease in Hong Kong. Br. J. Biomed. Sci. 58, 85-91.
- 343 Lima, V.M., Santiago, M.E., Sanches, L.C., Lima, B.D., 2012. Molecular diagnosis of
344 *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. J. Zoo. Wildl.
345 Med. 43, 943-945.
- 346 Lisboa, C.V., Mangia, R.H., Luz, S.L.B., Kluczkovski Jr., A., Ferreira, L.F., Ribeiro, C.T.,
347 Fernandes, O., Jansen, A.M., 2006. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II.
348 Parasitology. 133, 603-611.
- 349 Lombardi, M.C., Turchetti, A.P., Tinoco, H.P., Pessanha, A.T., Soave, S.A., Malta, M.C.C.,
350 Paixão, T.A., Santos, R.L., 2014. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase
351 Chain Reaction in wild mammals. Pesqui. Vet. Bras. 34, 1243-1246.
- 352 Longoni, S.S., López-Cespedes, A., Sánchez-Moreno, M., Bolio-Gonzalez, M.E., Sauriarceo,
353 C.H., Rodríguez-Vivas, R.I., Marín, C., 2012. Detection of different *Leishmania* spp. and
354 *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron
355 superoxide dismutase excreted as antigen. Comp. Immunol. Microb. Infect. Dis. 35, 469-476.
- 356 Malta, M.C., Tinoco, H.P., Xavier, M.N., Vieira, A.L., Costa, E.A., Santos, R.L., 2010. Naturally
357 acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet. Parasitol. 169, 193-197.
- 358 Mimori, T., Sasaki, J., Nakata, M., Gomez, E.A., Uezato H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., Furuya,
359 M., Saya, H., 1998. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy
360 samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. Gene. 210, 179-186.
- 361 Minuzzi-Souza, T.T.C., Nitz, N., Knox, M.B., Reis, F., Hagström, L., Cuba-Cuba, C.A., Hecht,
362 M.M., Gurgel-Gnçalves, R., 2016. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among
363 captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. Parasite Vector. 9, 1-6.

- 364 Neto, O.J.S., Duarte, S.C., Costa, H.X., Linhares, G.F.C., 2012. Design of primer pairs for
365 species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. Rev. Bras.
366 Parasitol. Vet. 21, 304-307.
- 367 Njiokou, F., Simo, G., Nkinin, S.W., Laveissière, C., Herder, S., 2004. Infection rate of
368 *Trypanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. congolensis* “forest type”, and *T. simiae* in small wild
369 vertebrates in South Cameroon. Acta Trop. 92, 139-146.
- 370 Podlipaev, S., 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse
371 Trypanosomatidae appears. Inst. J. Parasitol. 31, 648-652.
- 372 Rivas, G.B., De Souza, N.A., Peixoto, A.A., Bruno, R.V., 2014. Effects of temperature and
373 photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Parasite
374 Vector. 7, 9.
- 375 Roque, A.L.R., Jansen, A.M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in
376 the Americas. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 3, 251-262.
- 377 Roviroso-Hernández, M.J., Cortes-Ortíz, L., García-Orduña, F., Guzmán-Gómez, D., López-
378 Monteon, A., Caba, M., Ramos-Ligonio, A., 2013. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and
379 *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico. Am. J. Primatol.
380 75, 16-19.
- 381 Silveira, F.T., Lainson, R., Shaw, J.J., Garcez, L.M., Souza, A.A., Braga, R.R., Ishikawa, E.A.,
382 1990. Leishmaniose cutânea experimental: II-aspectos evolutivos da infecção no primata *Cebus*
383 *apella* (Cebidae) pela *leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Rev. Soc. Bras. Med.
384 Trop. 23, 5-12.
- 385 Silveira, A.C., 2000. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. Cad
386 Saúde Pública, Rio de Janeiro. 16, 35-42.

- 387 Souza, T.D., Turchetti, A.P., Fujiwara, R.T., Paixão, T.A., Santos, R.L., 2014. Visceral
388 leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet. Parasitol.* 200, 233-241.
- 389 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. Mega5: molecular
390 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum
391 parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- 392 Tenório, M.S., Oliveira e Souza, L., Alves-Martin, M.F., Paixão, M.S., Rodrigues, M.V., Starke-
393 Buzetti, W.A., Araújo Junior, J.P., Lucheis, S.B., 2014. Molecular identification of
394 trypanosomatids in wild animals. *Vet. Parasitol.* 203, 203-206.
- 395 Tielens, A.G.M., Van Hellemond, J.J., 1998. Differences in energy metabolism between
396 Trypanosomatidae. *Parasitol. Today.* 14, 265- 271.
- 397 Truc, P., Büscher, P., Cuny, G., Gonzatti, M.I., Jannin, J., Joshi, P., Juyal, P., Zhao-Rong, L.,
398 Mattioli, R., Pays, E., Simarro, P.P., Teixeira, M.M.G., Touratier, L., Vincendeau, P.,
399 Desquesnes, M., 2013. Atypical human infections by animal trypanosomes. *PloS Negl. Trop. Dis.*
400 7, 1-7.
- 401 Vickerman, K., 1976. Diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W.H.R.,
402 Evans, D.S. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, pp. 1-34.
- 403 Ziccardi, M., Lourenço-Oliveira, R., Laison, R., Brígido, M.C.O., Muniz, J.A.P.C., 2000.
404 Trypanosomes os non-human primates from the National Centre of Primates,
405 Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95, 157-159.

Table 1. Species utilized in the study.

Scientific Name	Popular Name	Nº of specimens
New World Primates		
<i>Alouatta belzebul</i>	Red-handed howler monkey	2
<i>Alouatta caraya</i>	Black howler monkey	5
<i>Alouatta fusca</i>	Brown howler monkey	1
<i>Alouatta seniculus</i>	Venezuelan red howler monkey	2
<i>Ateles chamek</i>	Black-faced spider monkey	3
<i>Ateles marginatus</i>	White-cheeked spider monkey	3
<i>Ateles paniscus</i>	Red-faced spider monkey	2
<i>Cebus albifrons</i>	White-fronted capuchin monkey	2
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Woolly monkey	3
Old World Primates		
<i>Erythrocebus patas</i>	Patas monkey	3
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	4
<i>Papio hamadryas</i>	Hamadryas baboon	8
<i>Papio papio</i>	Guinea baboon	1
Total		39

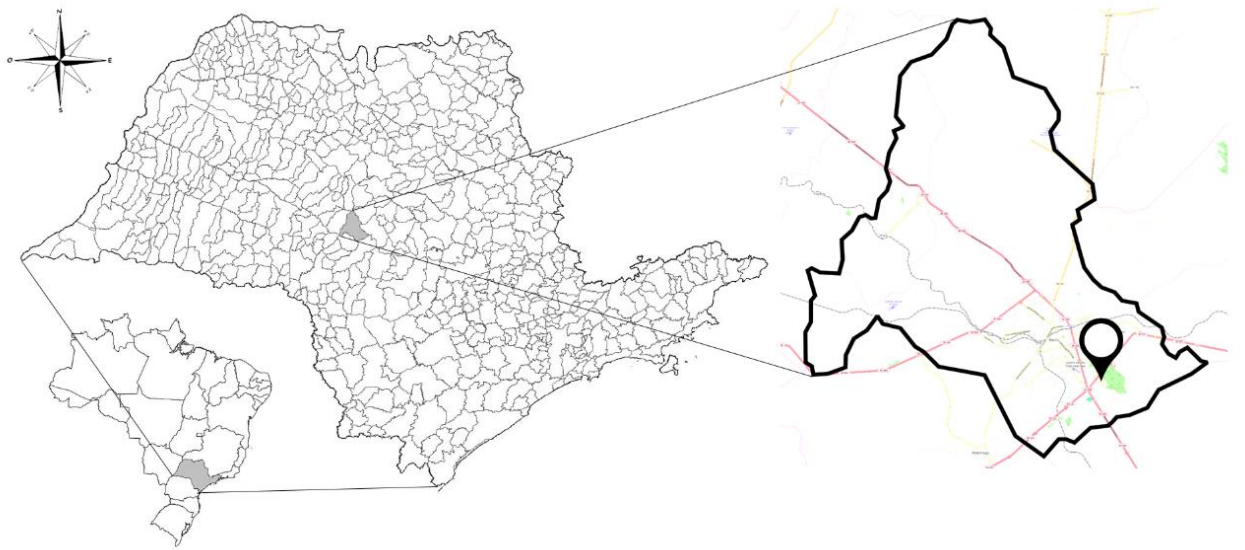


Figure 1: Location of the Municipal Zoological Park of Bauru, São Paulo, Brazil.

Conclusão

CONCLUSÃO

O teste molecular demonstrou um grande número de primatas infectados com *Trypanosoma* spp. no Parque Zoológico Municipal de Bauru, bem como um primata sorologicamente positivo para *Leishmania braziliensis*, revelando a necessidade de vigilância entomológica no local, sugerindo-se a instalação de armadilhas luminosas para captura de flebotomíneos, busca ativa de triatomíneos e controle de moscas hematófagas; além de telas adequadas nos recintos que evitem o acesso de vetores aos animais.

Anexos

Anexo 1**Autorização da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).**

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
CERTIFICADO Nº 1103/2015-CEUA			
CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1103/2014) Pesquisa de Leishmaniose Tegumentar e Visceral em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP, a ser conduzido por Livia Maísa Guiraldi, orientada pela Profª Drª Simone Baldini Luchies, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "primatas não-humanos" são provenientes do Parque Zoológico Municipal de Bauru.			
CERTIFICAMOS que foi autorizada a utilização de "42 primatas não-humanos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 05/03/2015			
 Prof. Adjunto Katashi Okoshi Presidente da CEUA		 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br			

Anexo 2**Autorização SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).****Número: 45001-2.**

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45001-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:39	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: PESQUISA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Deteção de Leishmania spp. em primatas não-humanos por meio de técnicas sorológicas e moleculares	08/2014	08/2016

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Livia Maisa Guiraldi	Coleta e análise de material biológico	406.416.818-60	485291083 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BAURU	SP	Parque Zoológico Municipal de Bauru	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

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

Código de autenticação: 89685117

Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45001-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:39	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: PESQUISA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus nigrifrons, Ateles marginatus, Erythrocebus patas, Alouatta seniculus, Callicebus personatus, Cebus albifrons, Ateles chamek, Lagothrix lagotricha, Alouatta caraya, Alouatta fusca, Papio hamadryas, Alouatta belzebul, Mandrillus sphinx, Ateles paniscus, Papio papio
---	--	---

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Captura manual, Puçá

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	

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

Código de autenticação: 89685117



Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45001-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:39	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: PESQUISA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 89685117



Página 3/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45001-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:39	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: PESQUISA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 89685117



Página 4/4

Anexo 3

Extração de DNA para pesquisa de família Trypanosomatidae, *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* de acordo com o protocolo do Kit comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen® Scientific®, USA)

As amostras em microtubos foram descongeladas sob refrigeração em *cooler*. Acrescentou-se em microtubos de 1,5mL livres de DNAsas e RNAsas, 500µL de Buffer AP1 (Tampão de lise celular) e 200µL das amostras biológicas, e foram homogeneizados em agitador por 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 100µL de Buffer AP2 (Tampão de esgotamento de proteína) e novamente homogeneizou-se em agitador por 10 segundos. Centrifugou-se por 20 minutos a 12.000rcf para que houvesse a decantação dos detritos. A seguir, o sobrenadante foi pipetado e transferido para a coluna dentro do tubo coletor do Kit comercial que foi utilizado. Centrifugou-se a 12.000rcf durante 1 minuto. Logo após, desprezou-se o líquido do tubo coletor, voltou-se a coluna a ele e adicionou-se 700µL de Buffer W1A (Tampão de lavagem) deixando descansar em temperatura ambiente por 2 minutos. Foi centrifugado a 12.000rcf durante 1 minuto. Novamente, desprezou-se o líquido do tubo coletor e adicionou-se à coluna 800µL de Buffer W2 (Tampão de dessalinização) e centrifugou-se a 12.000rcf por 1 minuto. Desprezou-se o líquido do tubo coletor e adicionou-se 500µL de Buffer W2 à coluna, sendo centrifugado a 12.000rcf durante 1 minuto. Desprezou-se o líquido do tubo coletor e retornou-se a coluna a ele, centrifugando a 12.000rcf por 1 minuto. O tubo coletor foi desprezado juntamente com o sobrenadante e a coluna colocada em microtubos de 1,5mL livres de DNAsas e RNAsas, onde foi adicionado 100µL de Buffer TE previamente aquecido à 65 °C, deixando repousar em temperatura ambiente por 1 minuto. A seguir foi centrifugado a 12.000rcf por 1 minuto, obtendo-se a amostra de DNA a qual foi armazenada à -20 °C para posterior realização da PCR para pesquisa de família Trypanosomatidae, *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Anexo 4

Quantificação de DNA das amostras

Para verificar a quantidade de DNA presente em cada amostra, todas foram submetidas ao aparelho de quantificação (Quantificador Biotech Epoch®) do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz, Regional, Bauru. Para tanto, calibrou-se o aparelho de quantificação utilizando-se 2µL de água ultrapura nas cavidades indicadas. Após calibração realizada pelo Software Gen 5 2.03, acrescentou-se 2µL de cada amostra de DNA extraído e acionou-se a leitura pelo Software para obtenção dos resultados, ou seja, da quantidade de DNA de cada amostra.

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda eletromagnética equivalente à 260nm, enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância $^{260}_{/280}$. Nesta reação, valores entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas².

² Silveira, M. C. A. Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais. 94 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Tocantins. 2010.

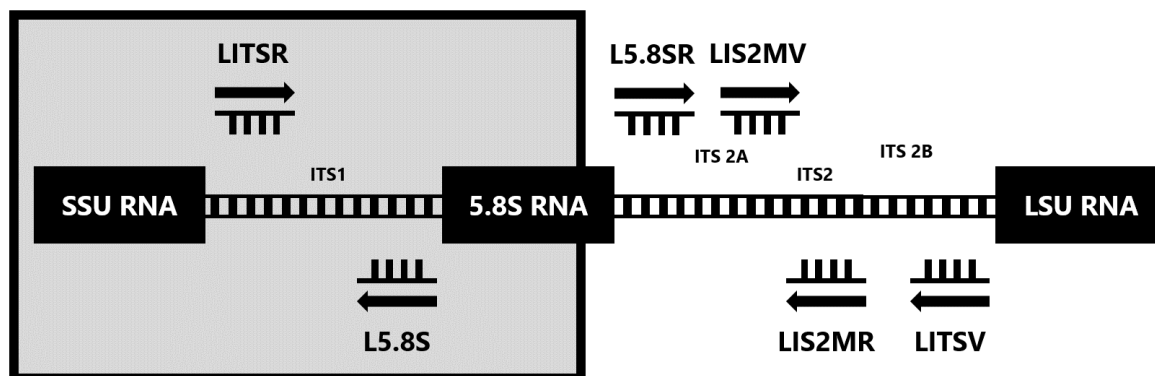
Anexo 5

Eletroforese em gel de agarose

Foram homogeneizados 10µL das amostras amplificadas com 2µL da solução de azul de bromofenol e submetida a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% (exceto para pesquisa de *Leishmania amazonensis* onde a concentração foi de 3%), corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) 0,1µL/mL, em cuba horizontal (Labnet Enduro Gel XL) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A agarose foi dissolvida em TBE previamente aquecido e o material distribuído de forma uniforme na cuba horizontal. A tensão elétrica utilizada foi de 60V por 20 minutos, seguido de 100V por 30 minutos. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen) ou LowRanger 50bp DNA Ladder (Norgen) (para *Leishmania amazonensis*) e utilizados como controles positivos produtos amplificados das cepas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/IOC/L0575) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) mantidas sob cultivo em meio NNN-LIT em estufa B.O.D. a 25°C e repicadas quinzenalmente e como controles negativos, água ultrapura estéril. O tamanho dos fragmentos amplificados, foram verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com as cepas padrão utilizadas como controles positivos utilizando-se o Transluminador Syngene.

Anexo 6

Amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal com a utilização dos *primers* LITSR e L5.8S



Anexo 6: Representação do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal. A demarcação no esquema, representa a região ITS-1. Fonte: El Tai et al³

³ EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed space in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transaction Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene, v.94, p. 575-579, 2000.

Anexo 7

Purificação das amostras para realização do sequenciamento genético. Protocolo de acordo com as recomendações do kit GF xTM PCR- DNA and Gel Band Purification®.

A purificação das amostras foi realizada a partir da banda no gel de agarose. Para tanto, com o auxílio de um bisturi estéril, a banda foi recortada e inserida em microtubo de 1,5mL. Pesou-se o microtubo vazio e após inserir a banda do gel, realizou-se novamente pesagem e subtraiu-se os valores de peso antes da colocação do gel (microtubo vazio) e após colocação do gel (microtubo cheio). Para cada 10mg de gel, adicionou-se 10µL de tampão de captura (Tipo 2) para a desnaturação e solubilização. Homogeneizou-se em agitador por 1 minuto e por inversão durante 15 segundos. Esse passo foi repetido três vezes. Incubou-se durante 10 minutos à 60°C em banho seco para que a agarose se dissolvesse. Durante este processo de incubação, inseriu-se a coluna dentro do tubo coletor (fornecidos pelo kit). Após totalmente dissolvida, centrifugou-se à 8.000rpm por 30 segundos. Transferiu-se todo o conteúdo (tampão de captura acrescido da amostra) para a coluna juntamente ao tubo coletor e incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, centrifugou-se à 12.000rpm durante 30 segundos. Descartou-se o líquido do tubo coletor e retornou-se a coluna para dentro dele. Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem (Tipo 1) à coluna que estava dentro do tubo coletor. Novamente, centrifugou-se a 12.000rpm por 30 segundos. Desprezou-se o tubo coletor juntamente com o líquido que estava em seu interior e transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5mL. Adicionou-se 50µL de Tampão de Eluição (Tipo 6) e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Em seguida, centrifugou-se à 12.000rpm durante 1 minuto para recuperação do DNA purificado e estocou-se em *freezer* à -20 °C. A realização do sequenciamento genético foi pelo Instituto de Biotecnologia - Unesp/Botucatu (IBTEC).

Anexo 8

Purificação dos *amplicons* para realização do sequenciamento genético, com o uso da Enzima ExoSap (GE) – USB ExoSap – IT® (USB Affymetrix, USA).

A ExoSAP-IT® é composta por enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a alcalina fosfatase de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Enquanto a exonuclease I remove os resíduos de *primer* na solução, a SAP é responsável por quebrar as bases (DNTPs) que não se ligaram durante a PCR.

Em microtubo de 0,2mL acrescentou-se 4µL da enzima ExoSAP-IT® e 10µL do produto da PCR. Os microtubos foram encaminhados ao termociclador e submetidos ao perfil de ciclagem de acordo com o protocolo do fabricante:

37 °C - 1 hora

80 °C - 15 min.

Após a ciclagem em termociclador, realizou-se a quantificação do DNA das amostras. Se a quantificação apresentasse valores altos (superior a 200ng/µL), acrescentava-se água mili-Q e realizava-se nova quantificação. Em microtubos de 0,2mL livres de DNAsas e RNAsas acrescentou-se 5µL de cada um dos *primers*, (*Sense* (F) e *Anti-sense* (R)), sendo que cada primer estava na concentração de 5pmol/µL. Em cada tubo de *primers* (F) e (R) acrescentou-se 10µL da amostra. Estocou-se em temperatura ambiente até a realização do sequenciamento. O sequenciamento genético foi pelo Instituto de Biotecnologia - Unesp/Botucatu (IBTEC).

Anexo 9

Sensibilização das lâminas para realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As lâminas armazenadas em álcool 70% foram secas e mantidas protegidas de impurezas durante 24 horas. As culturas com os antígenos de interesse (*Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*) mantidas em tubos rosqueados contendo 10mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e 5 mL de meio NNN (Novy, Mc Neal, Nicolle) foram aliquotadas e observadas em microscópio óptico em aumento de 40X para avaliação de quantidade e motilidade das formas promastigotas da *Leishmania*. Acrescentou-se em tubos de plástico rosqueados (*Falcon*) 5mL da cultura. Em seguida, centrifugou-se a 3.000 rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e completou-se com quantidade suficiente para (qsp) 5mL de PBS pH 7,2. Homogeneizou-se em agitador por 10 segundos e centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos. Novamente descartou-se o sobrenadante, completou-se com PBS pH 7,2 e homogeneizou-se no agitador por 10 segundos. Centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e homogeneizou-se em agitador por 10 segundos. Visualizou-se em microscopia com aumento de 40X a quantidade, em média, de 40 promastigotas por campo. Caso essa quantidade estivesse muito acima do ideal, acrescentou-se aos poucos 50µL de PBS pH 7,2, homogeneizando em agitador por 10 segundos até obtenção da quantidade desejada. As lâminas de RIFI são compostas de duas fileiras de seis cavidades. Preencheu-se todas as cavidades (delimitações circulares) da lâmina de RIFI com 10µL do concentrado de antígeno. Após 3 minutos de fixação do antígeno, o concentrado foi aspirado e as lâminas deixadas em temperatura ambiente por 1 hora. Após sensibilização, foram guardadas em caixas porta-lâmina e armazenadas em freezer a -20 °C.

Anexo 10

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) - Camargo (1966)⁴.

Foram utilizadas microplacas para realização da diluição inicial de 190µL de solução salina tamponada (SST) 0,01M com pH 7,2 e 10µL do soro das amostras para a diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Distribuiu-se 100µL dessa primeira diluição em 100µL de solução de PBS (phosphate-buffered saline) para obtenção da diluição de 1:40 (segunda diluição), que foi utilizada na triagem da reação. As lâminas já fixadas com o antígeno de interesse (*L.infantum (syn.chagasi)*, *L.amazonensis* e *L.braziliensis*), distribuiu-se 10µL de soro diluído (segunda diluição), e incubou-se a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se as duas lavagens das lâminas com STS 0,01M, pH7,2 por 10 minutos e em seguida foram secas em estufa. Foi utilizado o conjugado específico contendo Anti-Anticorpo IgG de macaco (IgG – γ -chain specific - SAB3700765 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), diluído em solução de Azul de Evans a 20%. O conjugado foi testado segundo as diluições: 1:400; 1:425; 1:450; 1:475; 1:500; 1:525; 1:550; 1:575 e 1:600. Estabeleceu-se como ponto de diluição 1:500, no qual o controle positivo brilhou emitindo imunofluorescência na coloração verde e o negativo não. Foi distribuído 10µL do conjugado para cada diluição e incubou-se novamente em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Lavou-se novamente por duas vezes com PBS 0,01M pH7,2 por 10 minutos e secas em estufa. As lâminas foram montadas utilizando-se glicerina tamponada pH 8,5 e cobertas com lamínulas de 24x60mm. Foram examinadas em microscópio de imunofluorescência no aumento de 40X. Iniciou-se a leitura das amostras dos soros. Foram considerados positivos as amostras de soro com titulação igual a 1:40. Os soros positivos nessa diluição, foram avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) afim de se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* nos primatas.

⁴ CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo, v. 8, p. 227-234, 1966.

Apêndices

Apêndice 1



Figura 1: Vista da entrada do Parque Zoológico Municipal de Bauru, Estado de São Paulo, Brasil. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 2

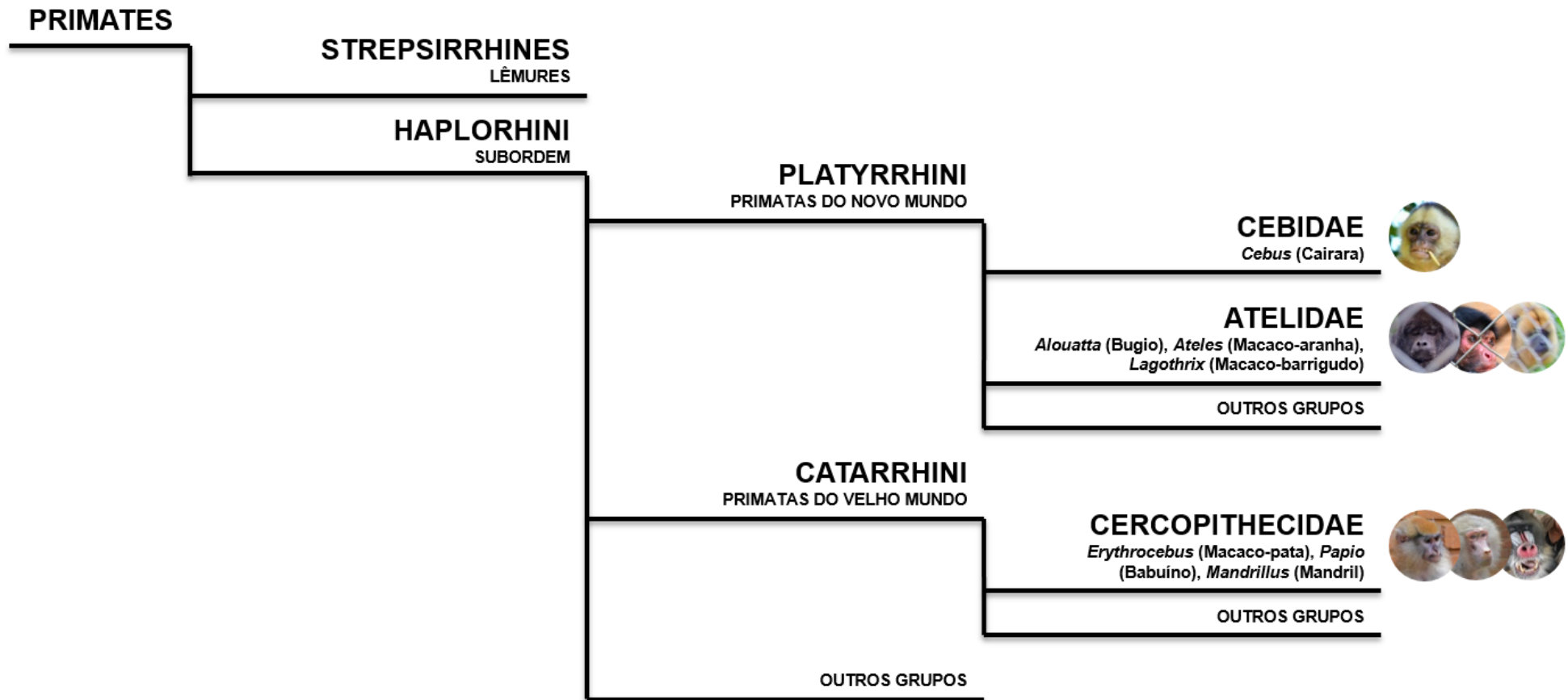


Figura 2: Clado simplificado das relações filogenéticas dos primatas do estudado. Todos as nove espécies de primata do Novo Mundo estão agrupadas em duas famílias, enquanto as quatro espécies de primatas do Velho Mundo estão em uma única família. As distâncias entre os galhos do clado não indicam a idade entre os grupos a partir de um ancestral comum, servindo apenas para ilustração de parentesco. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 3**Tabela 1: Sexo e origem dos primatas do Parque Zoológico Municipal de Bauru.**

Primata	Sexo	Origem (data de entrada)
<i>Alouatta belzebul</i>		
01	F	Norte do Brasil (2006)
02	M	Santarém, PA (2013)
<i>Alouatta caraya</i>		
03	M	Desconhecido (2005)
04	M	Ribeirão Preto, SP (2002)
05	M	NZ
06	F	NZ
07	F	Ribeirão Preto, SP (2002)
<i>Alouatta fusca</i>		
08	F	SP (2002)
<i>Alouatta seniculus</i>		
09	M	Norte do Brasil (2001)
10	F	RO (2006)
<i>Ateles chamek</i>		
11	F	RR (2011)
12	F	Desconhecido (2007)
13	M	Centro-Oeste do Brasil (2007)
<i>Ateles marginatus</i>		
14	M	Santarém, PA (2004)
15	F	SP (2012)
16	F	Santarém, PA (2004)
<i>Ateles paniscus</i>		
17	M	Norte do Brasil (2007)
18	F	Norte do Brasil (2007)
<i>Cebus albifrons</i>		
19	F	Desconhecido (2005)
20	M	Desconhecido (2005)
<i>Erythrocebus patas</i>		
21	F	NZ
22	F	NZ
23	M	SP (2013)
<i>Lagothrix lagotricha</i>		
24	M	Norte do Brasil (2008)
25	F	Norte do Brasil (2007)
26	F	Norte do Brasil (2007)
<i>Mandrillus sphinx</i>		
27	M	PR (2006)
28	F	NZ
29	F	NZ
30	M	SC (2013)
<i>Papio hamadryas</i>		
31	F	NZ
32	M	NZ
33	F	NZ
34	F	NZ

35	F	NZ
36	M	NZ
37	F	NZ
38	M	NZ
<i>Papio papio</i>		
39	F	Desconhecido (1999)

M = macho; F = fêmea; NZ = nascido no zoológico de Bauru.

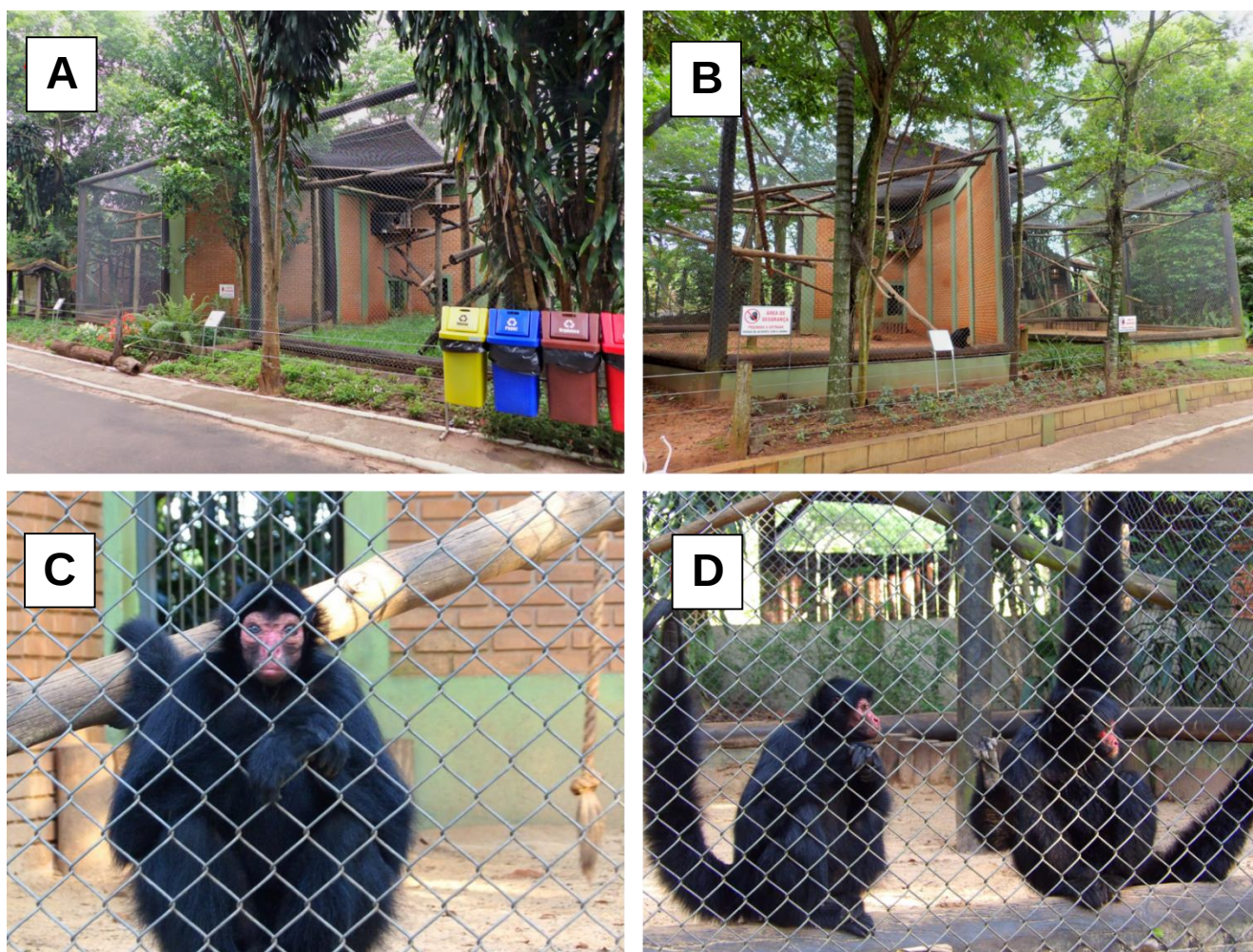
Apêndice 4

Figura 4: Em A e B, recinto dos primatas locado em uma região de cerrado característico da região. Em C e D, primatas da espécie *Ateles paniscus*. O recinto apresenta grade de aço na porção frontal e no teto. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 5



Figura 5: Em A, painel expositivo sobre primatas do Velho Mundo. Em B, recintos dos primatas africanos, os quais apresentam vidro na porção frontal e grades apenas no teto. Em C, exemplares da espécie *Papio hamadryas*. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 6

Figura 6: Coleta de sangue realizada junto à intervenção odontológica, realizada nos primatas do Parque Zoológico Municipal de Bauru. Intervenção Odontológica (A), Coleta de sangue e aplicação de soro fisiológico (B), Acompanhamento da temperatura, batimentos cardíacos e medição da glicose (C). Nas fotos todos exemplares são da espécie *Ateles marginatus*. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 7

Figura 7: Aspectos clínicos presentes em alguns primatas do estudo. Durante um breve exame clínico, ainda com o animal anestesiado, verificou-se a presença de lesões gerais no corpo em um exemplar da espécie *Ateles paniscus* (A); alopecia em um exemplar de *Papio hamadryas* (B) e emagrecimento em um exemplar de *Mandrillus sphinx* (C). Embora tais fatores tenham sido observados, nem todos os animais apresentavam sinais clínicos e nenhum animal apresentava-se com mais de um destes sinais. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 8**Tabela 2: Quantificação do DNA de 39 amostras de sangue de primatas não humanos do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, 2016.**

Amostra	Relação $^{260}/_{280}$	DNA na amostra (ng/ μ l)
01	1,91	31,3
02	1,89	52,2
03	1,92	74,5
04	1,87	107,3
05	1,95	63,9
06	1,96	17,0
07	1,94	180,7
08	1,92	33,4
09	1,91	29,1
10	1,88	29,1
11	1,95	40,0
12	1,95	89,4
13	1,94	78,3
14	1,96	80,4
15	1,88	61,2
16	1,95	44,7
17	2,00	62,4
18	2,03	47,8
19	1,94	15,0
20	2,05	11,5
21	1,98	38,3
22	1,93	40,3
23	1,85	32,0
24	2,01	284,5
25	1,93	20,5
26	2,04	27,5
27	1,68	16,4
28	1,85	64,8
29	1,83	49,6
30	2,02	22,1
31	1,95	71,7
32	1,95	49,3
33	1,96	102,3
34	1,94	184,8
35	1,95	73,2
36	1,91	52,4
37	1,97	276,4
38	1,93	46,2
39	1,92	78,2

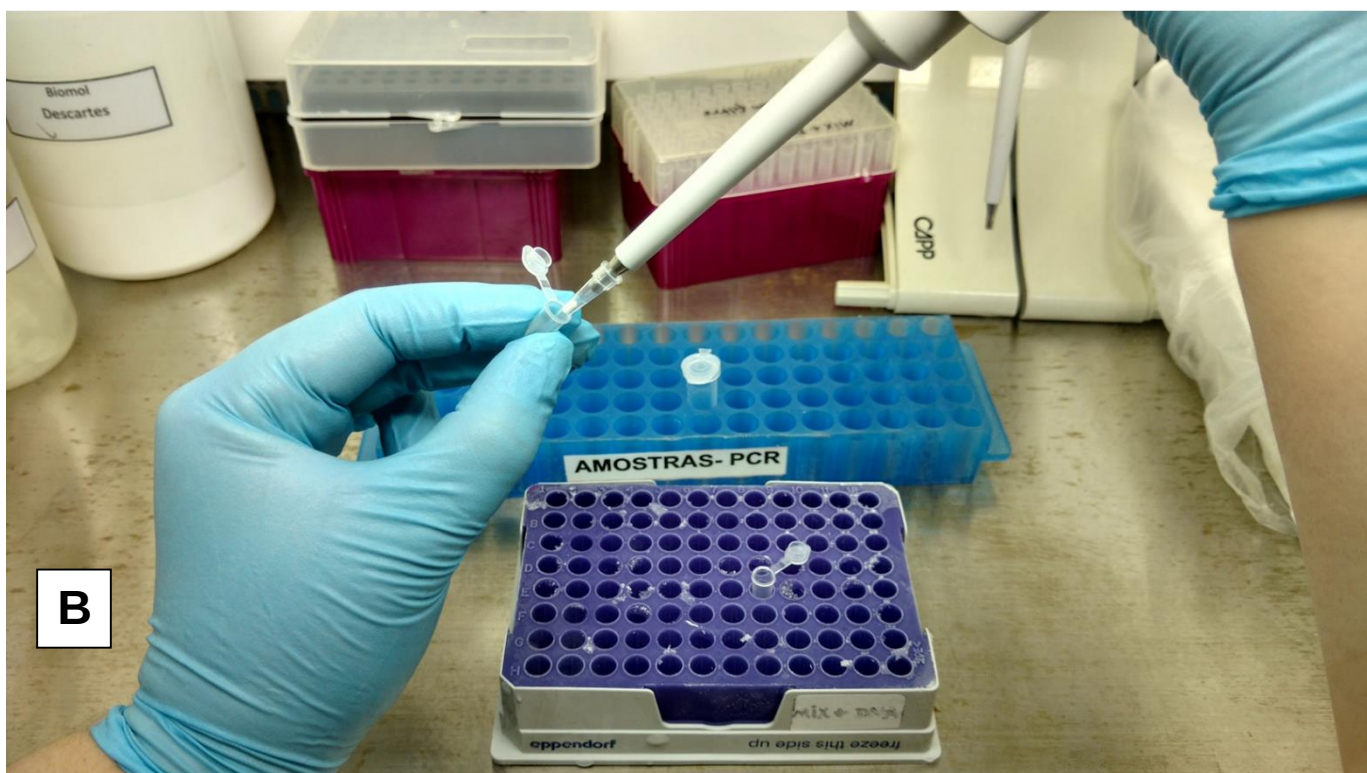
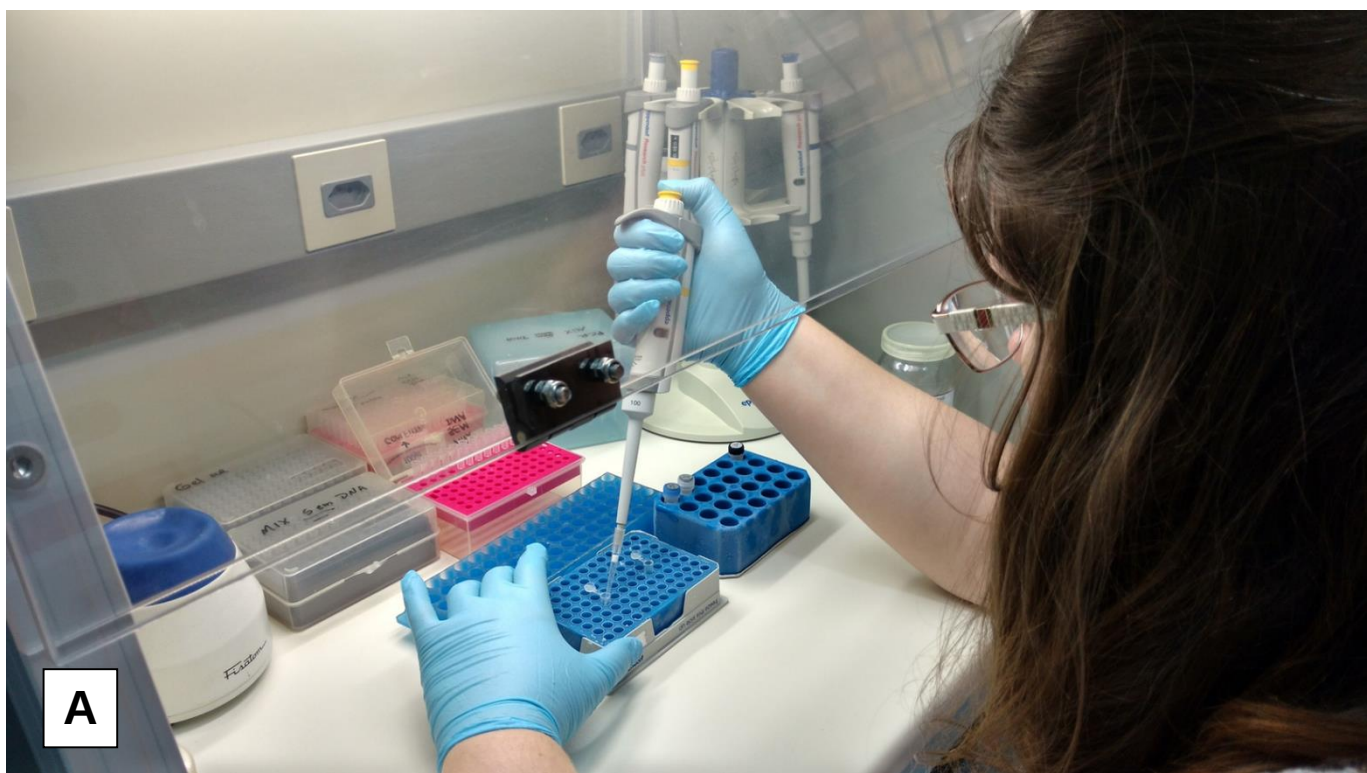
Apêndice 9

Figura 9: Preparação das amostras para realização do teste molecular de Reação em Cadeia da Polimerase. Em A, preparação do *Mix* da PCR e em B, adição das amostras do DNA extraído. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 10**Tabela 3: Primers utilizados com seus respectivos perfis de ciclagem.**

Amplificação	Primer	Ciclo	Ref.
Gene β -globulina	β -1: 5'ACCACCAACTTCATCCACGTTTAC3'	1x 95°C -5min	Lee et al., 2001.
	β -2: 5'CTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGC3'	30x (95°C- 30s; 60°C- 30s; 72°C- 30s)	
		1x 72°C- 5min	
Gene GAPDH	GAPDHf: 5'ATTAAGTTGGGGCAGGGACT3'	1x 95°C -5min	Kullberg et al., 2006.
	GAPDhr: 5'AGGCTGAGAACGGGAAACTT3'	30x (95°C- 30s; 60°C- 30s; 72°C- 30s)	
		1x 72°C- 5min	
Família Trypanosomatidae	LITSR: 5'CTGGATCATTTTCCGATG3'	1x 95 °C- 2min	El Tai et al., 2000.
	L5.8S: 5'TGATACCACTTATCGCACTT3'	35x (95 °C- 20s; 53 °C- 30s; 72 °C- 1min)	
		1x 72 °C- 6min	
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	LCS1: 5'GCAATGCCAGCTACATATATG3'	1x 94°C -2min	Neto et al., 2012.
	LCS3: 5'CAGCTTTTGGGTGGGTAACA3'	40x (94°C- 30s; 56°C- 30s; 72°C- 1min)	
		1x 72°C- 2min	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	B1: 5'GGGGTTGGTGTAATATAGTGG3'	1x 95°C- 5min;	Alexander et al., 1998.
	B2: 5'CTAATTGTGCACGGGGAGG3'	1x 60°C- 1min;	
		33x (95°C- 30s; 60°C- 1min; 95°C- 1min)	
		1x 72°C, 2min	
<i>Leishmania amazonensis</i>	A1: 5'TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA3'	1x 95°C, 5min	Mimori et al., 1998.
	A2: 5'TGCCCTGACTTGTCATGTCTA3'	35x (95°C, 30s; 55°C, 90s; 72°C, 90s)	
		1x 72°C-10min	

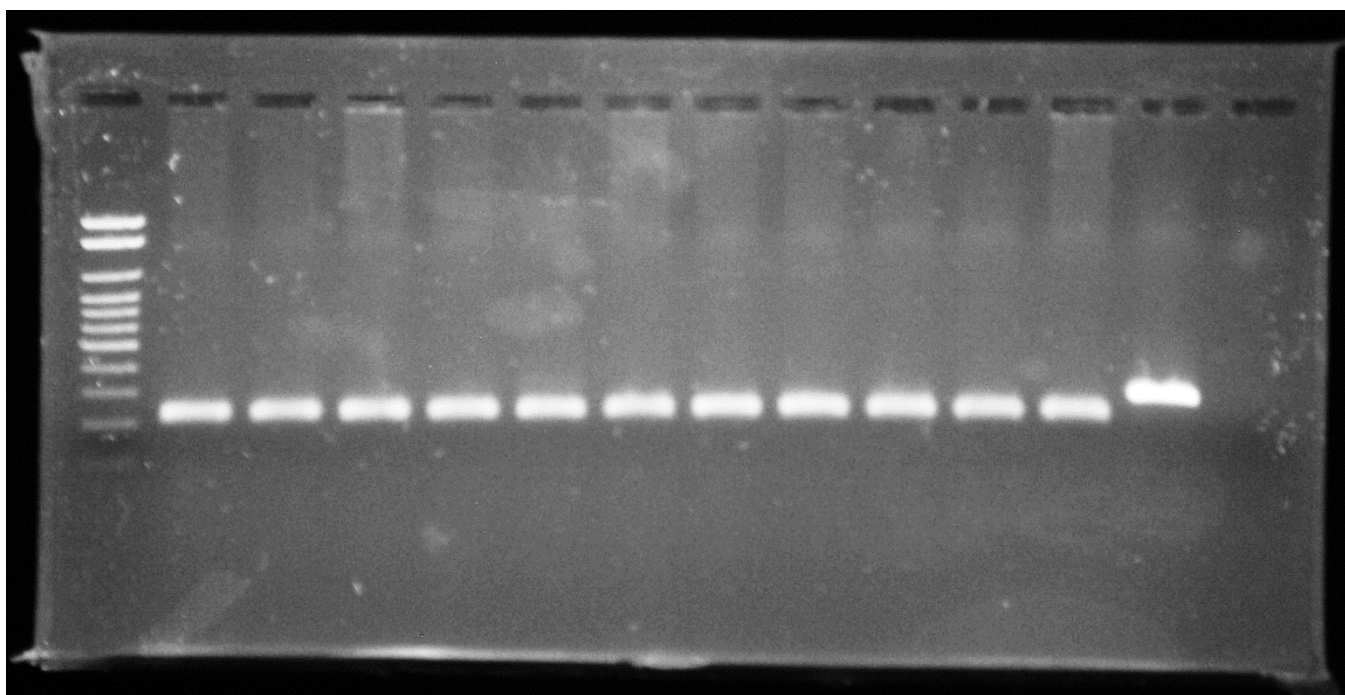
Apêndice 11

Figura 11: eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores LITSR e L5.8S para Família Trypanosomatidae. 1. Marcador de peso molecular 100pb; 2-12. Amostras; 13. Controle positivo (*Leishmania braziliensis*) e 14. Controle negativo (água ultrapura). As amostras foram positivas com aproximadamente 250pb. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 12

Tabela 4: Identificação das 38 amostras sequenciadas e os resultados disponíveis na base de dados GenBank™.

IDENTIFICAÇÃO SEQ.	IDENTIFICAÇÃO PRIMATA	ESPÉCIE PRIMATA	Origem	Pares de bases	Genbank (blastn) 16/05/16
Sequência 1 Forward	07	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>Medicago truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	07	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 2 Forward	08	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Bauru	673	79% <i>Pan troglodytes</i> (251/319)*
Sequência 2 Reverse	08	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Bauru	227	86% <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> (37/43)
Sequência 3 Forward	09	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Ribeirão Preto	205	89% <i>Trypanoplasma borreli</i> (80/90)
Sequência 3 Reverse	09	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Ribeirão Preto	204	91% <i>Trypanosoma vivax</i> (42/46)
Sequência 4 Forward	45	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	204	88% <i>Cucumis melo</i> (37/42)
Sequência 4 Reverse	45	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	204	93% <i>Trypanosoma vivax</i> (40/43)
Sequência 1 Forward	01	<i>Alouatta belzebul</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	01	<i>Alouatta belzebul</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	03	<i>Alouatta belzebul</i>	Santarém	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	03	<i>Alouatta belzebul</i>	Santarém	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	05	<i>Alouatta caraya</i>	Desconhecido	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	05	<i>Alouatta caraya</i>	Desconhecido	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	06	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Ribeirão Preto	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	06	<i>Alouatta caraya</i>	Zoo Ribeirão Preto	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	12	<i>Alouatta fusca</i>	SP	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	12	<i>Alouatta fusca</i>	SP	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	15	<i>Alouatta seniculus</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	15	<i>Alouatta seniculus</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	17	<i>Alouatta seniculus</i>	Rondônia	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	17	<i>Alouatta seniculus</i>	Rondônia	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	18	<i>Ateles chamek</i>	Roraima	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	18	<i>Ateles chamek</i>	Roraima	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	19	<i>Ateles chamek</i>	Desconhecido	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	19	<i>Ateles chamek</i>	Desconhecido	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)

Sequência 1 Forward	20	<i>Ateles chamek</i>	Centro-Oeste	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	20	<i>Ateles chamek</i>	Centro-Oeste	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	22	<i>Ateles marginatus</i>	Santarém	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	22	<i>Ateles marginatus</i>	Santarém	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	23	<i>Ateles marginatus</i>	SP	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	23	<i>Ateles marginatus</i>	SP	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	24	<i>Ateles marginatus</i>	Santarém	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	24	<i>Ateles marginatus</i>	Santarém	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	25	<i>Ateles paniscus</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	25	<i>Ateles paniscus</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	27	<i>Ateles paniscus</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	27	<i>Ateles paniscus</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	30	<i>Cebus albifrons</i>	Desconhecido	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	30	<i>Cebus albifrons</i>	Desconhecido	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	31	<i>Cebus albifrons</i>	Desconhecido	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	31	<i>Cebus albifrons</i>	Desconhecido	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	32	<i>Erythrocebus patas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	32	<i>Erythrocebus patas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	33	<i>Erythrocebus patas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	33	<i>Erythrocebus patas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	36	<i>Erythrocebus patas</i>	SP	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	36	<i>Erythrocebus patas</i>	SP	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	38	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	38	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	39	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	39	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	40	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	40	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Norte do Brasil	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	41	<i>Mandrillus sphinx</i>	Paraná	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	41	<i>Mandrillus sphinx</i>	Paraná	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	42	<i>Mandrillus sphinx</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)

Sequência 1 Reverse	42	<i>Mandrillus sphinx</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	43	<i>Mandrillus sphinx</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	43	<i>Mandrillus sphinx</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	44	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	44	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	46	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	46	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	48	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	48	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	49	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	49	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	50	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	50	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	53	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	53	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	54	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	54	<i>Papio hamadryas</i>	Zoo Bauru	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)
Sequência 1 Forward	56	<i>Mandrillus sphinx</i>	Santa Catarina	206	93% <i>M.truncatula</i> (27/29)
Sequência 1 Reverse	56	<i>Mandrillus sphinx</i>	Santa Catarina	203	94% <i>Trypanosoma vivax</i> (44/47)

*Os resultados do sequenciamento genético retornaram similaridade com primata da espécie *Pan troglodytes*. Embora 38 amostras tenham sido positivas no teste molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR) utilizando-se os primers LITSR e L5.8S, 37 dessas apresentaram similaridade com o gênero *Trypanosoma*.

Apêndice 13**Sequências obtidas pelo Sequenciamento Sanger.****Sequência 1:**

Forward:

AAACCCGGTTCGGCGTCTCTCTCTTTTCGGGGGGGACGCGCCTCCACCTCCTTTCCCTTCTAATTC
CATCTTGCCGCTCGACCCCTGCACTGTGTGACGACCAAACATTCCCACGGGTGCGAGCACGGCT
CTTGAATTCGTATTTCTTTGAATTACGCGCTACATAGCTCTAAGAGGAATCAAGCAAAGTGAAA
TAAGTGGTATCAA

Reverse:

CTGGATCATTTTCCGATGATCAAATCTGGATCATTCCAAGAAAATCAAAAAAACAAAATCCAA
AGCCTGGCGTCGTCGGCCGGGGGCTCGGAGACAAATCTCTCTTTTCTTTTCGAGCTAGAACTTT
GGGGACACACACAGTGTGCTGTGCTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATGACTG
GCTTCCCTTTTCT

Sequência 2:

Forward:

TAACTGGACTGGCTTCTATCTCGGGCGGGGGGGCGCAACTCTCAACTCCTTCTCCCTCTTGAGC
CTTTTGGCCCTGGAGCGTGGTCTGCGTGAAAGCGGCTTTCCCACTGGTTGGAGCACGGCTTTT
GAATTCGTATTTGTTGAGACTTGGCTTCATTGCTCTAAGAGGAATAAAGTGAGTGCGATAAGT
GGTATCAAGAGCGTGGTAACGTATGAAAGCGTGGAATATTGGACAGGTTTGGTTCCAAGGAA
GGAAGCTTCCCTCGACTCTCTGGTCCTGATCGCTCGCTACCTTGCCACTTACGGCCTATCCAAT
CCGAGTTACCTTTATTCCTCACACTCCCCCATGGCATCCACACATGGGCTGTCTCTCATGCAT
ACCCTGTCAGTCTGGGACATCGAGTTAGACGCAGAACTGAGCCAAGCATGTTTTTTTTTTATG
GCTCCGGTTAAGACCAGAGGACAAGAGGAATCAGAGTCGGCCCCTCATGTACTGCACCCCCC
GGGCTGGTCTCGTACAGGGTTGAAAGATTTGAGGTTCTTTTCTTGTGGTCTAAATTTAGCTGA
AGGAAGTGCGATAAGTGGATATCAGTGAGTAATAACTGGGCACTTCGGACATTGTCCACAAC
GTATTCATCTGTGTGCAATCACCGCACCTTTTCGGAC

Reverse:

ATCTGAAACAAATCAATTGTCCGGATCAGATCATTATAATCCATTTGGATCGTCTCAACCCAAT
CAGAGAACCAAACCCCTTAGGCGCTTTCTCGCCACCTGGGGCTCTCCTTCCAATCTCTCTGTC
TTTTGACGCGCGTGCCGTTTTTTGACAGAAGCACGTCGATTGCATGATCGCGGCAAATGCAAT
AAGTTGCTACAAATGAGATAACGTGTTACCAAGGC

Sequência 3:

Forward:

TACCGGGGTTCGGCGTCTCTCTCTGGCGCTCGGACGCAACTCTCTCTTCCCTTCCGCCGCTCGTTC
CTTCTTGCCCCACACCGTGTCTCTGCTTGAAACCGGCTTTCACCACGTGTCGCGATGGATGAC
TTGACTTCTATTTTCGTTGAAAAACGCACTAAAGTGCGATAAGAGGAATCAAGCAAATTGAAA
TAAGTGGTATCAA

Reverse:

TCTGGATCATTTTCCGATGATCAAATCTGGAAAATTTTAAGAAAATCAAAAAAACAAAACCCA
AAACCTTTTTCGGCGTCCCCGTGGGGCGCTGGGACCAAACCTCTCTCTTACTTTTCGCGCTCGCAC
TTTGTTGACACAAAACCGTGTGCTGTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATG
ACTGGCTCCCTTT

Sequência 4:

Forward:

AACCCGGATTTCGGCGTCTCTCTCTTGCGGGCGGGCGGCCTTTCAC TTCCTTCCCTTCTAATTCC
TTTTTGCCCCTTGAACCTGCACTGCGTGACAACCAAACATTCCCACGGGTCGGAGCACGGCTCT
TGAATTCGTATTTCTTTGAATACTTGGCTAAATAGCTCTAAGAGGAATCAAGCAAAGTGAAAT
AAGTGGTATCAA

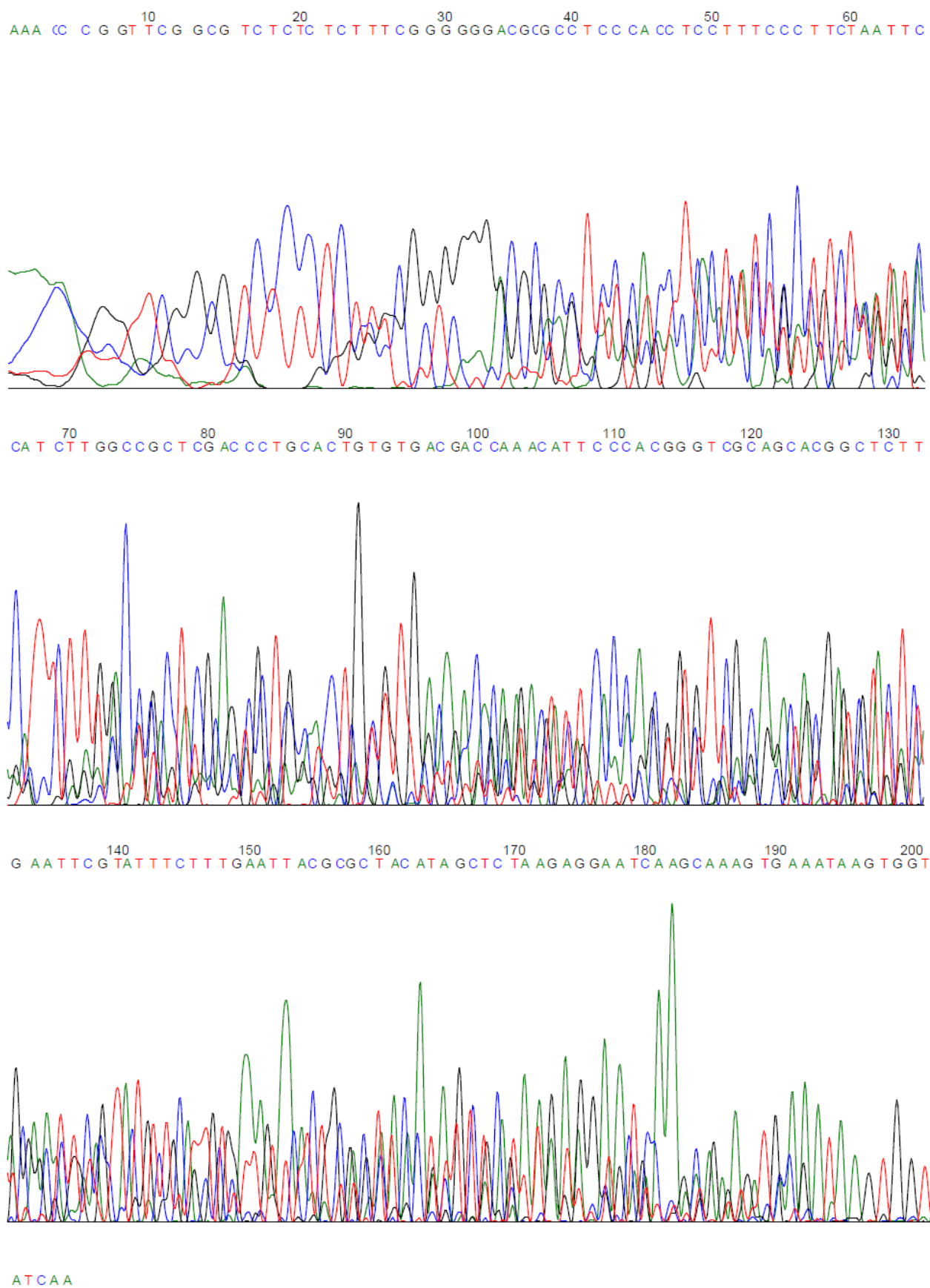
Reverse:

TCTGGATCATTTTCCGATGATCAAATCTGGAAAATTTTAAGAAAATCAAAAAAACAACCCCA
TAACCTTTTCCTCGTCCCCGGGGGGCTCTGGGACAAATCTCTCTCTGCCGGCCGCGCTAGCACC
GTGGGCACACAAAACCGTGTCTGTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATG
ACTGGCTCCATTCC

Apêndice 14

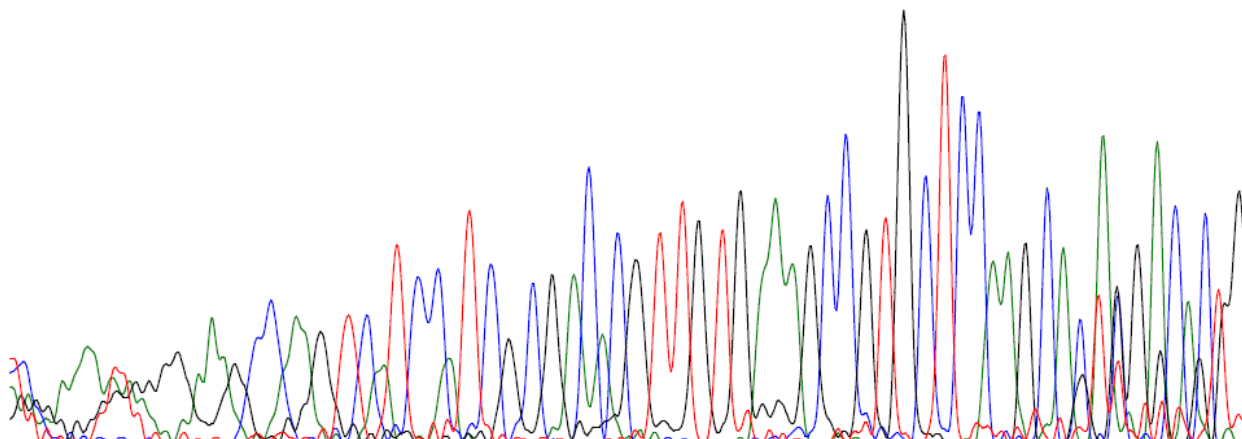
Eletroferogramas obtidos pelo Sequenciamento Genético Sanger

Sequência 1 Forward:

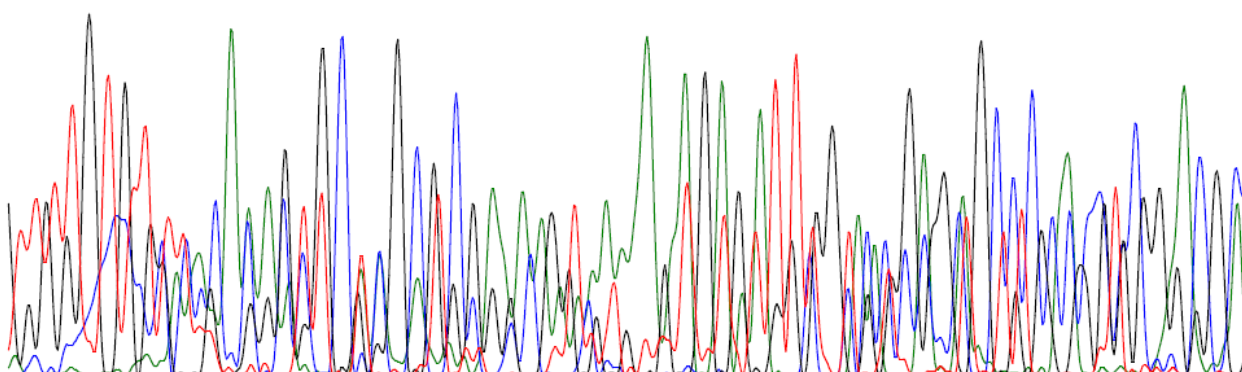


Sequência 1 Reverse:

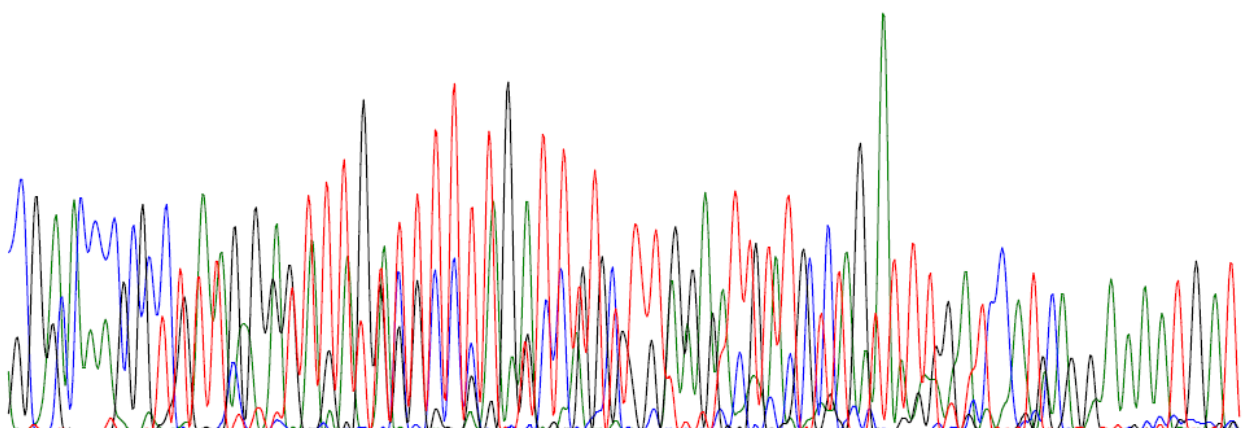
10 20 30 40 50 60
 A G A A A A G G G A A G C C A G T C A T C C A T C G C G A C A C G T T G T G A A A G C C G T G C T C C A G C A C A C G A C A C T G



70 80 90 100 110 120 130
 T G T G T G T C C C C A A A G T T C T A G C T C G A A A A G A A A A G A G A T T T G T C T C C G A G C C C C C G G C C G A C G A

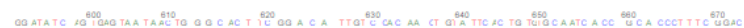
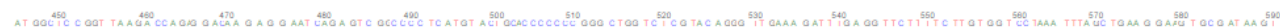
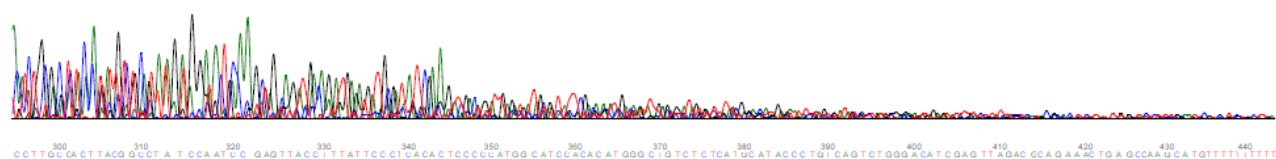
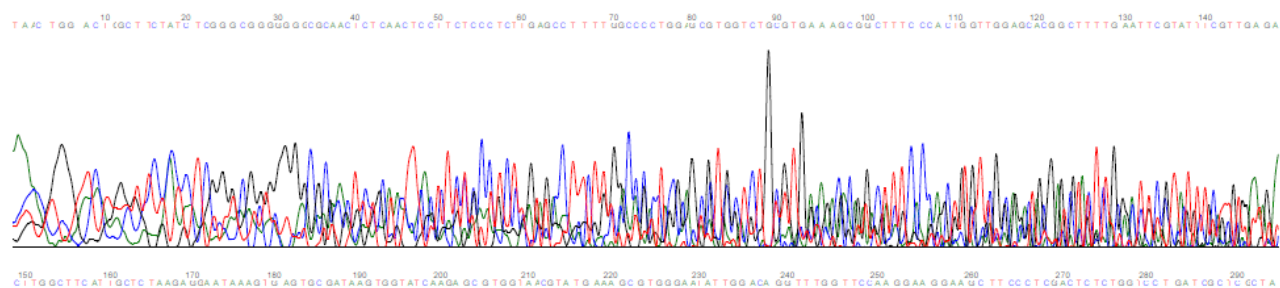


140 150 160 170 180 190
 C G C C A G G C T T T G G A T T T T G T T T T T T G A T T T T C T T G G A A T G A T C C A G A T T T G A T C A T C G G A A A A T G A T



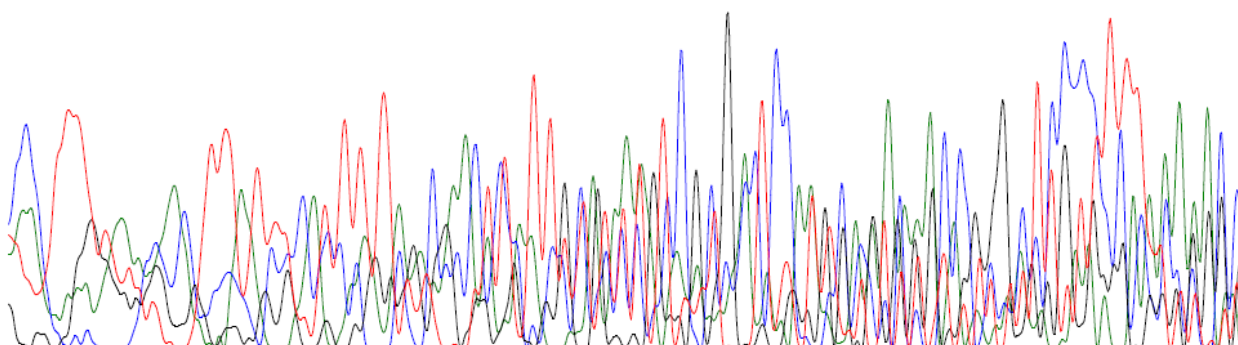
200
 C C A G

Sequência 2 Forward:

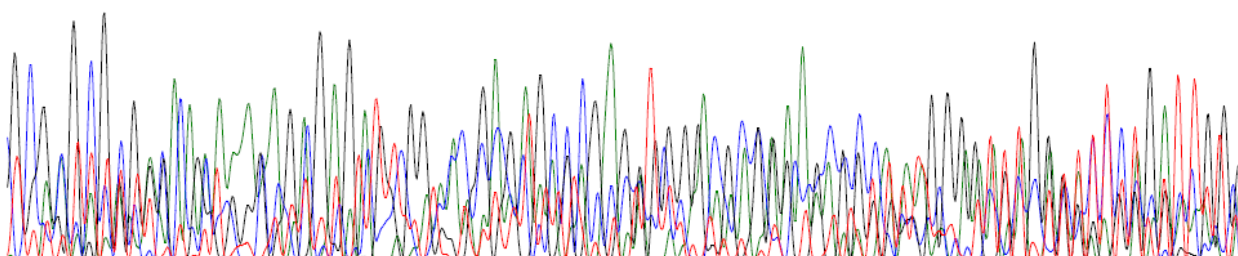


Sequência 2 Reverse:

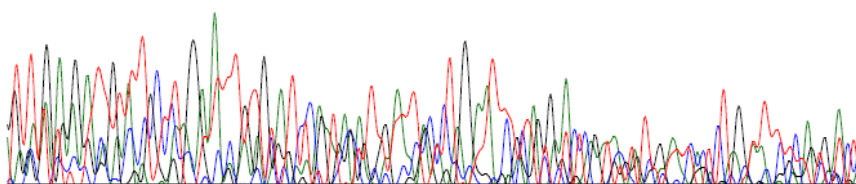
GCC TTGGT AA C ACG TTA TCT CAT T TGT AG C AACT TAT T G CAT T T G CCG C G ATC ATG CAA TCG ACC GTG CTT C TG TCA AAA AAC G



G C A C G C G C G TCA AAA AG ACA GAG AG AT T GG AA GGA G AG C C C CAG GT G GG C G AG AA AG C G C C T AAG GGG T T T GG T T C T C T G AT T G G G

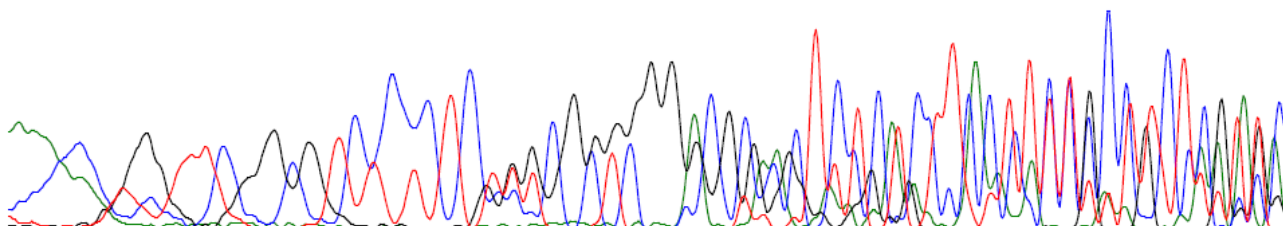


170 TT GAG ACG AT CCA AAT G G ATT ATA ATG AT C T G AT C C GGA C AAT T GAT T T T G T T T CAG AT

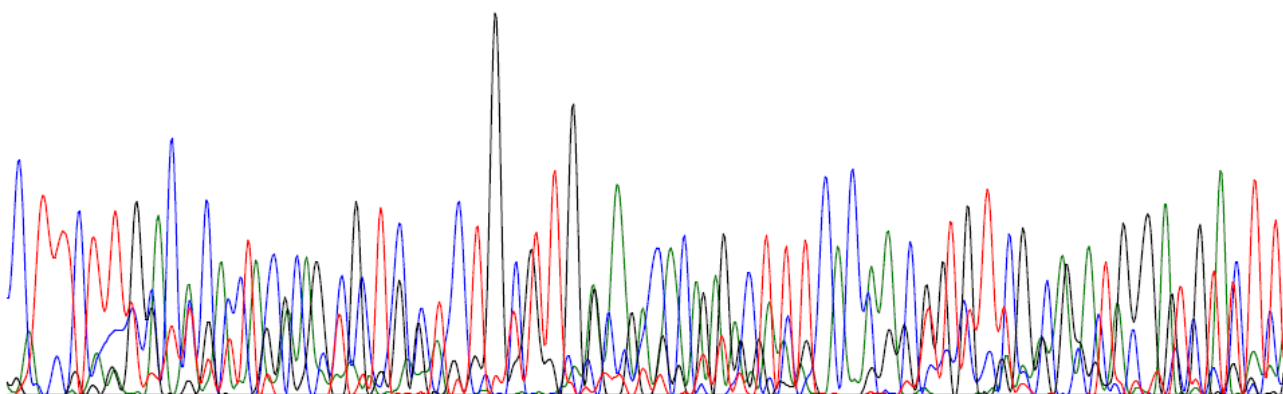


Sequência 3 Forward:

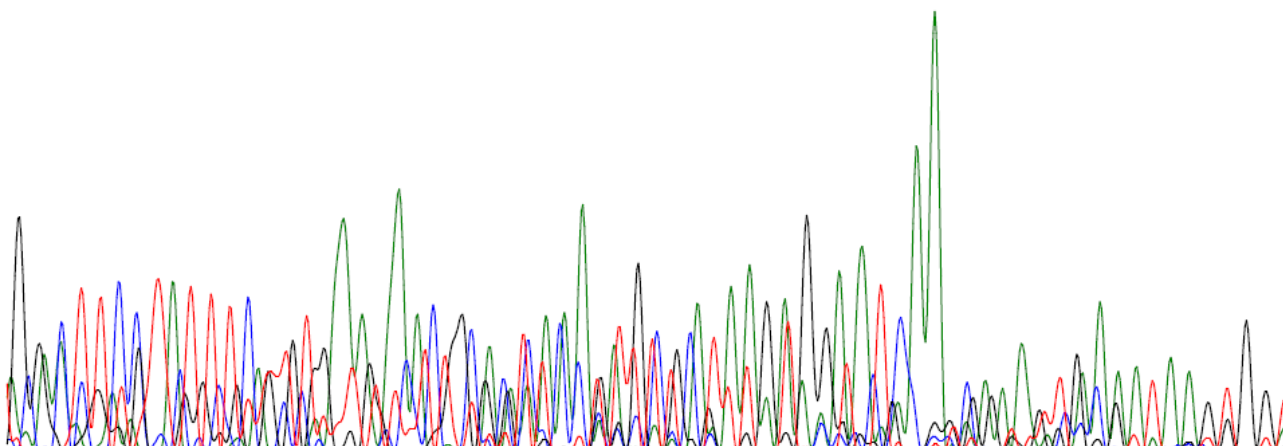
T A C C G G G T T C G G C G T C T C T C T G G C G C T C G G A C G C A A C T C T C T C T T C C T T C C G C C G C T C G T T C



C T T C T T G C C C C A C A C C G T G T C C T C T G C T T G A A A C C G G C T T T C A C C A C G T G T C G C G A T G G A T G A C T T



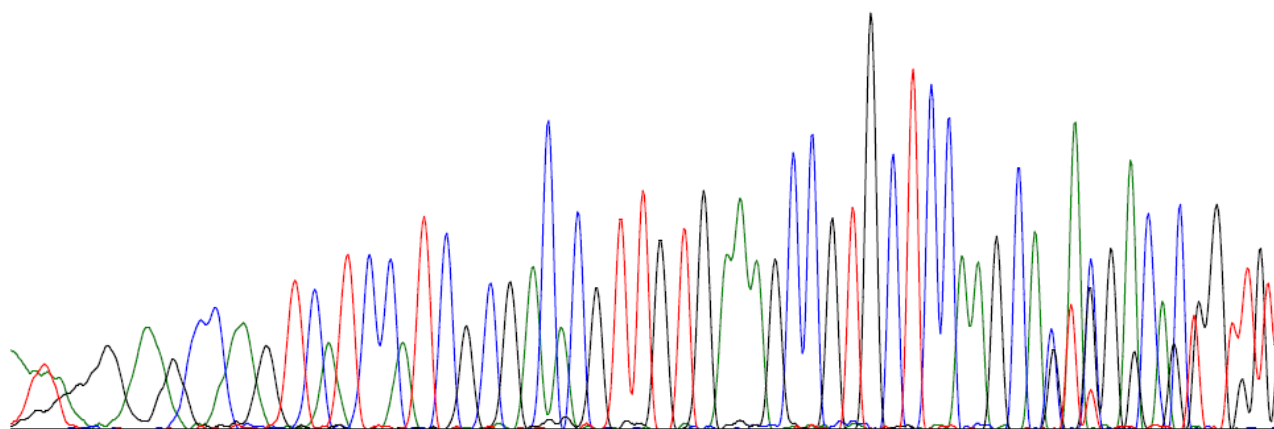
G A C T T C C T A T T T C G T T G A A A A C G C A C T A A A G T G C G A T A A G A G G A A T C A A G C A A A T T G A A A T A A G T G G T



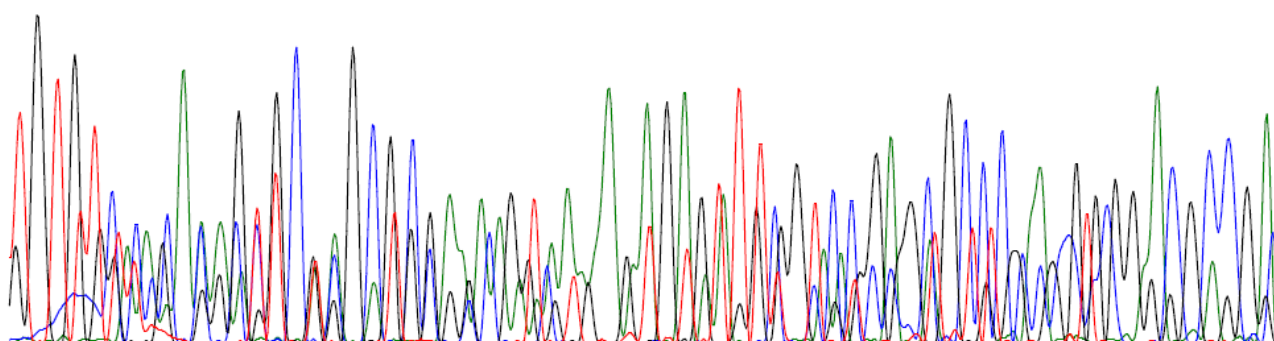
A T C A A

Sequência 3 Reverse:

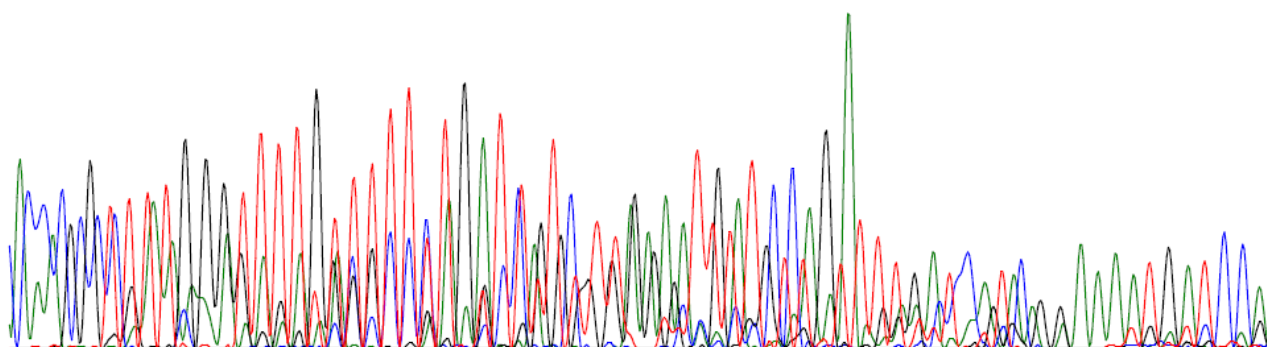
AA AGG G A G C C A G T C A T C C A T C G C G A C A C G T T G T G A A A G C C G T G C T C C A A G C A C A C G A C A C G G T T T



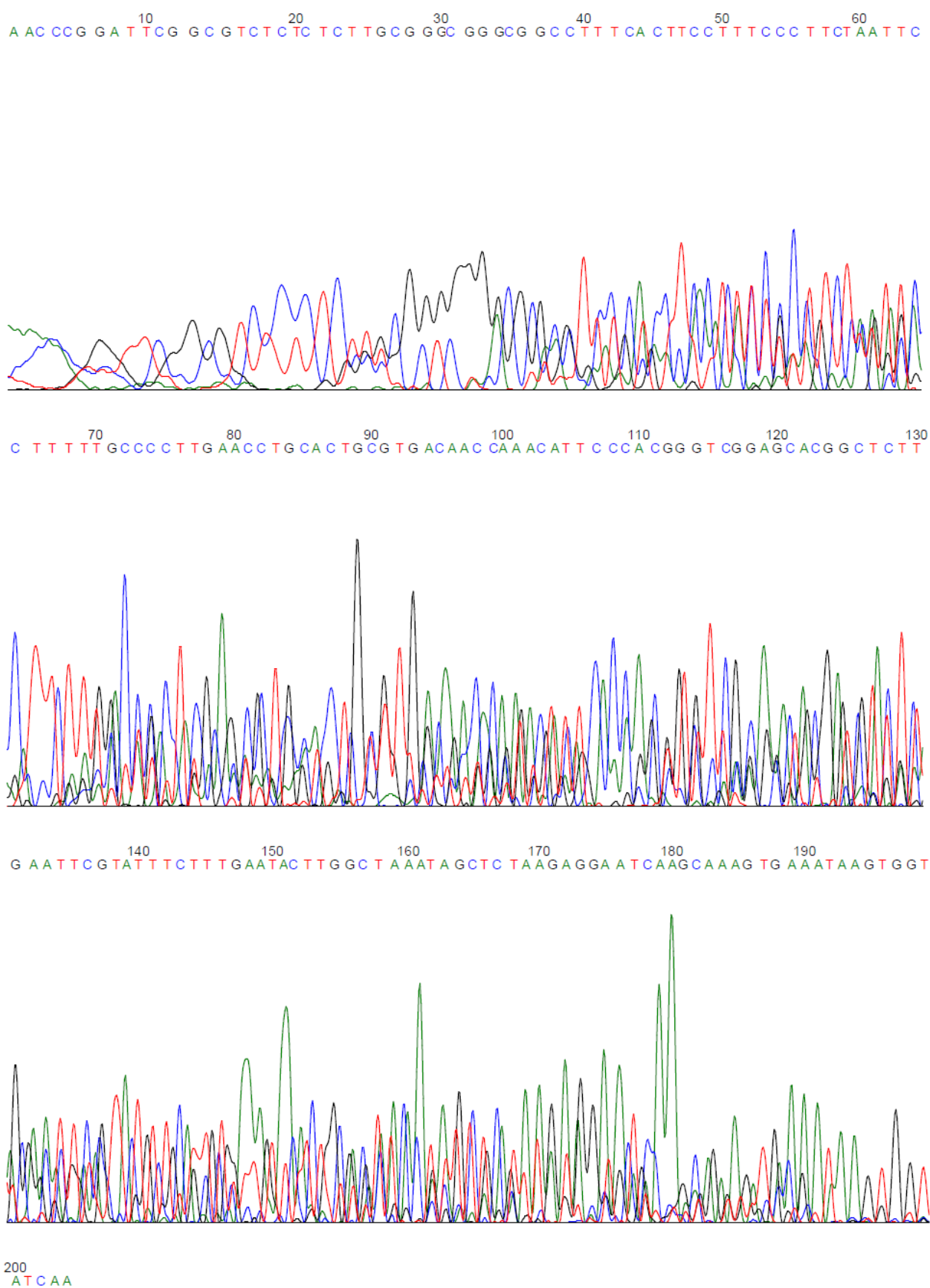
T G T G T C A A C A A A G T G C G A G C G C G A A A A G T A A G A G A G A G T T T G G T C C C A G C G C C C C A C G G G G A C G C C G A



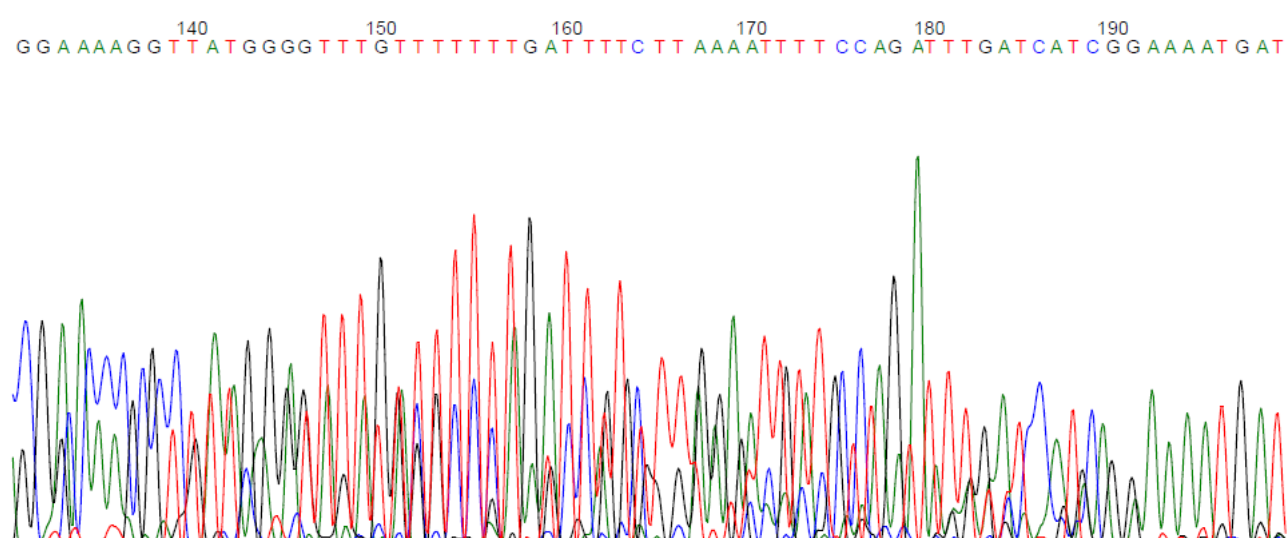
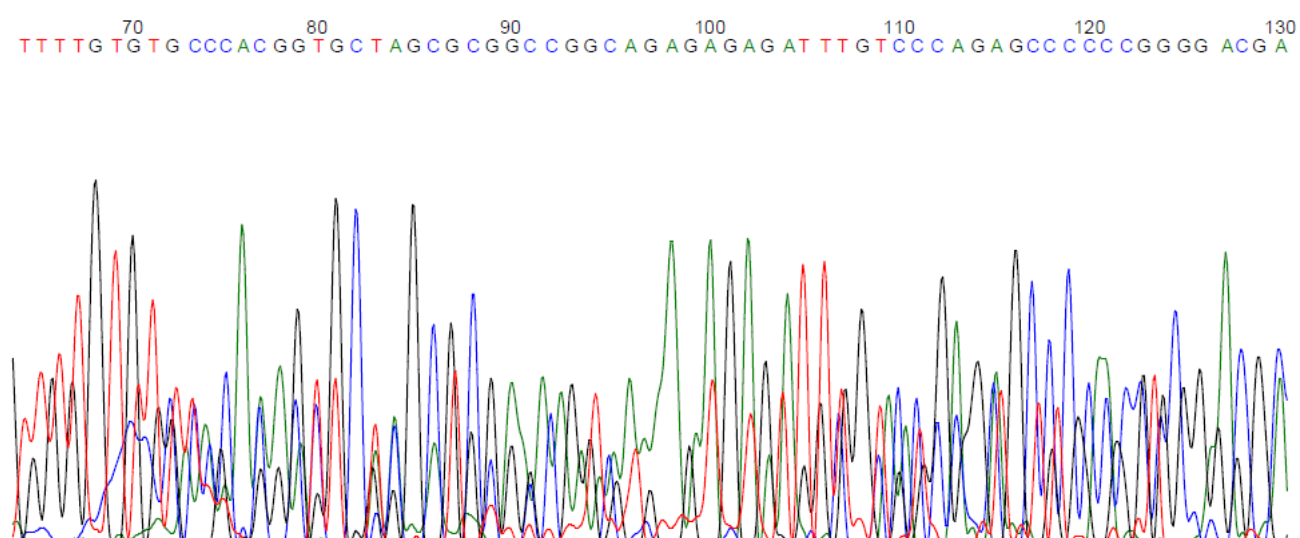
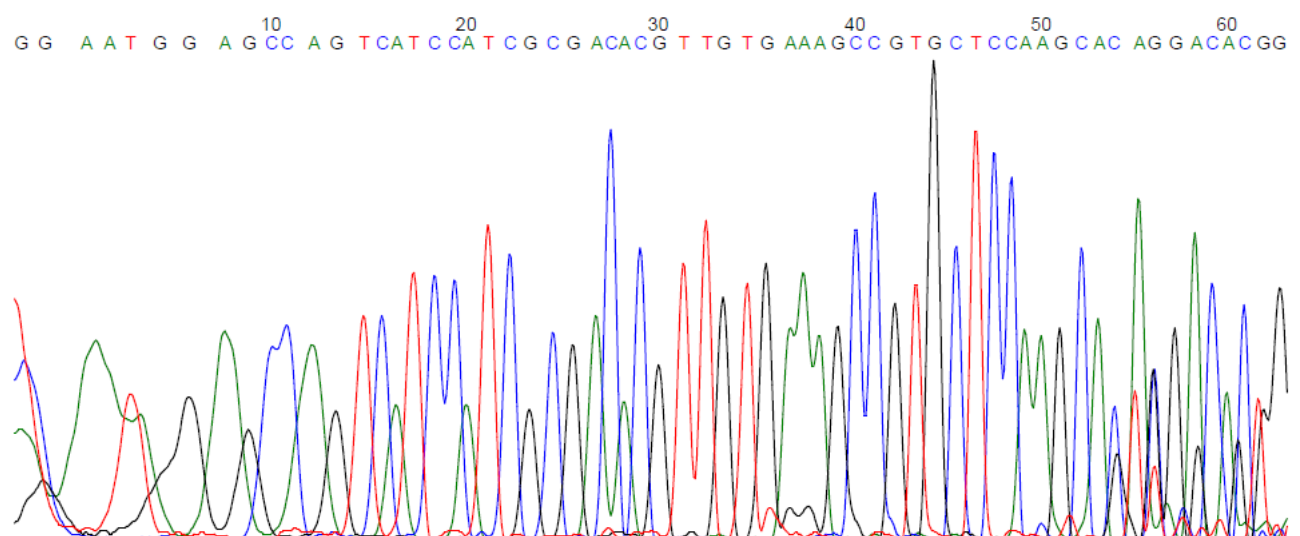
AAAGG T T T T G G G T T T T G T T T T T T T G A T T T T C T T A A A A T T T T C C A G A T T T G A T C A T C G G A A A A T G A T C C A



G A

Sequência 4 Forward:

Sequência 4 Reverse:



200
C C A G A

Apêndice 15

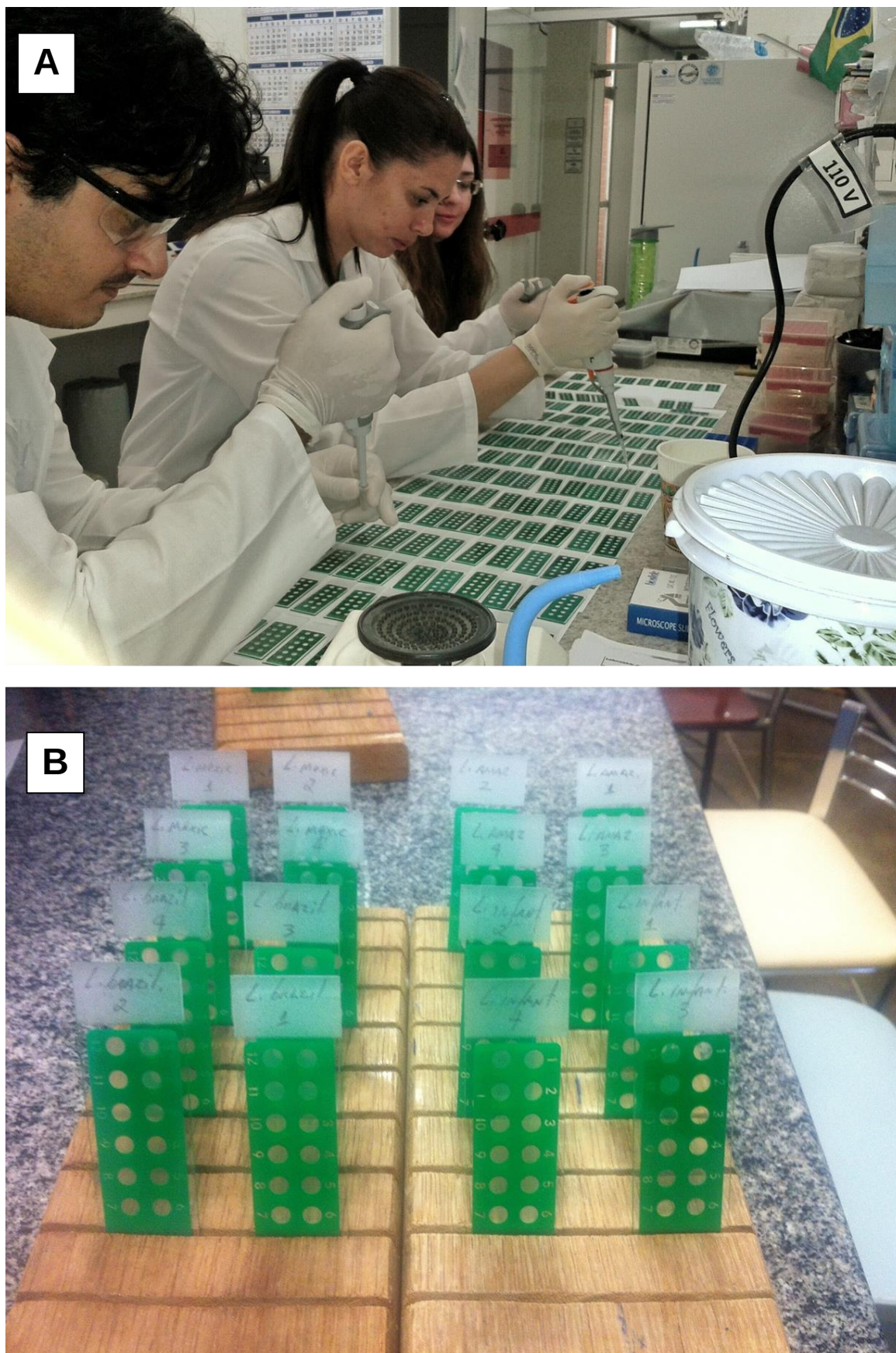


Figura 15: Em A, sensibilização das lâminas utilizando antígenos de interesse (Fonte: Laboratório de Sanidade Animal em Bauru – APTA). Em B, realização do teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com as lâminas previamente sensibilizadas. Fonte: arquivo pessoal e Silva, D.B (2015).

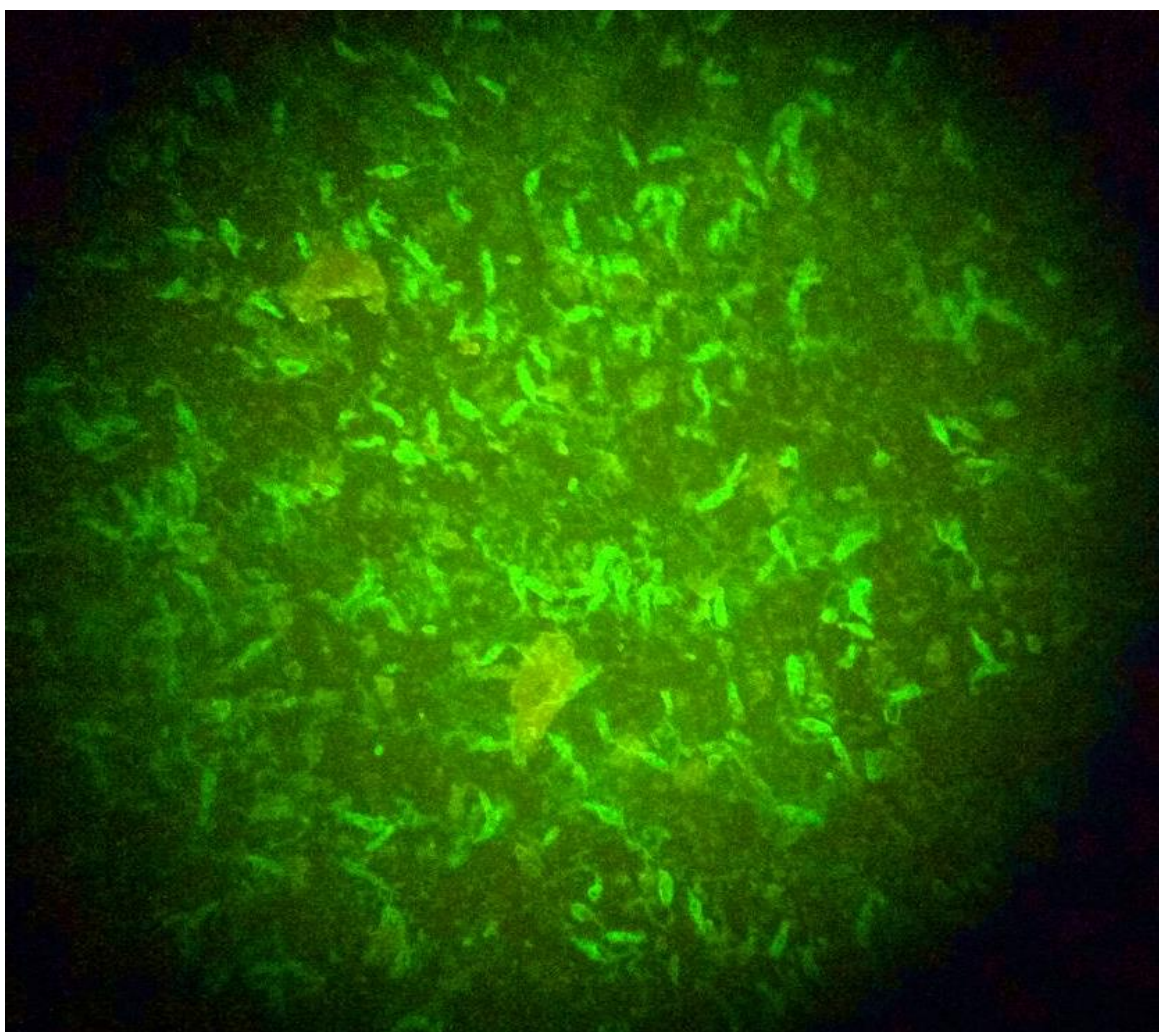
Apêndice 16

Figura 16: Soro de animal da espécie *Erythrocebus patas* reagente à técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania braziliensis*. Aumento de 40X. Fonte: Silva, D.B (2015).

21	+	-	-	-	NR	R	NR
22	+	-	-	-	SI	SI	SI
23	+	-	-	-	NR	NR	NR
<i>Logothrix lagotricha</i>							
24	+	-	-	-	NR	NR	NR
25	+	-	-	-	NR	NR	NR
26	+	-	-	-	NR	NR	NR
<i>Mandrillus sphinx</i>							
27	+	-	-	-	NR	NR	NR
28	+	-	-	-	NR	NR	NR
29	+	-	-	-	NR	NR	NR
30	+	-	-	-	NR	NR	NR
<i>Papio hamadryas</i>							
31	+	-	-	-	NR	NR	NR
32	+	-	-	-	NR	NR	NR
33	+	-	-	-	NR	NR	NR
34	+	-	-	-	NR	NR	NR
35	+	-	-	-	NR	NR	NR
36	+	-	-	-	NR	NR	NR
37	+	-	-	-	SI	SI	SI
38	+	-	-	-	SI	SI	SI
<i>Papio papio</i>							
39	-	-	-	-	NR	NR	NR

NR = não reagente; R = reagente; SI = soro insuficiente para a realização da técnica; + = positivo; - = negativo.