

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS BAURU - FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELLA NEVES AIRES

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO PARA TRIPANOSOMATÍDEOS A
PARTIR DE SANGUE E SUABE CONJUNTIVAL DE PRIMATAS DE CATIVEIRO
DO ZOOLOGICO DE SOROCABA - SP**

BAURU

2022

ISABELLA NEVES AIRES

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO PARA TRIPANOSOMATÍDEOS A
PARTIR DE SANGUE E SUABE CONJUNTIVAL DE PRIMATAS DE CATIVEIRO
DO ZOOLOGICO DE SOROCABA - SP**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de bacharel (a) em
Ciências Biológicas, área de
concentração Meio Ambiente.

Orientador (a): Dra. Simone Baldini Lucheis

Co-orientador (a): Wesley José dos Santos

BAURU

2022

A298d

Aires, Isabella Neves

DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO PARA
TRIPANOSOMATÍDEOS A PARTIR DE SANGUE E SUABE
CONJUNTIVAL DE PRIMATAS DE CATIVEIRO DO ZOOLOGICO DE
SOROCABA - SP / Isabella Neves Aires. -- Bauru, 2022

54 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientadora: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Wesley José dos Santos

1. Zoonoses. 2. Primatas não humanos. 3. Tripanosomatídeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ISABELLA NEVES AIRES

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO PARA TRIPANOSOMATÍDEOS A
PARTIR DE SANGUE E SUABE CONJUNTIVAL DE PRIMATAS DE CATIVEIRO
DO ZOOLOGICO DE SOROCABA - SP**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de bacharel (a) em
Ciências Biológicas, área de
concentração Meio Ambiente.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Simone Baldini Lucheis

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA)

Dr. Sérgio Pereira

Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Dr. Renato Pirani Ghilardi

Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Bauru, 08 de março de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu chegasse onde estou hoje. Obrigada por me proporcionarem uma educação que me permitiu ser uma pessoa crítica em relação ao mundo e me instigou o desejo de ser professora e cientista!

Agradeço também ao meu namorado, que me deu muito apoio nestes quase seis anos e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por apoiar minhas loucuras e segurar minha mão todas as vezes que a ansiedade tomou conta de mim. Em seguida agradeço aos meus três cachorros e três gatos, ter tanto bicho em casa nunca é fácil, mas as lambidas e ronronados que recebo toda vez que chego em casa compensam qualquer trabalho e animam meu dia.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, Livia e Wesley, que foram meus mentores em todas as técnicas moleculares e puxam minha orelha desde 2017. Suzane e Thainá, que me aguentaram tagarelando e bagunçando o cronograma da PCR toda semana no laboratório. Não posso deixar de agradecer também ao Zoológico de Sorocaba e aos primatas não humanos, cujas amostras foram coletadas para que essa pesquisa pudesse ser realizada!

Por fim, agradeço a minha orientadora Simone e meu co-orientador Wesley, por todo o auxílio, oportunidades e recursos fornecidos pela APTA, pela confiança depositada em mim e pelos momentos alegres que vivemos nesses últimos 5 anos. E agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas a mim durante três anos e meio da minha graduação, que contribuíram grandemente para minha aquisição de conhecimento e abriram muitas portas para meu futuro como pesquisadora.

RESUMO

A família Trypanosomatidae inclui protozoários de amplo interesse médico e veterinário, que infectam diversos vertebrados, incluindo o homem, e utilizam uma gama de insetos como agentes vetores. Dois gêneros de grande importância nessa família são os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. O gênero *Leishmania* inclui protozoários causadores das leishmanioses, zoonoses que podem se apresentar nas formas visceral e tegumentar, cujos vetores são diferentes espécies de flebotomíneos. A leishmaniose visceral tem como agente *Leishmania infantum* nas Américas, já a leishmaniose tegumentar apresenta várias espécies responsáveis, como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Já o gênero *Trypanosoma* apresenta como principal espécie *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, que infecta humanos e animais silvestres, incluindo primatas não humanos, os quais podem ser infectados no ambiente onde estão inseridos, como parques zoológicos. A pesquisa consiste no diagnóstico de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em 48 primatas de cativeiro, alocados no Zoológico de Sorocaba. Foram coletadas amostras de sangue e secreções a partir de suabe conjuntival, utilizando-se a técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, bem como a prova molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) com o uso de quatro (04) *primers* gerais e específicos, que possibilitam a identificação da espécie do parasito. Os testes moleculares para as amostras de sangue apresentaram sete (07) amostras de primatas amplificadas com pelo menos um dos *primers* utilizados na pesquisa, representando um total de 14,6%. Em relação aos testes moleculares para as amostras de suabe conjuntival, 11 amostras foram amplificadas, representando 24,44% das amostras testadas. Na técnica sorológica de RIFI nenhuma amostra foi reagente, indicando uma infecção recente, uma vez que as amostras amplificadas não apresentaram a detecção de anticorpos IgG no exame sorológico. O monitoramento diagnóstico de tripanosomatídeos em animais de cativeiro é fundamental para a identificação de infecções e possíveis reservatórios destes parasitos, para que seja realizada uma vigilância epidemiológica e possam se estabelecer medidas preventivas para minimizar o risco de transmissão dessas zoonoses.

Palavras-chave: Zoonoses; Primatas não humanos; Tripanosomatídeos.

ABSTRACT

The Trypanosomatidae family includes protozoans of broad medical and veterinary interest, which infect various vertebrates, including humans, and use a range of insects as vector agents. Two genera of great importance in this family are the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*. The genus *Leishmania* includes protozoa that cause leishmaniasis, zoonoses that can present in visceral and tegumentary forms and whose vectors are different species of sandflies. Visceral leishmaniasis has *Leishmania infantum* as agent in the Americas, whereas tegumentary leishmaniasis presents several responsible species, such as *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The genus *Trypanosoma* has as its main species *Trypanosoma cruzi*, an etiological agent of Chagas disease, which infects humans and wild animals, including nonhuman primates, which can be infected in their environment, such as zoos. The research consists of the diagnosis of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in 48 captive primates, allocated at the Sorocaba Zoo. Blood samples and secretions were collected from conjunctival swabs, using the serological technique of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*, as well as the conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) molecular test using four (04) general and specific *primers*, which allow the identification of the parasite species. Molecular tests for blood samples showed seven (07) primate samples amplified with at least one of the *primers* used in the research, representing a total of 14.6%. Regarding the molecular tests for the conjunctival swab samples, 11 samples were amplified, representing 24.44% of the samples tested. In the IFAT serological technique, no sample was reactive, indicating a recent infection, since the amplified samples did not show the detection of IgG antibodies in the serological exam. Diagnostic monitoring of trypanosomatids in captive animals is essential to identify infections and possible reservoirs of these parasites, so that epidemiological surveillance can be carried out and preventive measures can be established to minimize the risk of transmission of these zoonotic diseases.

Keywords: Zoonotic diseases; Non-human primates; Trypanosomatids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Procedência dos animais.....	15
3.2 Animais da pesquisa.....	16
3.3 Coleta de sangue e células conjuntivais.....	22
3.4 Local de realização dos exames.....	22
3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.6 Exames moleculares.....	24
3.6.1 Extração do DNA.....	24
3.6.2 Quantificação do DNA.....	24
3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de sangue e suabe conjuntival para <i>Leishmania spp.</i> e <i>Trypanosoma spp.</i>	24
3.6.4 Eletroforese em gel de agarose.....	26
3.6.5 Controles.....	26
3.6.6 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
4.2 Exames moleculares.....	28
4.2.1 Quantificação das amostras.....	28
4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese a partir de amostras de sangue.....	34
4.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers β -1 e β -2 (140pb).....	34
4.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb).....	34

4.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers B1/B2 (<i>Leishmania braziliensis</i>) (800pb).....	35
4.2.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers LCS1/LCS3 (<i>Leishmania infantum</i>) (259pb).....	38
4.2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers 121/122 (<i>Trypanosoma cruzi</i>) (350pb).....	38
4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese a partir das amostras de suabe conjuntival.....	40
4.2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers β -1 e β -2 (140pb).....	40
4.2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb).....	41
4.2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers B1/B2 (<i>Leishmania braziliensis</i>) (800pb).....	41
4.2.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers LCS1/LCS3 (<i>Leishmania infantum</i>) (259pb).....	42
4.2.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os primers 121/122 (<i>Trypanosoma cruzi</i>) (350pb).....	43
4.3 Análise estatística.....	44
5 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae consiste em um amplo grupo filogenético que reúne dezenas de espécies de protozoários de diversos gêneros, que despertam interesse médico, veterinário e agrícola. Esta família pertence à ordem Kinetoplastida, a qual inclui protozoários flagelados que apresentam uma estrutura que contém DNA extranuclear condensado, chamada cinetoplasto. Devido a sua importância médica e relevância para saúde pública, uma vez que inclui agentes causadores de graves doenças tropicais negligenciadas, os tripanosomatídeos recebem maior atenção do que outros cinetoplastídeos (KAUFER; STARK; ELLIS, 2020). Os tripanosomatídeos podem infectar todos os vertebrados existentes e apresentam diversos invertebrados que atuam como vetores desses parasitos; sendo que mais de 900 espécies de vertebrados e mais de 500 invertebrados podem participar do ciclo destes protozoários (PODLIPAEV, 2001).

Dois gêneros de grande importância na família Trypanosomatidae são *Trypanosoma* e *Leishmania*, cujos parasitos podem causar doenças tanto em homens como em animais, domésticos ou não (LUKES, 2009a), explicitando o interesse dos cientistas em estudar os mecanismos de interação hospedeiro-parasito-ambiente, que são refinados nesses gêneros. O gênero *Leishmania* apresenta parasitos causadores das leishmanioses, doenças negligenciadas que consistem em um grande problema de saúde pública, sendo endêmica em 98 países, cuja estimativa é de 20.000 a 30.000 mortes por ano, ocupando o nono lugar dentre as doenças infecciosas. Apresentam 1,3 milhão de casos anuais estimados, onde apenas 600 mil são diagnosticados oficialmente e 300 mil correspondem a leishmaniose visceral (WHO, 2015; WHO, 2014 *apud* NOVO *et al.*, 2016). Pode apresentar diferentes formas clínicas, de acordo com a espécie e a relação do protozoário com o hospedeiro (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Dentre elas, destacam-se a visceral, mucocutânea e cutânea ou tegumentar (LONGONI *et al.*, 2012).

As leishmanioses podem ser causadas por mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo consideradas zoonoses, uma vez que humanos podem ser infectados se expostos ao ciclo de transmissão natural do parasito (BEZERRA *et al.*, 2019). A infecção causada pelo parasito também pode ser assintomática ou levar a um amplo espectro de doenças, dependendo da espécie de *Leishmania* e das características do hospedeiro (GALLUZZI *et al.*, 2018).

A leishmaniose visceral (LV) tem como agentes causadores diferentes parasitos de acordo com a localização geográfica, sendo uma das formas mais graves da leishmaniose, podendo ser fatal se não for tratada. Na Europa, Ásia, e todo o hemisfério Oeste, o parasito causador da maioria dos casos de LV é *Leishmania donovani*, enquanto nas Américas, em todo o hemisfério Leste e parte do Oeste, essa doença é causada majoritariamente pela espécie *Leishmania infantum* (BANU *et al.*, 2019). O número de mortes relacionadas a LV no mundo é agravado pela deficiência de medidas de controle, migração e imunodeficiência (BEZERRA *et al.*, 2019).

Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* são diferentes espécies de flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na Europa (MEINECKE *et al.*, 1999). A transmissão do parasito ocorre somente através da fêmea do inseto, popularmente conhecido como mosquito-palha, que apresenta hábito hemofágico, uma vez que esta necessita realizar o repasto sanguíneo para obter sangue para a maturação de seus ovos, transmitindo as formas infectantes do protozoário ao organismo vertebrado. Dessa forma, quando uma fêmea do mosquito se alimenta de um indivíduo com leishmaniose, esta ingere macrófagos infectados com formas amastigotas. Estas se transformam em promastigotas ao chegar no trato digestório do inseto. Ao realizar o repasto sanguíneo em outros vertebrados, a fêmea inocula saliva junto com essas formas promastigotas. Uma vez no organismo daquele, tais formas são fagocitadas pelos macrófagos, perdendo seus flagelos e residindo na forma de amastigotas quando então são encontradas nos tecidos (GUSHI, 2008).

As mudanças ambientais que ocorrem atualmente, juntamente com a migração de humanos e animais têm aumentado significativamente a dispersão de parasitos (JANSEN *et al.*, 2018). No Brasil, o número de animais infectados no ambiente urbano e silvestre recebe destaque, uma vez que o desmatamento e as adaptações comportamentais dos vetores e reservatórios têm contribuído para a expansão da doença no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2015).

Ainda, a ação antrópica sobre as populações de animais silvestres tem contribuído para a transmissão dessas zoonoses para os seres humanos. O tráfico ilegal de animais silvestres, incluindo diversas espécies de primatas, contribuem para o contato dos seres humanos com doenças como leishmanioses e doença de Chagas. Os traficantes de animais não são conscientes sobre o risco que correm, assim como a ameaça à saúde pública que esta atividade

ilegal consiste. Estudos realizados em animais resgatados do tráfico demonstram que estes podem funcionar como bioindicadores em relação à situação sanitária de seus ecossistemas e, assim como grande parte da fauna silvestre brasileira, podem ser reservatórios para diversas zoonoses e tornando-se o elo responsável pela migração dessas doenças do ambiente silvestre para o ambiente urbano (LIMA *et al.*, 2021).

Diversas espécies de mamíferos estão envolvidas no ciclo enzoótico das leishmanioses, incluindo os primatas não humanos, principalmente aqueles pertencentes à família Cebidae, como o macaco da espécie *Cebus apella* que, na Amazônia, está relacionado à *Leishmania (Viannia) shawi*, parasito causador da leishmaniose tegumentar (CARNEIRO *et al.*, 2011). Na cidade de Bauru, São Paulo, 37 primatas dos gêneros *Alouatta*; *Ateles*; *Cebus*; *Lagothrix*; *Erythrocebus*; *Mandrillus* e *Papio*, apresentaram similaridade com o gênero *Trypanosoma* spp. a partir da amplificação na PCR para a família Trypanosomatidae e sequenciamento genético; além de um animal da espécie *Erythrocebus pata* reagente na técnica de RIFI para *Leishmania braziliensis* com título 160, enfatizando a necessidade de controle da doença, sobretudo em áreas endêmicas, a fim de se conservar a fauna silvestre que também é mantida em cativeiro (GUIRALDI, 2016).

O gênero *Trypanosoma* apresenta parasitos que podem ser classificados nos grupos Salivaria ou Stercoraria (LUKES, 2009b). O primeiro grupo se refere a tripanosomas que apresentam parte de seu ciclo de vida no interior das glândulas salivares de insetos vetores, principalmente em dípteros, sendo transmitidos via repasto sanguíneo desses vetores. Enquanto isso, o segundo grupo apresenta protozoários transmitidos pelo conteúdo fecal ou urina de triatomíneos, estes popularmente conhecidos como “barbeiros”, onde a transmissão ocorre após o repasto sanguíneo (STEVENS, GIBSON, 1999). Após o repasto sanguíneo dos triatomíneos e a liberação das fezes, os tripanosomas atingem a corrente sanguínea do vertebrado pela abertura na pele feita pelo vetor durante o repasto. Neste grupo, um dos tripanosomas mais conhecidos é *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2016a).

É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das 18 doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2016b), apresentando em torno de seis a sete milhões de pessoas infectadas em toda a América Latina, sendo que somente no Brasil são cerca de três milhões (WHO, 2015). Na América Latina, o número de mortes anualmente é de 12.000 a

14.000, aproximadamente (MIRANDA *et al.*, 2019). A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a primeira, chamada de fase aguda, que é caracterizada por uma alta parasitemia no sangue, onde o parasita se multiplica e infecta macrófagos, fibroblastos e células musculares; a segunda fase é chamada de crônica, onde com o passar dos anos pode ocorrer a manifestação de sintomas, como a cardiomiopatia chagásica, sintoma clínico mais frequente e fatal (SERENO *et al.*, 2020).

Como observado por Terry (1911) e Souza *et al.* (1974), várias espécies de primatas apresentam tripanosomas semelhantes a *T. cruzi*. O primata da espécie *Cebus apella* apresenta alta susceptibilidade de infecção pelo *T. cruzi* (CHAIA *et al.*, 1976). Diversas espécies de tripanosomas têm sido identificadas a partir de amostras de sangue de primatas, durante estudos realizados na última década, evidenciando como esses animais se infectam com esses parasitos facilmente no meio ambiente (LISBOA *et al.*, 2006; TENÓRIO *et al.*, 2014).

As estratégias de dispersão do parasito *Trypanosoma cruzi* ainda são estudadas, apesar de já serem conhecidos diversos meios de infecção. Além da transmissão vetorial, meios de transmissão alternativos podem ser responsáveis por manter um ciclo de infecção estabelecido no ambiente silvestre. Os primatas não humanos estão susceptíveis a diversas rotas de infecção, como a realização do repasto sanguíneo pelos vetores nesses indivíduos, deixando suas fezes infectadas no local da picada, ou então, uma forma muito comum é a ingestão dos insetos vetores pelos próprios primatas, com a finalidade de alimentação, possibilitando a sua infecção por via oral (ROVIROSA-HERNANDEZ *et al.*, 2021).

Diversas espécies do inseto vetor triatomíneo podem transmitir os tripanosomas, variando de acordo com a região onde se encontram (WHO, 2016a; CDC, 2016). O principal vetor da doença de Chagas no Brasil foi, por anos, *Triatoma infestans*. O barbeiro foi associado à transmissão da doença de Chagas no Brasil já nos primeiros anos do século XX (NEIVA, 1913). O vetor *T. infestans* foi virtualmente eliminado do Brasil em 2006 (FERREIRA; SILVA, 2006), porém, ainda existem mais de 60 espécies de triatomíneos identificados (FIOCRUZ, 2014), se destacando *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*, vetores triatomíneos de grande importância epidemiológica (COURA, 2003). As espécies *P. megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma sordida* têm se adaptado ao domicílio e peridomicílio, devido ao desequilíbrio ecológico,

apesar de serem triatomíneos de origem silvestre; da mesma forma que os animais silvestres, que também são cada vez mais encontrados nas cidades (SILVA *et al.*, 2019).

Além da transmissão vetorial, outra forma de transmissão conhecida é através da transfusão sanguínea (FONG *et al.*, 2014). Em relação aos países não endêmicos para a tripanossomíase a transmissão ocorre principalmente por transplante de órgãos sólidos (HUPRIKAR *et al.*, 2013). Além disso, outra forma de transmissão registrada é a congênita, apresentando cerca de 15 mil casos por ano na América Latina, sendo que 5% dos nascimentos são provenientes de mães com a doença crônica (CARLIER *et al.*, 2015). Ademais, outra forma comum de transmissão é pela ingestão de fezes e/ou urina de barbeiros contendo as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, encontradas em alimentos contaminados, como a polpa de açaí, ocasionando a doença de Chagas aguda (BARBOSA *et al.*, 2012; ZAPPAROLI *et al.*, 2022).

Atualmente, o menor número de mamíferos infectados é encontrado no bioma Cerrado, enquanto a maior região de infecção por *T. cruzi* é a correspondente ao bioma Amazônia, fato que está diretamente relacionado com a biodiversidade e composição da fauna em determinada área (JANSEN *et al.*, 2018). Com a degradação ambiental provocada pelo homem, como práticas agropecuárias e o avanço urbano nas áreas rurais, os tripanosomas, principalmente *T. cruzi*, que antes restringiam-se ao ciclo silvestre, passaram a ter seus vetores invadindo habitações humanas, alimentando-se do sangue de animais domésticos do peridomicílio, como cães, gatos, caprinos, ovinos e principalmente aves, como galinhas, além do próprio homem (BARRETO, 1967; COURA, 2013). O repasto sanguíneo realizados em animais da família Didelphidae, como gambás, contribui para a manutenção de reservatórios nas cidades, uma vez que estes apresentam alta susceptibilidade de infecção natural por *T. cruzi*. Dessa forma, a presença desses marsupiais infectados com *T. cruzi* no ambiente doméstico torna-se uma ameaça de infecção para a população (BEZERRA *et al.*, 2019). Por ser uma doença negligenciada, a doença de Chagas afeta, principalmente, comunidades de alta vulnerabilidade social, que apresentam baixa renda, moradia e condições de higiene precárias, além de baixos níveis de escolaridade (MIRANDA *et al.*, 2019).

Além da infecção por uma das zoonoses apresentadas anteriormente, vale ressaltar a possibilidade de ocorrência de coinfeções, ocorridas em áreas endêmicas para ambos os gêneros de parasitos aqui abordados. A prevalência de cada uma das doenças pode mudar de

acordo com a biodiversidade da região e localização geográfica da área de endemismo; os estudos de coinfeção podem auxiliar no reconhecimento de potenciais reservatórios do parasito e auxiliar nos programas de controle de ambas as doenças (VIETTRI *et al.*, 2018).

No Brasil, são encontrados 19 gêneros de primatas, cerca de 130 espécies, distribuídas em cinco famílias, sendo um dos países com o maior número de primatas conhecidos. O bioma Amazônia é o que possui mais primatas representantes, com mais de 90 espécies, seguido da Mata Atlântica, com 24 espécies, Caatinga com sete e o Cerrado, com cinco espécies (PAGLIA *et al.*, 2012). Dos parasitos relatados entre os primatas não humanos de região tropical, os tripanosomas são os mais frequentes (ZICCARDI *et al.*, 2000), e os primatas das Américas são naturalmente susceptíveis à doença (PHILIPP; PURCELL, 2005). Primatas naturalmente infectados por *T. cruzi* foram identificados na Reserva Biológica de Poço das Antas, no Estado do Rio de Janeiro por Lisboa *et al.* (2000), onde mais da metade dos 118 micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia*) apresentaram títulos de até 1280 em técnica sorológica. Ademais, 38 do total de primatas amostrados tiveram o parasito isolado, indicando a circulação do mesmo no meio próximo ao perímetro urbano. A presença de *T. cruzi* em animais silvestres, incluindo primatas, também foram registradas em outros estudos (BARRETT *et al.*, 1979; ROQUE *et al.*, 2013).

Animais de cativeiro são monitorados constantemente e se encontram mais protegidos do meio silvestre, porém ainda podem ser infectados por diversos parasitos, incluindo tripanosomas. Nos Estados Unidos da América, no Estado do Texas, um estudo procurou verificar a causa mortis de primatas diagnosticados com miocardite linfocítica e, a partir da PCR de tecido cardíaco em parafina, constatou que babuínos e macacos cinomolgus (*Macaca fascicularis*) estavam infectados por *T. cruzi* (MUBIRU *et al.*, 2014). Durante a rotina de um Zoológico, os primatas são constantemente manipulados, de forma que é possível a coleta de sangue sem causar estresse desnecessário a esses animais. Entretanto, devido às leis ambientais de proteção aos animais silvestres em cativeiro, é inviável a realização de técnicas cirúrgicas ou procedimentos invasivos, como biópsias para realização de exames, por isso, a utilização do suabe conjuntival para colheita de células e pesquisa do DNA parasitário, vem ao encontro desta necessidade.

O Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, localizado em Sorocaba, no interior do Estado, está inserido em uma grande área de vegetação de Mata Atlântica, habitat

natural para diversos vetores, incluindo flebotomíneos (VEXENATE *et al.*, 1986). Com uma área de aproximadamente 128 mil m², apresenta quase 39 mil m² de Mata Atlântica de transição em estágio secundário, onde são encontrados bugios, saguis, gambás, cutias, entre outros. Inaugurado em 1968, o Zoo recebe 600 mil visitantes por ano, além de mais de 90 mil alunos, de escolas públicas e privadas, provenientes de 80 cidades do entorno da região. Cerca de 70% dos 1400 animais do Zoológico são pertencentes à fauna nacional; conta com 353 espécies, e destas, 36 são ameaçadas de extinção. É referência na América Latina no quesito lazer, pesquisa, preservação e Educação Ambiental, cujo programa é pioneiro no país.

2 OBJETIVOS

Pesquisar a presença de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em primatas não humanos procedentes do Zoológico de Sorocaba (SP), com o uso da técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* e pela amplificação do DNA do protozoário a partir de amostras de sangue e de suabe conjuntival, realizando-se a prova molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR), com o uso de *primers* gerais para a família Tripanosomatidae e específicos para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, possibilitando a identificação da espécie do parasito. Sendo assim, com esse estudo, propõe-se demonstrar a situação epidemiológica destas zoonoses no local, a fim de se identificar o papel destes primatas como reservatórios de leishmanias e/ou tripanosomas e, frente aos resultados obtidos, propor-se medidas preventivas para diminuição do risco de transmissão das doenças no local, como controle de vetores e manejo sanitário do ambiente, para que seja realizada uma vigilância epidemiológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência dos animais

Os primatas que estão sendo estudados nesta pesquisa estão locados no Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, mais conhecido como Zoológico de Sorocaba, localizado na Região Sudeste, situado na Rua Teodoro Kaisel, número 883, Vila Hortência, na cidade de Sorocaba, no estado de São Paulo, nas coordenadas 23° 30' 24.3" S, 47° 26' 14.2" O.



Figura 1. Entrada do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).

3.2 Animais da pesquisa

Foram utilizados 48 primatas de 15 espécies diferentes, de ambos os sexos e de diferentes idades, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1. Relação de primatas cujo sangue foi coletado para a realização da pesquisa:

Nome Científico	Nome Popular	Número de animais
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	5
<i>Alouatta guariba</i>	Bugio-ruivo	4
<i>Alouatta seniculus</i>	Bugio-vermelho	3
<i>Aotus trivirgatus</i>	Macaco-da-noite	2
<i>Ateles chamek</i>	Macaco-aranha-de-cara-preta	3
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-aranha-de-testa-branca	11
<i>Brachyteles arachnoides</i>	Muriqui-do-sul	4
<i>Callicebus vierai</i>	Zogue-Zogue	4
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufo-branco	1
<i>Cebus olivaceus</i>	Cairara	1
<i>Chiropotes utahickae</i>	Cuxiú	1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico-leão-de-cara-dourada	3
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno-sagrado	2
<i>Sapajus nigritus</i>	Macaco-prego-preto	2
<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo	2
Total		48

As figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam alguns dos primatas do Zoológico de Sorocaba que foram utilizados no presente trabalho.

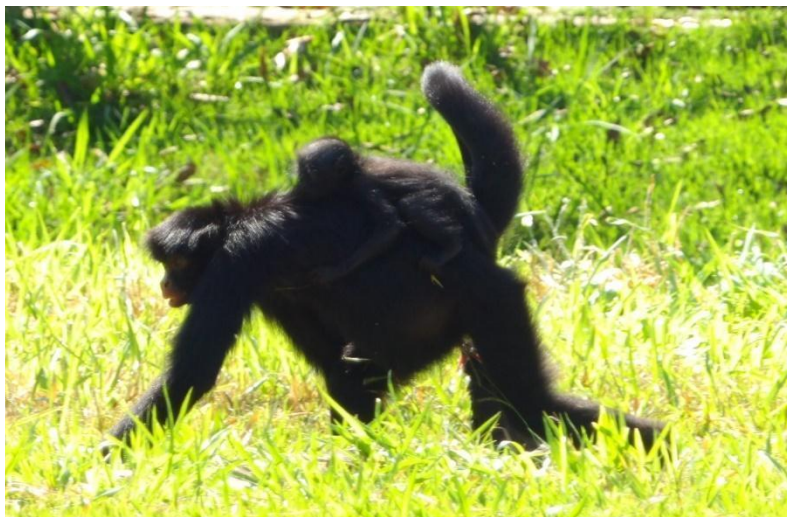


Figura 2. Macaco-aranha-de-cara-preta (*Ateles chamek*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).



Figura 3. Macaco-aranha-de-testa-branca (*Ateles marginatus*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).

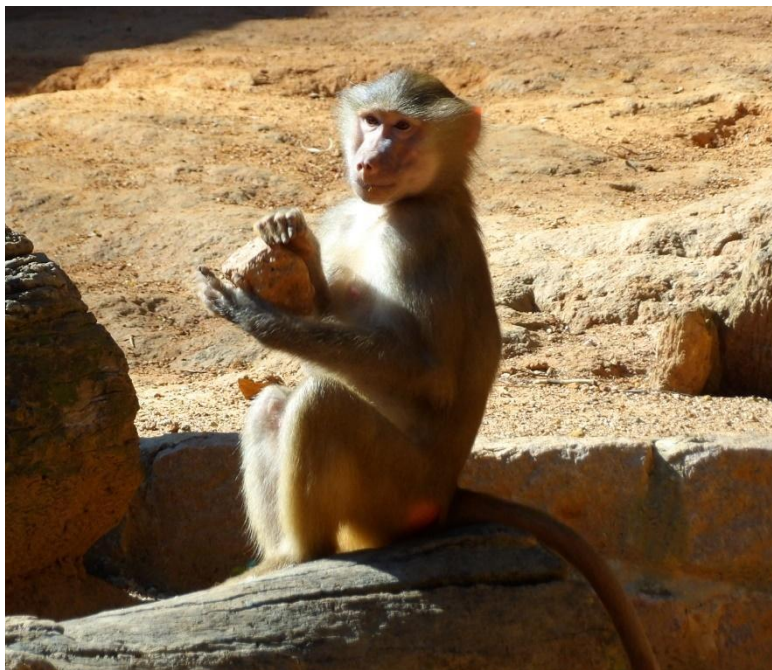


Figura 4. Babuíno-sagrado (*Papio hamadryas*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).



Figura 5. Mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).



Figura 6. Macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).

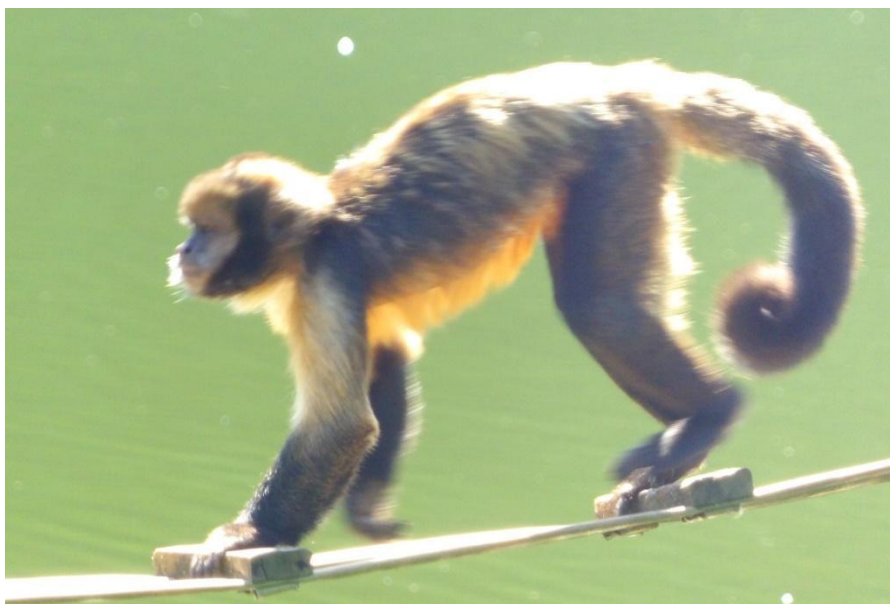


Figura 7. Macaco-prego-do-peito-amarelo (*Sapajus xanthosternus*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).

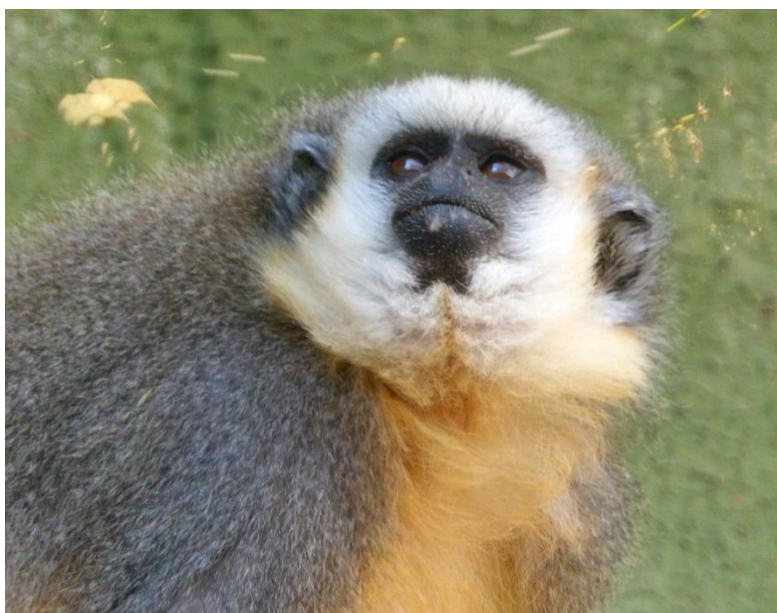


Figura 8. Zogue-zogue (*Callicebus vieraí*) do Zoológico de Sorocaba.

Fonte: SANTOS, W. J (Acervo pessoal).

Na maioria dos primatas que foram submetidos ao exame de rotina, juntamente com a punção venosa, foi possível extrair também uma alíquota para a obtenção de soro e a secreção a partir de suabe conjuntival. Entretanto, devido à dificuldade de manejo de alguns dos animais não foi possível a colheita de todas as amostras; portanto, visando o bem-estar do animal, algumas amostras não foram coletadas de alguns animais: dos 48 animais, em quatro (04) deles não foi possível a obtenção de soro e em três (03) não foi possível a obtenção do suabe (Tabela 2).

Tabela 2. Animais cuja coleta de algum material não foi possível de ser realizada.

Animal	Espécie	Amostra não coletada	ID
1	<i>Alouatta caraya</i>	Suabe	SP01
2	<i>Alouatta caraya</i>	Suabe	SP02
3	<i>Ateles marginatus</i>	Soro	SP14
4	<i>Leontopithecus crysomelas</i>	Soro	SP37
5	<i>Leontopithecus crysomelas</i>	Soro	SP38
6	<i>Leontopithecus crysomelas</i>	Soro	SP39
7	<i>Papio hamadryas</i>	Suabe	SP40

3.3 Coleta de sangue e células conjuntivais

O veterinário responsável pelo Zoológico conduziu os primatas não humanos para a área de cambiamento dos seus respectivos recintos, onde foram contidos, separadamente, com o auxílio de um puçá. Foi utilizada uma zarabatana para a aplicação do anestésico Ketamina, na proporção de 10mg por quilograma de peso do animal. Após esse processo, o animal anestesiado foi encaminhado ao centro cirúrgico do Zoológico para manipulação de rotina.

A coleta do sangue ocorreu quando houve a necessidade de manejo do animal, e foi realizada por punção venosa periférica, após a assepsia com álcool 70%, também realizada pelo veterinário responsável. Uma alíquota do sangue coletado foi acondicionada em tubos vacutainer® contendo EDTA, para a realização da técnica molecular de PCR para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.; uma segunda alíquota foi destinada para tubo seco, para obtenção do soro e realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*.

A coleta das células conjuntivais foi realizada após a coleta do sangue, utilizando-se um suabe estéril, que foi friccionado delicadamente na conjuntiva de um dos olhos e acondicionado em microtubo estéril livre de DNase e RNase; em sequência o mesmo procedimento se repetiu para o outro olho. Após o manejo de rotina, o animal foi acompanhado pela equipe do Zoológico até transcorrer o tempo de ação do anestésico, sendo conduzido em seguida para seu recinto. Uma vez que as amostras foram obtidas no próprio zoológico, as mesmas foram acondicionadas em meio refrigerado e imediatamente enviadas ao laboratório via transportadora para a realização da sorologia e dos testes moleculares.

3.4 Local de realização dos exames

Os procedimentos laboratoriais para os exames sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. a partir das amostras de sangue e suabe conjuntival foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – Polo Centro-Oeste, na cidade de Bauru, São Paulo.

3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*

Para a realização da técnica sorológica foram utilizados como antígenos formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa “Y”), mantidos em tubos rosqueados contendo 5 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN), em estufa B.O.D. a 25°C, repicados quinzenalmente. Para cada parasito, em capela de fluxo laminar, foi retirada uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes, repicados na semana anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40 vezes, para avaliação do crescimento das formas promastigotas em *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* e as formas tripomastigotas em *Trypanosoma cruzi*. Do tubo que apresentou parasitos com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 25°C. Após a verificação do crescimento de promastigotas e tripomastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foram adicionados de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando se obteve de 20 a 30 parasitos por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas de antígeno foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas das espécies do gênero *Leishmania* e o mesmo volume da suspensão de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso. Foi utilizado conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de macaco (Sigma Co., St. Louis, USA), estabelecendo-se como triagem de animais positivos um ponto de corte a partir da diluição 1:40. A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966).

3.6 Exames moleculares

3.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA a partir das amostras de sangue e suabe conjuntival foi realizada com Kit comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen® Scientific®, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Anteriormente à extração do suabe conjuntival foi aplicado uma solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 no tubo contendo o suabe e este ficou em imersão por cerca de 30 minutos na capela de fluxo laminar com a luz UV ligada, a fim de auxiliar o desprendimento do possível parasito do suabe.

3.6.2 Quantificação do DNA

Todas as amostras foram submetidas à quantificação do DNA, utilizando-se o aparelho Quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK, a fim de se verificar a quantidade de DNA em cada amostra.

3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de sangue e suabe conjuntival para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.

Para a realização da cPCR cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1U de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,2μM de cada *primer*, 1μL da amostra testada e 8,3μL de água ultrapura (MIX-PCR), de forma que cada tubo apresentou 11μL do MIX-PCR e 1μL de DNA extraído de cada uma das amostras de sangue e suabe conjuntival.

Inicialmente, foi realizada uma cPCR para amplificação de uma região conservada do gene constitutivo β-globulina para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído e a ausência de inibidores nas amostras, com a utilização dos *primers* β-1 e β-2, que amplificam a betaglobulina do DNA nuclear de vertebrados, e perfil de ciclagem de acordo com Edvinsson (2006), com modificações.

Para a pesquisa na família Trypanosomatidae foi realizada a amplificação da região SSU rDNA (V7-V8) para a família Trypanosomatidae, segundo Noyes *et al.* (1999). Mais especificamente, para a pesquisa do gênero *Leishmania*, foi realizada a cPCR para a amplificação do kDNA do complexo *Leishmania braziliensis*, utilizando-se os *primers*

B1/B2, segundo De Bruijn e Barker (1992). Foi também realizada a PCR com os *primers* LCS1/LCS3, amplificação da região 18S rRNA de *Leishmania infantum*, segundo Neto *et al.* (2012). Para o gênero *Trypanosoma*, foi realizada a amplificação do kDNA de *Trypanosoma cruzi*, empregando-se os *primers* 121/122, segundo Viettri *et al.* (2018), com protocolo adaptado.

As condições de amplificação em termociclador (AB Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) dos *primers* utilizados na pesquisa estão expostos no Quadro 1:

Quadro 1. *Primers* que foram utilizados com seus respectivos perfis de ciclagem.

Amplificação	Primer	Ciclo	Referência
β -globulina (β -1 e β -2)	β -1: 5'ACCACCAACTTCATCCACGTTCA C 3' β -2: 5' CTTCTGACACAACCTGTGTTCCTA GC 3'	1x 95°C - 50 min; 30x (95°C - 30 s; 60°C - 30 s; 72°C - 30 s); 1x 72°C - 5 min	EDVINSSON, 2006.
Família Trypanosomatidae (V7-V8)	SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3' SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3'	30x (94°C - 30s; 54°C - 1 min; 72°C - 2 min)	NOYES <i>et al.</i> , 1999.
Complexo <i>Leishmania</i> <i>braziliensis</i> (B1/B2)	B1: 5'GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG3' B2: 5'CTAATTGTGCACGGGGAGG3'	1x 96°C - 6 min; 30x (93°C - 30s; 67°C - 1 min; 72°C - 1 min)	DE BRUIJN; BARKER, 1992.
<i>Leishmania infantum</i> (LCS1/LCS3)	LCS1: 5'GCAATGCCAGCTACATATATG3' LCS3: 5'CAGCTTTTGGGTGGGTAACA3'	1x 94°C - 2 min; 40x (94°C - 30s; 56°C - 30s; 72°C - 1 min); 1x 72°C - 2 min	NETO <i>et al.</i> , 2012.
<i>Trypanosoma cruzi</i> (121/122)	121: 5'AAATAATGTACGGGTGAGATGCA TGA3' 122: 5'GGGT TCGATTGGGGTTGGTGT3'	1x 94 °C - 3min; 35x (94 °C - 30s; 57 °C - 30s; 72 °C - 30s); 1x 72 °C - 7min	VIETTRI <i>et</i> <i>al.</i> , 2018.

3.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização da amplificação dos produtos após a cPCR, foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen) 0,1µL/mL. Aliquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A voltagem utilizada foi de 100V por 50 minutos. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen), a fim de se comparar visualmente o tamanho dos fragmentos amplificados com os padrões de peso molecular das cepas utilizadas como controles positivos, utilizando-se do transluminador Syngene.

3.6.5 Controles

Para o controle negativo foi utilizada a água mili-Q estéril, enquanto para os controles positivos foram usados os produtos da extração de DNA de cepas mantidas em meio NNN-LIT, sob cultivo em estufa B.O.D. a 25°C, repicadas quinzenalmente, das espécies *Leishmania infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/IOC/L0566) e *Trypanosoma cruzi* (Cepa “Y”).

3.6.6 Análise estatística

As análises estatísticas descritivas foram calculadas usando o software Excel (Microsoft), comparando-se a porcentagem de positivos e negativos para os diferentes *primers*, a partir da técnica molecular cPCR para sangue e suabe conjuntival e a porcentagem de reagentes e não reagentes para a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*

A técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* apresentou todas as amostras não reagentes para

todos os antígenos testados (Figura 9). Os procedimentos de sensibilização das lâminas foram registrados como mostrado nas figuras 10 e 11.

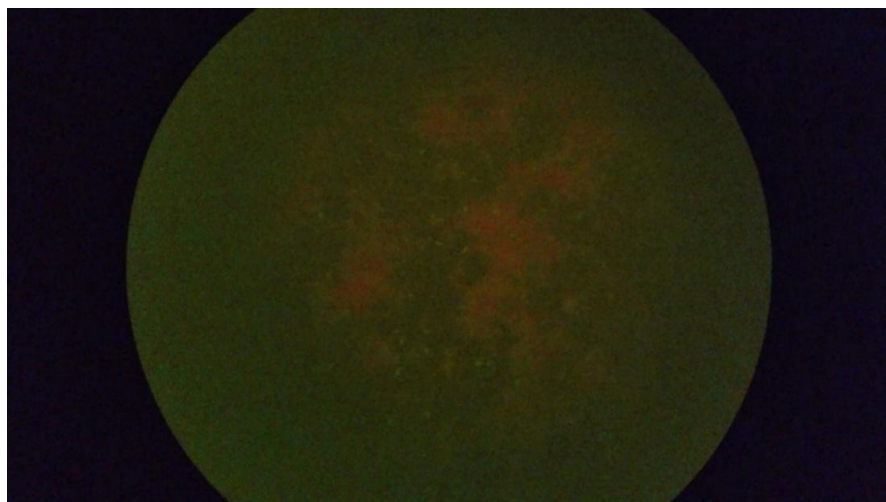


Figura 9. Resultado não reagente à técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*. Aumento 10X.

Fonte: Acervo pessoal.



Figura 10. Centrifugação de culturas de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* em meio LIT para obtenção de promastigotas/epimastigotas.

Fonte. Acervo pessoal.



Figura 11. Sensibilização de lâminas de Imunofluorescência com *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Acervo pessoal

Os resultados do teste de RIFI evidenciaram todos os primatas não reagentes a *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Ainda que não se tenha observado sintomas característicos de leishmaniose nos animais avaliados ao momento da coleta de sangue e que todos os animais tenham sido não reagentes à RIFI, a aplicação de outras provas diagnósticas, como técnicas moleculares, é necessária para uma avaliação diagnóstica mais precisa, como poderemos observar com os resultados obtidos às provas moleculares.

4.2 Exames moleculares

4.2.1 Quantificação das amostras

As amostras extraídas foram submetidas à quantificação do DNA, obtendo-se os dados sobre a qualidade do mesmo, como mostram as Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Quantificação do DNA extraído a partir de 48 amostras de sangue de primatas, procedentes do Zoológico de Sorocaba – SP.

AMOSTRA (TUBO)	RELAÇÃO 260/280	[] DNA (µg/ml)
SP01	1,773	39,0

SP02	1,756	-3,6
SP03	1,808	47,0
SP04	2,055	14,9
SP05	1,817	54,5
SP06	1,777	21,5
SP07	1,792	27,5
SP08	1,860	26,5
SP09	1,872	36,5
SP10	1,786	20,0
SP11	1,706	4,4
SP12	1,893	53,0
SP13	1,724	25,0
SP14	1,676	31,0
SP15	1,743	6,5
SP16	1,780	89,0
SP17	1,923	14,9
SP18	1,753	67,5
SP19	1,693	63,5
SP20	1,860	53,0
SP21	1,853	63,0
SP22	1,889	34,0

SP23	1,798	89,0
SP24	1,810	20,0
SP25	1,730	86,5
SP26	1,819	95,5
SP27	1,776	103,0
SP28	1,842	70,0
SP29	1,829	128,0
SP30	1,882	71,5
SP31	1,910	64,0
SP32	1,810	43,0
SP33	1,867	56,0
SP34	1,889	76,5
SP35	1,699	70,5
SP36	1,930	43,5
SP37	1,949	38,0
SP38	1,913	44,0
SP39	1,919	35,5
SP40	2,203	19,5
SP41	1,819	52,0
SP42	1,873	59,0
SP43	0,692	1,4

SP44	1,176	3,0
SP45	1,755	28,0
SP46	1,450	19,5
SP47	1,790	55,5
SP48	1,583	28,5

Tabela 4. Quantificação do DNA extraído a partir de 48 amostras de suabe conjuntival de primatas, procedentes do Zoológico de Sorocaba – SP.

AMOSTRA (TUBO)	RELAÇÃO 260/280	[] DNA (µg/ml)
SP 01	-	-
SP 02	-	-
SP 03	1,667	11,0
SP 04	2,120	10,6
SP 05	2,113	5,6
SP 06	2,427	10,0
SP 07	3,405	6,3
SP 08	2,033	9,2
SP 09	2,078	6,7
SP 10	2,235	9,1
SP 11	3,049	6,2

SP 12	5,167	4,7
SP 13	1,526	59,5
SP 14	9,286	3,3
SP 15	5,750	4,6
SP 16	5,417	3,3
SP 17	2,419	8,9
SP 18	6,833	4,1
SP 19	1,956	6,7
SP 20	3,229	7,8
SP 21	4,731	6,2
SP 22	2,081	7,7
SP 23	3,957	4,6
SP 24	2,304	10,6
SP 25	2,679	7,1
SP 26	2,306	8,3
SP 27	1,969	12,8
SP 28	2,750	6,1
SP 29	2,453	9,2
SP 30	2,435	5,6
SP 31	8,714	30,5

SP 32	3,208	3,9
SP 33	2,152	5,0
SP 34	1,864	13,7
SP 35	5,000	2,0
SP 36	2,231	2,9
SP 37	1,943	6,8
SP 38	1,456	57,5
SP 39	2,578	5,8
SP 40	-	-
SP 41	1,794	12,2
SP 42	1,949	7,6
SP 43	2,011	9,6
SP 44	1,839	5,7
SP 45	1,871	6,6
SP 46	1,852	5,7
SP 47	2,213	8,3
SP 48	1,602	16,5

Legenda: - sem leitura por ausência de material.

4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese a partir de amostras de sangue

4.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* β -1 e β -2 (140pb)

Os *primers* β -1 e β -2 foram utilizados para a amplificação do gene de β -globulina para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído. Todas as amostras foram corretamente extraídas e amplificaram na eletroforese (Figura 12).



Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores β -1 e β -2 (140pb) para verificar a qualidade de amplificação do DNA extraído. Marcador de peso molecular 100pb; 26 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb)

Foi realizada a corrida eletroforética das 48 amostras dos primatas, sendo todas negativas para a família Trypanosomatidae com o uso dos *primers* 561F/561R (Figura 13).

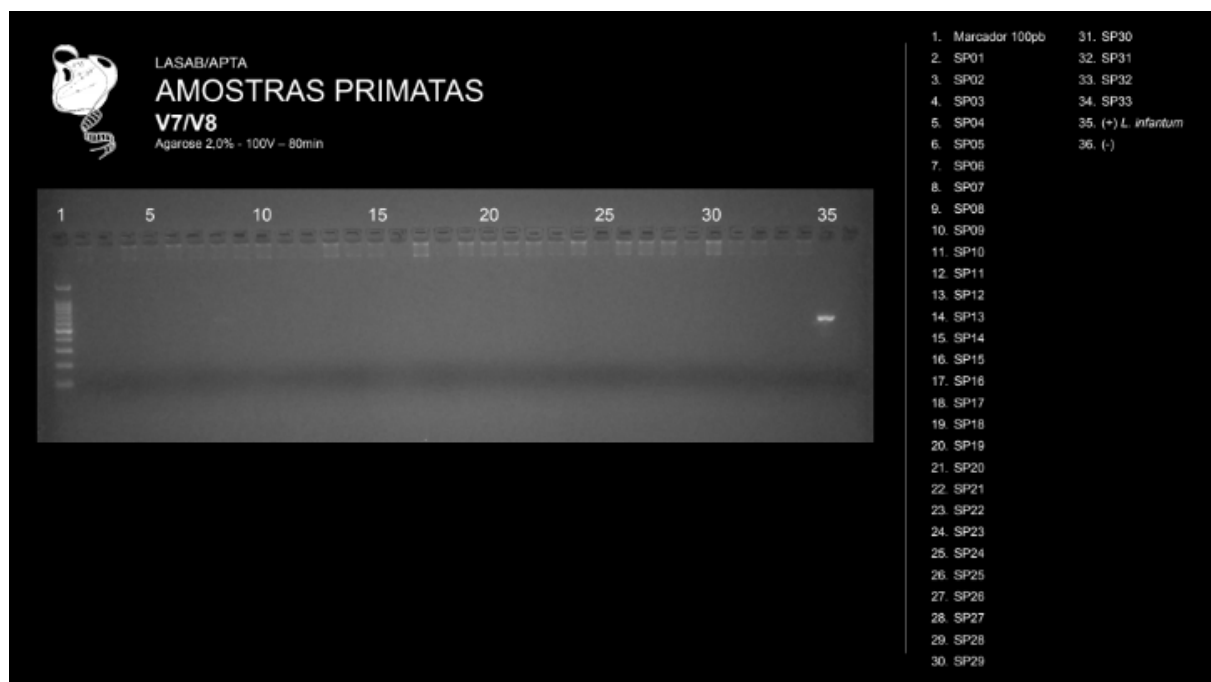


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 561F e 561R (700pb) para a família Trypanosomatidae. Marcador de peso molecular 100pb; 35 - controle positivo (*Leishmania infantum*); 36 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* B1/B2 (*Leishmania braziliensis*) (800pb)

Os *primers* B1/B2 para kDNA do complexo *Leishmania braziliensis*, segundo Bruijn e Barker (1992) foram utilizados para as amostras do Zoológico de Sorocaba, apresentando quatro (04) amostras amplificadas na corrida eletroforética. As amostras SP01, SP02, SP03 e SP10 foram amplificadas (Figura 14), sendo que todas sugerem uma possível infecção por *Leishmania braziliensis*. As primeiras três amostras (SP01, SP02 e SP03) correspondem a espécie *Alouatta caraya*, conhecido como bugio-preto, e a amostra SP10 corresponde a um primata da espécie *Ateles chamek*, um macaco-aranha-de-cara-preta. Os indivíduos dessa última espécie localizam-se em uma ilha rodeada por um grande lago, com vegetação muito densa, composta por árvores, em uma das margens deste (Figura 15).



Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores B1 e B2 (800pb) para a espécie *Leishmania braziliensis*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 2, 3, 4 e 11 - amostras amplificadas; 35 - controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 36 - controle negativo (água ultra pura).



Figura 15. Ilha dos primatas da espécie *Ateles chamek* no Zoológico de Sorocaba. Nota-se o grande lago ao redor, com vegetação densa ao fundo.

Fonte: acervo pessoal.

O local é aberto, possibilitando a circulação de uma grande quantidade de aves, como patos, tanto no lago ao redor como na ilha junto com os primatas (Figura 16). A presença destas aves possibilita uma grande quantidade de matéria orgânica no local pelas fezes acumuladas, o que pode permitir a atração de flebotomíneos ao local.



Figura 16. Fêmea com filhote em recinto do Zoológico de Sorocaba. Nota-se a presença de um pato no lado esquerdo da foto, ao fundo.

Fonte: Acervo pessoal.

É de grande importância para o estudo analisar os recintos em que estes animais estão inseridos, se são protegidos por vidros, telas ou completamente abertos, uma vez que os animais cujas amostras de sangue foram amplificadas podem ter se infectado no local devido a presença de insetos vetores, como flebotomíneos. A colocação de armadilhas para vetores de zoonoses como a leishmaniose e a doença de Chagas é uma atividade que deveria ser implementada no Zoológico de Sorocaba, já que muitos recintos são abertos e rodeados por vegetação nativa, permitindo a livre circulação desses insetos. Além disso, a presença de

animais infectados por tripanosomatídeos revela essa necessidade, pois podem servir de fonte de repasto sanguíneo para vetores que podem acabar infectando outros animais, os tratadores e o público visitante do Zoológico.

4.2.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* LCS1/LCS3 (*Leishmania infantum*) (259pb)

Das 48 amostras de sangue testadas para os *primers* LCS1/LCS3, específicos para *Leishmania infantum*, uma foi amplificada (Figura 17). A amostra SP47 é de um primata da espécie *Callicebus vieirai*, conhecida como de zogue-zogue.



Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores LCS1 e LCS3 (259pb) para a espécie *Leishmania infantum*. Marcador de peso molecular 100pb. Coluna 17 - amostra amplificada; coluna 19 - controle positivo (*Leishmania infantum*); coluna 20 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* 121/122 (*Trypanosoma cruzi*) (350pb)

A utilização dos *primers* 121/122 também apresentou-se bem sucedida na detecção de amostras infectadas pelo parasito da espécie *Trypanosoma cruzi*. Das 48 amostras utilizadas

na pesquisa, três (03) amplificaram fortemente com o uso deste *primer*, tratando-se das amostras SP09, SP10 e SP11, além de uma amostra fracamente amplificada, a SP02 (Figura 17). Uma análise relevante é que tanto a amostra SP02 quanto a SP10 também amplificaram com o uso dos *primers* B1/B2 para *Leishmania braziliensis*, podendo indicar que há nestes indivíduos uma co-infecção por *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Essas amostras amplificadas correspondem a um bugio-preto, da espécie *Alouatta caraya* (SP02), e as três últimas a primatas da espécie *Ateles chamek*, popularmente conhecido como macaco-aranha-de-cara-preta (SP09, SP10 e SP11). A amplificação de três amostras de primatas localizados em um mesmo recinto, sugere que este apresenta uma quantidade elevada de indivíduos infectados por tripanosomatídeos, fato alarmante para a saúde desses animais e dos seres humanos que transitam pelo local.

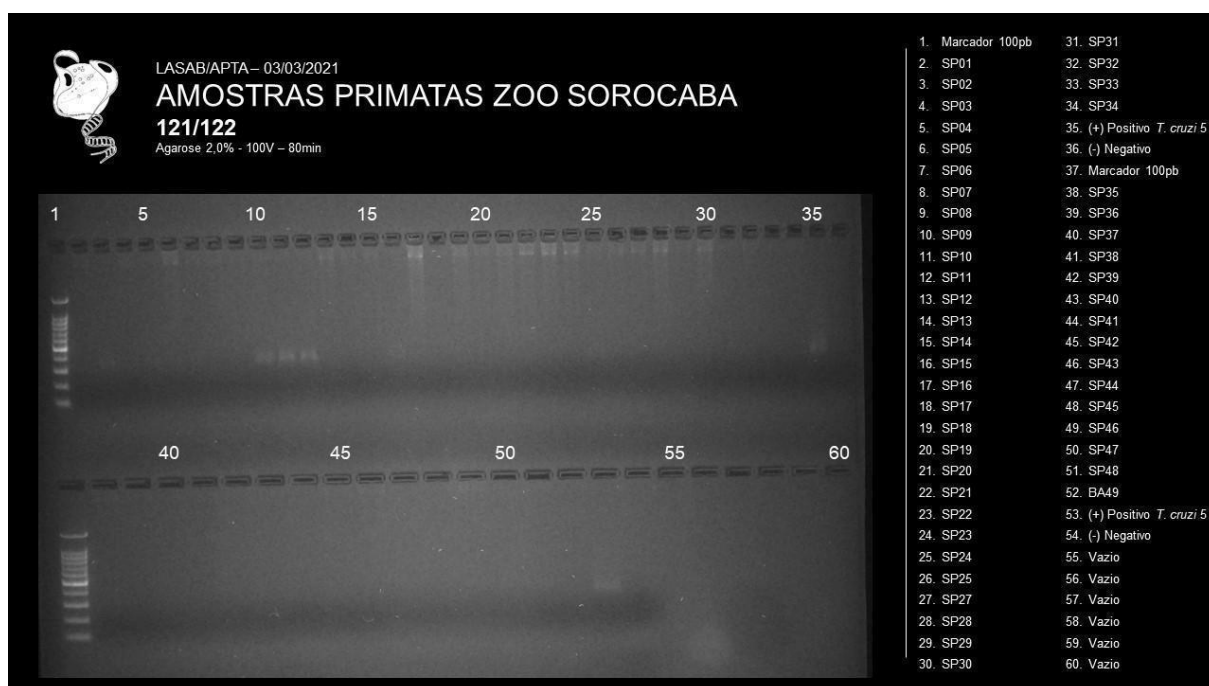


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 121 e 122 (350pb) para a espécie *Trypanosoma cruzi*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 3, 10, 11 e 12 - amostras amplificadas; 35 e 53 - controles positivos (*Trypanosoma cruzi*); 36 e 54 - controles negativos (água ultra pura).

4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese a partir das amostras de suabe conjuntival

4.2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* β -1 e β -2 (140pb)

Após a quantificação do DNA extraído das amostras de suabe, procedeu-se o emprego da PCR e corrida eletroforética para os *primers* β -1 e β -2, que amplifica o gene de β -globulina e garante a qualidade do DNA das amostras (Figura 18). Das 45 amostras de suabe coletadas, oito (08) amostras não foram amplificadas com o uso deste *primer*; a saber: SP05, SP17 (como pode ser observado na Figura 28); além destas duas, as amostras SP27, SP31, SP35, SP38, SP44 e SP45 também não amplificaram. Apesar das amostras que não amplificaram sugerirem que a extração não ocorreu de maneira correta, todas essas amostras apresentaram quantidades normais de DNA em $\mu\text{g/ml}$ quando foram quantificadas, como mostrado anteriormente na tabela 4, demonstrando que havia DNA suficiente nas amostras para a realização dos exames moleculares.



Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores β -1 e β -2 (100pb) para verificar a qualidade de amplificação do DNA extraído. Marcador de peso molecular 100pb. Coluna 20 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb)

A corrida eletroforética para os *primers* V7/V8 a partir de 45 amostras de suabe conjuntival não apresentou nenhuma amostra amplificada (Figura 19), assim como as amostras de sangue com a utilização deste *primer*.

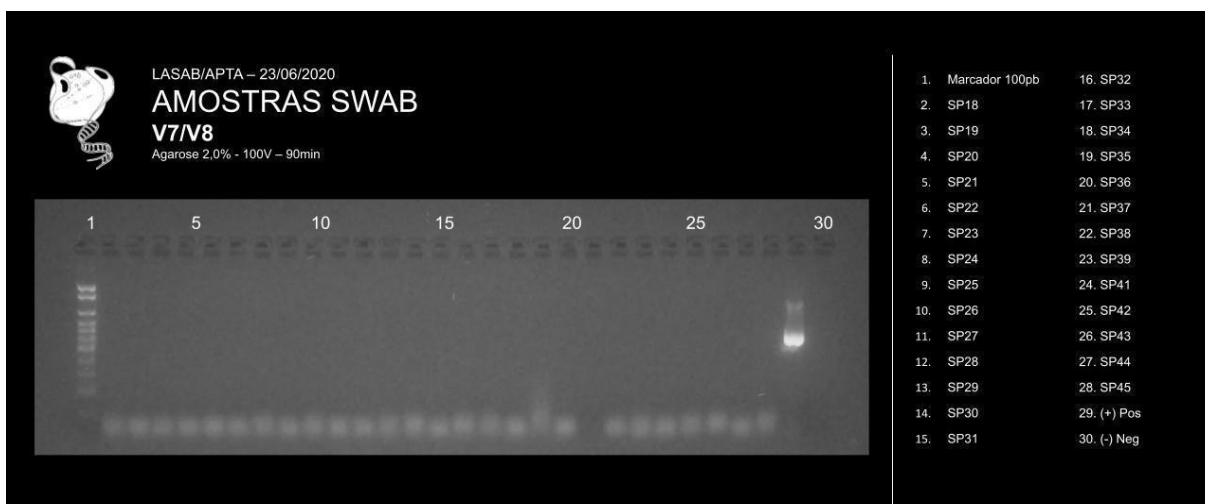


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 561F e 561R (700pb) para a família Trypanosomatidae a partir de suabe conjuntival. Marcador de peso molecular 100pb. Coluna 29 - controle positivo (*Leishmania infantum*); 30 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* B1/B2 (*Leishmania braziliensis*) (800pb)

Das 45 amostras de suabe conjuntival submetidas à corrida eletroforética com os *primers* B1/B2 para kDNA do complexo *Leishmania braziliensis*, uma (01) amostra foi amplificada (Figura 20), a SP19, que corresponde a um primata da espécie *Brachyteles arachnoides*, conhecido como muriqui-do-sul.

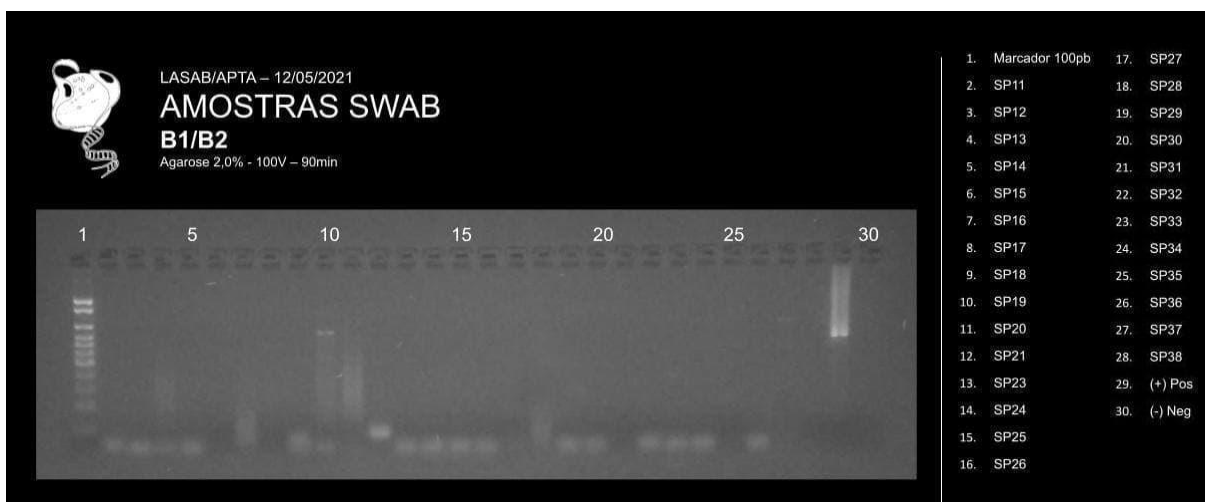


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores B1/B2 (800pb) para kDNA do complexo *Leishmania braziliensis* a partir de suabe conjuntival. Marcador de peso molecular 100pb. Coluna 10 - amostra amplificada; 29 - controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 30 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* LCS1/LCS3 (*Leishmania infantum*) (259pb)

A corrida eletroforética para os *primers* específicos para *Leishmania infantum*, LSC1/LSC3, a partir das amostras de suabe conjuntival apresentou uma (01) amostra amplificada (Figura 21), a SP09, que corresponde a um primata da espécie *Alouatta guariba*, conhecida como bugio-ruivo, cuja amplificação já havia sido observada com o uso dos *primers* 121/122, indicando fortemente que este primata pode estar com uma co-infecção causada pelos parasitos *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*.



Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores LCS1 e LCS3 (259pb) para a espécie *Leishmania infantum*. Marcador de peso molecular 100pb. Coluna 6 - amostra amplificada; colunas 17, 18 e 19 - controles positivos (*Leishmania infantum*); coluna 20 - controle negativo (água ultra pura).

4.2.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* 121/122 (*Trypanosoma cruzi*) (350pb)

O uso dos *primers* 121/122 para as amostras de suabe conjuntival se mostrou muito eficiente na amplificação de possíveis infecções por *Trypanosoma cruzi*. Das 45 amostras testadas, nove (09) foram amplificadas: SP03, SP04, SP10, SP15, SP17, SP18, SP22, SP25 e SP29 (Figura 22). A amostra SP10, que corresponde a um primata da espécie *Ateles chamek*, um macaco-aranha-de-cara-preta chama muita atenção pela amplificação a partir de sua amostra de sangue com os *primers* 121/122 e B1/B2, sendo altamente provável que este primata esteja infectado por algum tripanosomatídeo. Em relação às outras amostras temos a SP03, um primata da espécie *Alouatta caraya*, conhecida como bugio-preto, cuja amplificação já foi registrada nas amostras de sangue, com o uso dos *primers* B1/B2 para *Leishmania braziliensis*, se tratando, assim como a SP10, de uma possível co-infecção. As amostras restantes ainda não haviam sido amplificadas com nenhum *primer*, sendo estas: SP04, também da espécie *Alouatta caraya*; as amostras SP15, SP17, SP18 e SP29 da espécie

A	SP01	NR	-	+	-	-	-	-	-	-
A	SP02	NR	-	+	-	+	-	-	-	-
A	SP03	NR	-	+	-	-	-	-	-	+
A	SP04	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
A	SP05	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
B	SP06	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
B	SP07	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
B	SP08	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
B	SP09	NR	-	-	-	+	-	-	+	-
C	SP10	NR	-	+	-	+	-	-	-	+
C	SP11	NR	-	-	-	+	-	-	-	-
D	SP12	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP13	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP14		-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP15	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
D	SP16	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP17	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
D	SP18	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
E	SP19	NR	-	-	-	-	-	+	-	-
E	SP20	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
E	SP21	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
E	SP22	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
F	SP23	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
G	SP24	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
H	SP25	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
H	SP26	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
C	SP27	NR	-	-	-	-	-	-	-	-

D	SP28	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP29	NR	-	-	-	-	-	-	-	+
D	SP30	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
D	SP31	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
I	SP32	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
I	SP33	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
J	SP34	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
K	SP35	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
K	SP36	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
L	SP37		-	-	-	-	-	-	-	-
L	SP38		-	-	-	-	-	-	-	-
L	SP39		-	-	-	-	-	-	-	-
M	SP40	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
M	SP41	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
N	SP42	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
F	SP43	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
O	SP44	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
H	SP45	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
J	SP46	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
J	SP47	NR	-	-	+	-	-	-	-	-
J	SP48	NR	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendas:

A - *Alouatta caraya*; B - *Alouatta guariba*; C - *Ateles chamek*; D - *Ateles marginatus*; E - *Brachyteles arachnoides*; F - *Sapajus nigritus*; G - *Cebus olivaceus*; H - *Alouatta seniculus*; I - *Sapajus xanthosternus*; J - *Callicebus vierai*; K - *Aotus trivirgatus*; L - *Leontopithecus chrysomelas*; M - *Papio hamadryas*; N - *Callithrix jacchus*; O - *Chiropotes utahickae*;

NR Não reagente à RIFI;

¹ *Primer* geral para a família Trypanosomatidae;

² *Primer* específico para *Leishmania braziliensis*;

³ *Primer* específico para *Leishmania infantum*;

⁴ *Primer* específico para *Trypanosoma cruzi*;

- Amostras negativas;

+ Amostras positivas.

A técnica sorológica apresentou todas as amostras não reagentes, demonstrando a baixa sensibilidade do teste de RIFI. Em comparação às amplificações dos testes moleculares, a ausência de amostras reagentes à RIFI indica que essas amostras provavelmente apresentam uma infecção recente, uma vez que não houve detecção de anticorpos IgG na sorologia. A comparação entre o número de amostras amplificadas na técnica molecular a partir de sangue e o número de amostras amplificadas na técnica molecular a partir de suabe conjuntival evidencia diferenças de acordo com a origem da amostra, pois obtivemos 7 amostras amplificadas com pelo menos um *primer*, a partir de sangue, das 48 amostras testadas (14,6%); enquanto isso, foi possível verificar 11 amostras amplificadas com pelo menos um *primer*, a partir de suabe conjuntival, das 45 amostras testadas (24,44%).

Essas porcentagens demonstram que o uso do suabe conjuntival para a realização de testes moleculares é bastante eficaz, o que é vantajoso por se tratar de uma coleta de material biológico minimamente invasiva, ainda mais se tratando de animal selvagem, em que os procedimentos éticos para coleta de material biológico são bastante cautelosos, sendo mais facilmente realizada do que a coleta de sangue. Em relação aos *primers* utilizados, das 48 amostras testadas, quatro (04) amplificaram com mais de um *primer* (8,33%). No que se refere aos *primers* específicos, das 48 amostras testadas, cinco (05) amplificaram para o *primer* específico para *Leishmania braziliensis* (10,42%), duas (02) amplificaram para o *primer* específico para *Leishmania infantum* (4,17%) e 13 amplificaram para o *primer* específico para *Trypanosoma cruzi* (27,08%).

Algumas amostras recebem destaque, como as amostras SP02 (*Alouatta caraya*), SP09 (*Alouatta guariba*) e SP10 (*Ateles chamek*), que amplificaram com dois (02), dos quatro (04) *primers* utilizados na pesquisa, apresentando, portanto, resultados positivos em 50% dos *primers* deste estudo, sendo um forte indício de que estes primatas estão infectados com pelo menos um dos parasitos testados. Os resultados obtidos são de extrema relevância, já que pode haver muitos reservatórios de parasitos entre os primatas do Zoológico de Sorocaba, sendo imprescindível a notificação detalhada dos resultados desse projeto, para que medidas de intervenção possam ser tomadas, como o isolamento dos animais infectados e o controle de vetores do ambiente, a fim de se evitar que novos animais sejam infectados ou até mesmo os

funcionários e visitantes do Zoológico, bem como aplicação de quarentena para os animais recebidos de outros Zoos. Atividades de educação em saúde no Zoo, com orientação sobre as principais zoonoses, seriam indicadas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos aos testes moleculares evidenciaram uma grande quantidade de primatas infectados com protozoários do gênero *Leishmania*, das espécies *L. infantum* e *L. braziliensis*, e também uma quantidade elevada de primatas infectados com o parasito *Trypanosoma cruzi*, apontando inclusive para a presença de uma co-infecção entre estes parasitos em algumas amostras. O uso de diferentes *primers* permitiu um diagnóstico específico para as espécies dentro dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, dando destaque ao *primer* 121/122, que amplifica o kDNA de *Trypanosoma cruzi*, o qual apresentou uma quantidade significativa de amostras amplificadas. Os resultados encontrados neste projeto reforçam a importância e necessidade da pesquisa desses parasitos em animais de cativeiro, uma vez que estes podem servir de reservatório e, ao serem utilizados para o repasto sanguíneo dos vetores, podem contribuir para a infecção de outros animais e dos tratadores e público visitante do Zoológico, sendo de suma importância a notificação deste, para que esses primatas infectados sejam isolados e tratados e que também seja realizado o controle dos vetores flebotomíneos e triatomíneos no ambiente, pela colocação de armadilhas e proteção dos recintos, a fim de se prevenir novas infecções. Sugere-se também a investigação sorológica e molecular para tripanosomatídeos em todos os primatas que sejam introduzidos no zoológico, para um efetivo controle destes parasitos.

REFERÊNCIAS¹

- BANU, S. S.; MEYER, W.; FERREIRA-PAIM, K.; WANG, Q.; KUHLS, K.; CUPOLILLO, E.; SCHÖNIAN, G.; LEE, R. A novel multilocus sequence typing scheme identifying genetic diversity amongst *Leishmania donovani* isolates from a genetically homogeneous population in the Indian subcontinent. **International Journal for Parasitology**, v. 49, p. 555-567, 2019.
- BARBOSA, R. L.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; FRANCO, R. M.; GUARALDO, A. M.; ALVES, D. P.; PASSOS, L. A. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. **Journal Food Protection**, v. 75, n. 3, p. 601-606, 2012.
- BARRETO, M.P. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Revista Brasileira do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.7, p. 305-315, 1967.
- BARRETT, T. V., HOFF, R., MOTT, K. E., GUEDES, F., SHERLOCK, I. A. An outbreak of acute Chagas's disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animals reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 703-709, 1979.
- BEZERRA, G. S. N.; BARBOSA-JÚNIOR, W. L.; SILVA, E. D.; LEAL, N. C.; MEDEIROS, Z. M. Urine as a promising sample for *Leishmania* DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 111-120, 2019.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 8, p. 227-234, 1966.
- CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; LUQUETTI, A. O.; BUEKENS, P. Congenital Chagas disease: na update. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363-368, 2015.
- CARNEIRO, L. A.; SILVEIRA, F. T.; CAMPOS, M. B.; BRÍGIDO, M. C. O.; GOMES, C.M.C; CORBETT, C. E. P; LAURENT, M.D. Susceptibility of *Cebus apella* monkey (primates: Cebidae) to experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.53, n.1, p.45-50, 2011.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. **American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Triatomine Bug FAQs. Acessado em: 20 nov. 19. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/index.html
- CHAIA, G.; ABREU, I. B.; CHIARI, L.; ARAÚJO, S. M. Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp. pelo *Trypanosoma cruzi* (Cepa “Y”). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 11, n. 2, 1976.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

COURA J. R. Tripanossomose, doença de Chagas. **Revista Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962-967, 2013.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, p. 45-58, 1992.

EDVINSSON, B. **Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients**. 2006. 66f. Tese (Clinical Bacteriology) – Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital Huddinge, Estocolmo. 2006.

FERREIRA, E.C.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MELO, L. A.; PEREIRA, A. A. S.; MADEIRA, F. A. M.; VALÉRIO, S. A. N.; CUNHA, H. M. PAGLIA, A. P. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. chagasi) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **Veterinary Research**, v.11, n.71, p. 1-7, 2015.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. **Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas)**. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

FONG, D. L.; TORRENCE, A. E.; VOGEL, K. W.; STOCKINGER, D. E.; NELSON, V.; MURNANE, R. D; BALDESSARI, A.; KULLER, L.; AGY, M.; KIEM, H. P.; HOTCHKISS, C. E. Transmission of Chagas disease via blood transfusion in 2 immunosuppressed pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). **Comp Med**, v. 64, n. 1, p. 63-67, 2014.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 273, p. 1-13, 2018.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUIRALDI, L.M. **Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo**. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 21, 2016.

GUSHI L.T. **Estrutura populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial** [Dissertação] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.

HUPRIKAR, S.; BOSSERMAN, E.; PATEL, G.; MOORE, A.; PINNEV, S.; ANYANWU, A.; NOFYTOS, D.; KETTERER, D.; STRIKER, R.; SILVEIRA, F.; OVARNSTROM, Y.; STEURER, F.; HERWALDT, B.; MONTGOMERY, S. Donor-derived *Trypanosoma cruzi*

infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. **American Journal Transplant**, v. 13, n. 9, p. 2418-2425, 2013.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 502, p. 1-25, 2018.

KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J. A review of systematics, species identification and diagnosis of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 6, p. 449-460, 2020.

LIMA, V. F. S.; RAMOS, R. A. N.; GIANNELLI, A.; SCHETTINO, S. C.; GALINA, A. B.; OLIVEIRA, J. C. P.; MEIRA-SANTOS, P. O.; ALVES, L. C. Zoonotic parasites in wild animals such as carnivores and primates that are traded illegally in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, 2021.

LISBOA, C. V.; MANGIA, R. H.; LUZ, S. L. B.; KLUCZKOVSKI, A. J. R.; FERREIRA, L. F.; RIBEIRO, C. T.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. **Parasitology**, v. 133, p. 603-611, 2006.

LONGONI, S. S.; LÓPEZ-CEPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; SAURIARCEO, C. H.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; MARÍN, C. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**, v. 35, p. 469-476, 2012.

LUKES, J. The Tree of Life Web Project. **Trypanosomatida**. 2009a. Acessado em 20 nov. 19. Disponível em: <http://tolweb.org/Trypanosomatida/98015/2009.01.02>

LUKES, J. The Tree of Life Web Project. **Trypanosoma Gruby 1843**. 2009b. Acessado em 20 nov. 19. Disponível em: <http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02>

MEINECKE, C. K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kalazar) from an asymptomatic mother to her child. **American Academy of Pediatrics**, v. 104, n. 5, 1999.

MIRANDA, D. L. P.; RIBEIRO-JÚNIOR, G.; LANZA, F. C.; SANTOS, F. L. N.; REIS, R. B.; FRAGA, D. B. M.; SILVA, L. K.; SILVA-NETO, M. M.; SANTANA, I. J.; REIS, M. G. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among blood donors in the state of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 146, 2019.

MUBIRU, J. N.; YANG, A.; DICK, E. J. JR.; OWSTON, M.; SHARP, R. M.; VANDEBERG, J. F.; SHADE, R. E.; VANDEBERG, J. L. Correlation between presence of *Trypanosoma cruzi* DNA in heart tissue of baboons and cynomolgus monkeys, and lymphocytic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 627-633, 2014.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia da vinchuca, *T. infestans* KLUG. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 5, p. 24-31, 1913.

NETO, O. J. S.; DUARTE, S. C.; COSTA, H. X.; LINHARES, G. F. C. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 304-30, 2012.

NOVO, S.P.C.; LELES, D.; BIANUCCI, R.; ARAUJO, A. The process of *Leishmania* infection - disease and new perspectives of Paleoparasitology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 45, p.1-8, 2016.

NOYES H.A.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma bynneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology**. v.29, p. 331-339, 1999.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil/Annotated checklist of brazilian mammals**. 2^a ed. Arlington, 2012.

PHILIPP, M. T., PURCELL, J. E. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malária, Chagas' disease, and filariasis. In: WolfeCoote, S., editor. **The laboratory primate: handbook of experimental animals**. Elsevier, p. 91, 2005.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 648-652, 2001.

ROVIROSA-HERNANDEZ, M. J.; LOPEZ-MONTEON, A.; GARCÍA-ORDUNA, F.; TORRES-MONTERO, J.; GUZMAN-GOMEZ, D.; DUMONTEIL, E.; WALECKX, E.; LAGUNES-MERINO, O.; CANALES-ESPINOZA, D.; RAMOS-LIGONIO, A. Natural infection with *Trypanosoma cruzi* in three species of non-human primates in southeastern Mexico: A contribution to reservoir knowledge, **Acta Tropica**, v. 213, 2021.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; GERHARDT, M.; SILVA, M. F. O.; LIMA, V. S.; D'ANDREA, O. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in diferente areas of Abaetetuba municipality (Pára State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 71-77, 2013.

SERENO, D.; AKHOUNDI, M.; SAYEHMRI, K.; MIRZAEI, A.; HOLZMULLER, P.; LEJON, V.; WALECKX, E. Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infectious due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, 2020.

SILVA, T. R. M.; BARROS, G. M. M. R.; LIMA, T. A. R. F.; GIANNELLI, A.; SILVA, G. M.; ALVES, K. M. L.; CARVALHO, G. A.; RAMOS, R. A. N. Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 278, 2019.

SOUZA, E. O.; ROSSAN, R. N.; BAERG, G. D. The prevalence of Trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, p. 862-868, 1974.

STEVENS, J.; GIBSON, W. The evolution of salivarian trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 225-228, 1999.

TENÓRIO, M. S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; RORIGUES, M. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ARAÚJO JR. J. P.; LUCHEIS, S. B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 203-206, 2014.

TERRY, B. T. Trypanosomiasis in monkeys (*Macacus rhesus*) in captivity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 9, p. 17-18, 1911.

VEXENATE, J.A.; BARRETTO, A.C.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Características epidemiológicas de uma região do estado da Bahia. III. Fauna flebotômica. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 293-301, 1986.

VIETTRI, M.; HERRERA, L.; AGUILAR, C. M.; MOROCOIMA, A.; REYES, J.; LARES, M.; LOZANO-ARIAS, D.; GARCÍA-ALZATE, R.; CHACÓN, T.; FELICIANGELI, M. D.; FERRER, E. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 123-130, 2018.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2015. Acessado em: 20 nov. 19. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2016a. Acessado em: 20 nov. 19. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

WHO. World Health Organization. **Fact sheets: neglected tropical diseases**. 2016b. Acessado em: 20 nov. 19. Disponível em: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/

ZAPPAROLI, D.; BERTOZZO, T. V.; ALEXANDRINO, M.; SANCHES, D. F.; AIRES, I. N.; MANZINI, S.; MEDEIROS, M. I. M.; KUROKAWA, C. S.; SANTOS, R. M.; LUCHEIS, S. B. Commercially acquired açaí pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, 2022.

ZICCARDI, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LAINSON, R.; BRÍGIDO, M. C. O.; MUNIZ, J. A. P. C. Trypanosomes of nonhuman primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 157-159, 2000.