

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/06/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CARNÍVOROS SELVAGENS GENERALISTAS COMO
SENTINELAS PARA FILARIOSES E LEISHMANIOSE
VISCERAL NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

Marcela Figuerêdo Duarte Moraes
Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CARNÍVOROS SELVAGENS GENERALISTAS COMO
SENTINELAS PARA FILARIOSES E LEISHMANIOSE
VISCERAL NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

Marcela Figuerêdo Duarte Moraes

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária (Medicina
Veterinária Preventiva)**

M827c

Moraes, Marcela Figuerêdo Duarte

Carnívoros selvagens generalistas como sentinelas para filarioses e leishmaniose visceral no Parque Nacional do Iguaçu / Marcela Figuerêdo Duarte Moraes. -- Jaboticabal, 2020

106 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe

1. Carnívoros selvagens. 2. Filariose. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Filogenia. 5. Saúde Pública. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

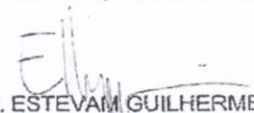
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

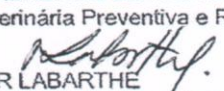
TÍTULO DA TESE: CARNÍVOROS SELVAGENS GENERALISTAS COMO SENTINELAS PARA FILARIOSES E LEISHMANIOSE VISCERAL NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

AUTORA: MARCELA FIGUERÊDO DUARTE MORAES

ORIENTADOR: ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

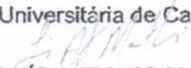
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP, Jaboticabal-SP


Dra. NORMA VOLLMER LABARTHE
Fundação Oswaldo Cruz / Rio de Janeiro/RJ


Profa. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. DANIELA PEDRASSANI
Unidade Universitária de Canoinhas / UNC - Canoinhas, SC


Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS
Depto. Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de junho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marcela Figuerêdo Duarte Moraes, nascida em Garanhuns, Pernambuco, em 15 de agosto de 1983. Graduiu-se em Licenciatura em Ciências com habilitação em Biologia pela Universidade de Pernambuco – UPE, no ano de 2004. Durante os anos de 2001 a 2005, atuou como auxiliar de laboratório na área de microbiologia e físico-química de alimentos e água no Laboratório LAMEN, em Garanhuns, Pernambuco. Posteriormente, graduou-se em Medicina Veterinária pela UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE), no ano de 2010. Durante essa graduação, foi monitora da disciplina de Anatomia Descritiva dos Animais domésticos em 2006, desenvolvendo a Pesquisa de Iniciação Científica intitulada “Análise citológica do líquido de ovinos sadios da raça Santa Inês”. Participou como voluntária dos Projetos de Iniciação Científica “Prevalência de cães soropositivos para Leishmaniose Visceral Canina (Calazar) no Município de Garanhuns, PE” e “Levantamento da Mastofauna de Remanescentes Florestais no Município de Garanhuns, PE” e como voluntária no Projeto de Extensão “Posse responsável dos animais domésticos”, além de ter sido membro do Grupo de Estudos de Animais Selvagens da UAG/UFRPE. Entre os anos de 2011 e 2012, atuou na área de clínica médica de cães e gatos na Clínica Animalpet, Garanhuns, PE. Entre 2010 e 2016 foi Médica Veterinária colaboradora do Projeto Carnívoros do Iguaçu, com sede no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, Paraná, onde são desenvolvidas atividades de pesquisa relativos a manejo e conservação de onças-pintadas. Em 2016, obteve o título de mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, após a defesa da dissertação intitulada “Estudos parasitológicos em cães domésticos errantes e carnívoros selvagens generalistas no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu”.

"Você pode fazer a melhor ciência do mundo, mas, a menos que haja emoção, ela não é realmente muito relevante."

George Schaller

À minha avó Maria Aída (*in memoriam*), por ter sido exemplo de mulher forte, corajosa, trabalhadora e resiliente...não pude dizer o último adeus pois estava em campo no doutorado, mas seus ensinamentos ficaram. Este trabalho dedico a você, “Dona Aída”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença em todos os dias da minha vida, dando-me forças para enfrentar cada desafio apresentado a mim.

A meus pais, Francisco e Cássia, pelo amor, dedicação e educação que puderam fornecer a mim e aos meus irmãos e por nos incentivarem sempre a buscarmos os nossos sonhos. Amo vocês!

Aos meus irmãos Mércia, Márcia e Eduardo, pela alegria compartilhada e pelo cuidado com o meu pai, sem o qual seria muito difícil a minha estadia longe de casa por todo o período de estudo na pós-graduação. Vocês foram essenciais nesta conquista!

Ao meu orientador, o professor Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, por, desde o início do meu ingresso na carreira acadêmica, ter me aceito como sua aluna, mesmo não me conhecendo anteriormente e por sempre se mostrar prestativo para auxiliar no que fosse preciso. Agradeço pelos conhecimentos passados e principalmente pela amizade! Um dia quero ser uma enciclopédia da parasitologia como você!

À Andressa de Souza Pollo, nossa “Padrão”, que com toda qualidade de trabalho foi essencial na realização desta pesquisa pois sem você dificilmente teríamos os resultados que obtivemos! Obrigada pelos conhecimentos, por todo trabalho desenvolvido na área de biologia molecular e bioinformática e pela amizade que desenvolvemos ao longo desta pesquisa.

À Marina Xavier da Silva, coordenadora do extinto Projeto Carnívoros do Iguaçu, por todo apoio me fornecido ao longo de toda a pesquisa de campo, apoio esse fundamental para alcançarmos o “n” que obtivemos. Agradeço também porque acima de tudo nossa amizade me ajudou a superar e a passar por todas as dificuldades e solidão de um campo longo no meio da floresta!

À Cíntia Mazon, analista ambiental do ICMBio no Parque Nacional do Iguaçu, também pelo apoio logístico durante minhas campanhas de captura e amizade que !
E ao Chefe do Parque Nacional do Iguaçu, pela abertura do parque para a realização da minha pesquisa!

À minha família jaboticabalense Pê, Duda, Priscila, Laís e Andréa, pelos muitos momentos que dividimos ao longo da nossa vida compartilhada! Vocês foram muito

importantes pra meu bem-estar em Jaboticabal, pois dividimos muitas alegrias, tristezas, risos, conversas, confissões e as contas de todo mês. Creio que será uma amizade que levaremos pro resto da vida! Aos nossos mascotes Merope, Nino, Lupita e Sofia, que alegram nossos dias com suas travessuras e seus olhinhos brilhantes e rabos abanando!

Às companheiras de laboratório Gabi, Paula, Talita e Duda, pela convivência alegre, recheada de gordices, de reclamações e de risadas! Vocês tornaram os dias de laboratório mais leves!

A todos os animais com que pude ter contato ao longo desta pesquisa, desde pequenos insetos a onças-pintadas, e principalmente aos meus queridos e pestinhas quatis por terem me proporcionado tantos resultados importantes para a saúde pública! Gratidão e respeito à todos!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP processo número (2016/14886-9 e 2016/15589-8), pelo apoio financeiro, através da concessão do auxílio pesquisa e da bolsa de estudos, sem a qual este estudo não teria condições de ser efetuado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, por querer ou mesmo sem nem ter noção de sua importância, fizeram com que eu conseguisse chegar ao término desta pesquisa! Minha gratidão!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Carnívoros selvagens e parasitas zoonóticos transmitidos por vetores no Brasil.....	21
2.2 Filariose zoonóticas e reservatórios selvagens.....	24
2.3 Reservatórios selvagens e espécies de Trypanosomatidae de importância para a saúde pública no Brasil.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO II: FILOGENIA DE FILARÍDEOS ZONÓTICOS (SPIRURIDA:ONCHOCERCIDAE) EM CARNÍVOROS SELVAGENS E CÃES DOMÉSTICOS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Área de estudo.....	49
2.2 Capturas e coleta de amostras.....	50
2.3 Diagnóstico das filariose.....	51
2.3.1 Morfologia e morfometria das microfilárias.....	51
2.3.2 Teste imunológico para pesquisa de antígeno da <i>Dirofilaria immitis</i>	52
2.4 Estudos moleculares.....	52
2.4.1 Extração de DNA e triagem para filarídeos.....	52
2.4.2 Identificação molecular e filogenia.....	53

2.5 Aspectos éticos.....	55
3. RESULTADOS.....	55
4. DISCUSSÃO.....	64
5. CONCLUSÃO.....	69
6. REFERÊNCIAS.....	70
 CAPÍTULO III: <i>Leishmania infantum</i> E <i>Trypanosoma cruzi</i> NA MATA ATLÂNTICA: RESERVATÓRIOS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA TRÍPLICE FRONTEIRA BRASIL-ARGENTINA-PARAGUAI.....	
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1 Área de estudo.....	78
2.2 Capturas dos animais.....	79
2.3 Captura dos triatomíneos.....	81
2.4 Diagnóstico para Tripanosomatidae.....	81
2.4.1 Diagnóstico sorológico para <i>Leishmania spp.</i>	81
2.4.2 Diagnóstico molecular e sequenciamento.....	82
2.5 Análises de dados.....	83
2.5 Aspectos éticos.....	84
3. RESULTADOS.....	84
4. DISCUSSÃO.....	87
5. CONCLUSÃO.....	92
6. REFERÊNCIAS.....	93
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

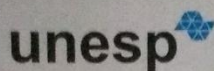
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Carnívoros selvagens generalistas como sentinelas para filarioses e leishmaniose visceral no Parque Nacional do Iguaçu"**, protocolo nº 11.510/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de outubro de 2016.

Vigência do Projeto	06/10/2016 a 01/08/2020
Espécie / Linhagem	Quatis (<i>Nasua nasua</i>), graxains (<i>Cerdocyon thous</i>), outros carnívoros
Nº de animais	Estima-se em 80 animais
Peso / Idade	Variados
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Parque Nacional do Iguaçu

Jaboticabal, 05 de outubro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

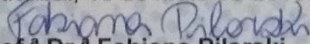
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização molecular de parasitas do gênero *Trypanossoma* (Euglenozoa: Trypanosomastidae) em mamíferos selvagens e triatomíneos da Mata Atlântica do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu**", protocolo nº 006106/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de maio de 2019.

Vigência do Projeto	01/07/2019 a 01/01/2020
Espécie / Linhagem	<i>Mus musculus</i> linhagem Swiss
Nº de animais	20
Peso / Idade	45 g / 2 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério

Vigência do Projeto	01/07/2019 a 01/01/2020
Espécie / Linhagem	Rodentia, Marsupiais, Quati (<i>Nasua nasua</i>)
Nº de animais	Não se aplica
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Machos / Fêmeas
Origem	Vida livre Parque Nacional do Iguaçu

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

CARNÍVOROS SELVAGENS GENERALISTAS COMO SENTINELAS PARA FILARIOSES E LEISHMANIOSE VISCERAL NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

RESUMO – Carnívoros generalistas são pouco exigentes e apresentam hábitos alimentares variados e, devido a este comportamento oportunista, estes animais aproximam-se de populações humanas, tornando-se vulneráveis aos patógenos de animais domésticos, mas também podendo carrear patógenos para os animais domésticos e o homem. No Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu), os quatis e os graxains são espécies frequentes de carnívoros generalistas e oportunistas e com ampla distribuição no território do parque. Recentemente, foi diagnosticada por métodos parasitológicos tradicionais a presença de alguns gêneros de filarídeos com potencial zoonótico em carnívoros selvagens no interior do parque. Além disso, casos autóctones de leishmaniose visceral canina foram confirmados em cães domésticos e em humanos na região. Dessa forma, devido à importância para o cenário da saúde pública atual, esta pesquisa teve como objetivos o estudo das filariose e leishmaniose visceral em carnívoros generalistas do PARNA Iguaçu, bem como entender a relação parasita-hospedeiro e os processos ecológicos que podem favorecer a transmissão desses agentes entre populações silvestres, domésticas e o homem. Para isso, foram capturados 284 mamíferos selvagens, por meio de armadilhas Tomahawk e Sherman. Os animais foram contidos quimicamente para punção da jugular e coleta de amostras sanguíneas, para diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular de filarídeos e tripanossomatídeos. Foram visitadas 64 propriedades rurais do entorno do PARNA, onde foram coletadas amostras de 226 cães domésticos. Foram realizadas ainda necropsias de 20 carnívoros selvagens atropelados na BR 469 (dentro do PARNA), visando às mesmas análises. O diagnóstico inicial de filarídeos foi realizado pelo teste de Knott modificado, posteriormente, seguiu-se a extração de DNA das amostras sanguíneas e de tecidos, realizada pela técnica de clorofórmio-álcool isoamílico. Para triagem molecular de filarídeos, as reações de PCR foram realizadas com amplificação da região 5S rDNA, posteriormente as amostras positivas passaram por novas reações de PCR com os genes Miosina e hsp70 de filarídeos, visando identificação das espécies. Com relação à pesquisa molecular de Trypanosomatidae, primeiramente foi realizada a PCR com primers do gene mitocondrial Citocromo B, e as amostras positivas, passaram por nova PCR com primers da região 18S rDNA de tripanossomatídeos. Todas as amostras positivas na PCR foram submetidas a PCR de sequenciamento com kit BigDye, em sequenciador ABI3130. Os eletroferogramas foram analisados e as sequências alinhadas junto às sequências do banco do NCBI. A partir destas, foram geradas árvores filogenéticas para cada gene estudado de cada grupo de parasitas. Foi realizada a RIFI para *Leishmania infantum* de todos os cães domésticos amostrados. Como resultados foi possível observar a presença de cinco espécies de filarídeos parasitando quatis (*Nasua nasua*) no PARNA Iguaçu: *Mansonella* sp. 1, *Mansonella* sp. 2, dois gêneros novos aqui identificados como Embainhada 1 e 2, e *Dirofilaria immitis*. Em cães domésticos, foi identificada a presença de *Acanthocheilonema* sp. Estes dados são inéditos na região em estudo, uma vez que pouco se conhece a respeito de filarídeos de animais selvagens da região neotropical. É importante ressaltar que os

quatis apresentaram alta prevalência de infecção de filarídeos (74,5%), podendo atuar como bons reservatórios destes nematódeos na região estudada. Alguns dos gêneros identificados são descritos como parasitas zoonóticos em outras regiões do Brasil e do mundo, o que alerta para a necessidade de vigilância em saúde, pois estes parasitas podem ter potencial zoonótico. Com relação aos tripanossomatídeos, apenas em cães domésticos foi detectada a presença de *L. infantum* em animais provenientes da cidade de Foz do Iguaçu, apesar de terem sido identificados cães positivos na RIFI para *L. infantum* (28,7%) em algumas propriedades do entorno do PARNA. Foi ainda identificada a presença de *Trypanosoma cruzi* em um quati da área turística das Cataratas do Iguaçu, sendo tipificado como *T. cruzi* DTU's TcIV. É possível sugerir que os cães domésticos sejam os reservatórios de importância para a leishmaniose visceral em Foz do Iguaçu, PR, havendo necessidade de maior vigilância e ações no controle dos vetores e reservatórios domésticos, para evitar que o parasita adentre o PARNA e seja amplificado (spillback) nas inúmeras espécies de hospedeiros susceptíveis que habitam a mata atlântica do PARNA Iguaçu. A presença de *T. cruzi* em quatis é um alerta, pois estes animais atuam como bons sentinelas do ambiente selvagem, e, desta forma, demonstrando que *T. cruzi* está circulando na área florestal. Os dados obtidos nesta pesquisa indicam a ocorrência e circulação, no PARNA Iguaçu, de parasitas transmitidos por vetores que são de grande importância para a saúde pública em todo o mundo. Além disso, é possível sugerir que na região do PARNA Iguaçu os cães domésticos são responsáveis por manterem a circulação de *L. infantum*, enquanto os quatis são excelentes reservatórios de nematódeos filarídeos e podem atuar também como reservatórios de *T. cruzi*, conforme já relatado em outros biomas brasileiros, sendo um importante animal sentinela a ser monitorado por órgãos de vigilância em saúde na região estudada.

Palavras-chave: Carnívoros selvagens, filarídeos, Leishmaniose Visceral, Mata Atlântica, *Trypanosoma cruzi*

WILD GENERALIST CARNIVORES AS SENTINELS FOR FILARIASES AND VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE IGUAÇU NATIONAL PARK

ABSTRACT - Generalist carnivores are undemanding and have varied eating habits, and, due to this opportunistic behavior, these animals are close to human populations, becoming vulnerable to domestic animal pathogens, but also being able to carry pathogens to domestic animals and man. In the Iguaçu National Park (PARNA Iguaçu), ring-tailed coatis and crab-eating foxes are common species of generalist and opportunistic carnivores with a wide distribution in the park's territory. Recently, by traditional parasitological methods, the presence of some filarids nematodes with zoonotic potential was diagnosed in wild carnivores from PARNA Iguaçu. Also, autochthonous cases of Canine Visceral Leishmaniasis have been confirmed in domestic dogs and humans in the region. Thus, due to the importance for the current public health, this research aims to study filariasis and visceral leishmaniasis in generalist carnivores from PARNA Iguaçu, as well as to understand the parasite-host relationship and the ecological processes that may favor transmission of these agents among wild populations, domestic dog and humans. For this, 284 wild mammals were captured using Tomahawk and Sherman traps. The animals were chemically contained for jugular puncture and collection of blood samples for parasitological, serological, and molecular diagnosis of filarids and trypanosomatids. Sixty-four rural properties were visited around PARNA, and 226 samples were collected from domestic dogs. Necropsy of 20 wild carnivores run over in the BR 469 road (inside PARNA) was performed, aiming at the same analyzes. The modified Knott test performed the initial filariid diagnosis, subsequently followed by the DNA extraction from blood and tissue samples, through by the chloroform-isoamyl alcohol technique. For molecular screening of filarids, the PCR reactions were performed with 5S rDNA region amplification, afterward new PCR reactions were performed with the filariid positive samples, with amplification of Myosin and hsp70 genes, aiming at species identification. Regarding the molecular research of Trypanosomatidae, PCR was first performed with primers from the mitochondrial Cytochrome B gene. New PCR was performed with the positive samples with amplification of the 18S rDNA region of trypanosomatids. All PCR positive samples were subjected to sequencing PCR with the BigDye kit, in an ABI3130 sequencer. The electropherograms were analyzed, and the sequences aligned with the NCBI bank sequences. From these, phylogenetic trees were generated for each gene studied in each group of parasites. *Leishmania infantum* IIFT was performed for all dogs sampled. As a result, it was possible to observe the presence of five species of filariidae parasitizing ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) in PARNA Iguaçu: *Mansonella* sp1, *Mansonella* sp. 2, two new genera identified here as Embainhada 1 and 2, and *Dirofilaria immitis*. For domestic dogs, only *Acanthocheilonema* sp. was diagnosed. These data are unprecedented for the region under study, since the knowledge about filariidae of wild animals from the Neotropical region is limited. It is important to note that ring-tailed coatis showed a high prevalence of filarids infection (74.5%), and can act as good reservoirs for these nematodes in the studied region. Some of the identified genera are described as zoonotic parasites in other regions of Brazil and the world, warning to the need for health surveillance, once these parasites may also have zoonotic potential in this area. Regarding trypanosomatids, only *L. infantum*

was detected in domestic dogs from Foz do Iguaçu city, although positive dogs were identified in the IIFT for *L. infantum* (28.7%) in some rural properties surrounding the PARNA. *Trypanosoma cruzi* was also identified in a ring-tailed coati from Iguazu Falls tourist area and was typified as *T. cruzi* DTU's TcIV. We can suggest that domestic dogs are the important visceral leishmaniasis reservoirs in Foz do Iguaçu, PR, requiring vigilance and actions to control vectors and domestic reservoirs aiming to prevent the parasite in wild mammals from PARNA Iguaçu because they can be amplified (spillback) in the many susceptible host species that inhabit the Atlantic forest of PARNA Iguaçu. The presence of *T. cruzi* in ring-tailed coatis is an alert, these animals act as good sentinels of the wild environment, and in this way, demonstrating that *T. cruzi* is circulating in the forest area. The data obtained in this research indicate the occurrence and circulation, in PARNA Iguaçu, of vector-borne parasites that are of great importance for public health worldwide. Furthermore, it is possible to suggest that domestic dogs are responsible for maintaining the circulation of *L. infantum*, while coatis are excellent reservoirs for filarid nematodes and can also act as reservoirs for *T. cruzi* in the PARNA Iguaçu region, as already reported for other Brazilian biomes, being an important sentinel animal to be monitored by health surveillance agencies in the studied region.

Keywords: Wild carnivores, Filariases, Visceral Leishmaniasis, Atlantic Rainforest, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - Filogenia de filarídeos zoonóticos (Spirurida: Onchocercidae) em carnívoros selvagens e cães domésticos da Mata Atlântica brasileira.

Tabela 1. Identidade genética das sequências do gene codificador da Miosina dos haplótipos de filarídeos de quatis (*Nasua nasua*) e cães domésticos do Parque Nacional do Iguaçu com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.....59

Tabela 2. Identidade genética das sequências do gene hsp70 dos haplótipos de filarídeos de quatis (*Nasua nasua*) e cães domésticos do Parque Nacional do Iguaçu com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.....59

CAPÍTULO III - *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* na Tríplice Fronteira: reservatórios selvagens e domésticos na Mata Atlântica de abrangência do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil.

Tabela 1. Descrição das espécies de mamíferos selvagens capturados no PARNA Iguaçu, quantidade de indivíduos capturados por táxon e tipo de amostra analisada.....79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - Filogenia de filarídeos zoonóticos (Spirurida: Onchocercidae) em carnívoros selvagens e cães domésticos da Mata Atlântica brasileira.

- Figura 1.** Localização geográfica do PARNA Iguaçu, Paraná, Brasil, e ponto de captura de carnívoros selvagens.....52
- Figura 2.** Árvore filogenética bayesiana de sequências de haplotipos do gene codificador de miosina de microfilárias presentes em amostras de sangue de quati (*Nasua nasua*) e de cães domésticos do entorno do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.....59
- Figura 3.** Árvore filogenética bayesiana de sequências de haplotipos do gene hsp70 de microfilárias presentes em amostras de sangue de quati (*Nasua nasua*) e de cães domésticos do entorno do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.....60.
- Figura 4.** Morfologia das microfilárias detectadas no teste de Knott em amostras de sangue de quatis (*Nasua nasua*) e de cães domésticos do entorno do PARNA Iguaçu e Iguazú. **1.** *Mansonella ozzardi*: A Anterior e posterior; **2.** *Acanthocheilonema* sp.: B: Anterior e posterior; **3.** *Mansonella* sp. – C: anterior e posterior; **4.** Gênero novo Embainhada 2 – D: Anterior e posterior; **5.** Gênero novo Embainhada 1. – E: anterior e posterior. Microscopia de luz aumento 100x.....63

CAPÍTULO III - *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* na Tríplice Fronteira: Reservatórios selvagens e domésticos na Mata Atlântica de abrangência do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil.

- Figura 1.** Localização geográfica do PARNA Iguaçu. Os ícones representam os locais de coleta de cães domésticos e de mamíferos selvagens.....79
- Figura 2.** Árvores filogenéticas bayesianas (A) das sequências de citocromo B e (B) das sequências da região 18S rDNA, presentes em amostras de sangue de cães domésticos e quati (*Nasua nasua*) do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.....85
- Figura 3.** Árvore filogenética bayesiana ‘split’ de sequências da região 18S rDNA de DTU’s de *Trypanosoma cruzi* do banco de dados e de um quati (*N. nasua*) do Parque Nacional do Iguaçu.....86

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, por causa de ações antrópicas, como desmatamento, queimadas e caça furtiva, os animais silvestres vêm sofrendo um declínio acentuado (Renctas, 2016). A interferência humana nos ecossistemas, especificamente na biodiversidade neotropical, contribui como ameaça à sobrevivência de carnívoros selvagens e exige estratégias urgentes de conservação *in situ* e *ex situ*, uma vez que carnívoros em ambiente natural representam a estabilidade do ecossistema pelo seu potencial de regular a população de espécies inferiores na cadeia alimentar (Salvador et al., 2011). Em todo o mundo, os carnívoros estão vivendo cada vez mais próximos dos seres humanos (Treves et al., 2006; Bateman e Fleming, 2012), resultando em risco de transmissão *spillback* e *spillover* de doenças, predações de animais domésticos e, como consequência, ocorre a matança retaliatória destes carnívoros em resposta a sua presença em ambientes urbanizados (Baker et al., 2008; Ripple et al., 2014).

Atualmente, em várias regiões do mundo, muitos carnívoros selvagens persistem em populações pequenas e fragmentadas que acabam sendo vulneráveis a doenças infecciosas, incluindo aquelas causadas por patógenos com ampla distribuição geográfica e de hospedeiros e que, por sua vez, podem representar riscos também para a saúde pública (Thorne e Williams, 1988; Young, 1994; Altizer et al., 2003; Smith et al., 2009). Neste âmbito, dentre as doenças infecciosas, as parasitoses por vezes têm sido ignoradas, uma vez que quantificar os seus efeitos na espécie hospedeira selvagem é desafiador (Gallu e Sachs, 2001). Entretanto é importante ressaltar que muitos parasitas humanos são de origem zoonótica e acarretam danos importantes, resultando em morbidade, mortalidade e trazem efeitos negativos sobre a economia devido aos altos custos com cuidados médicos, medicamentos e internações hospitalares (Gazzinelli et al., 2012).

É sabido que os patógenos dos animais selvagens representam até 75% dos patógenos zoonóticos emergentes de seres humanos (Taylor et al., 2001). Além disso, estes parasitas podem afetar os esforços de conservação, agindo como uma ameaça que contribui para o comprometimento dos hospedeiros selvagens, e,

ocasionalmente, causando declínios populacionais graves (Cleveland et al., 2001). Neste sentido, algumas espécies de carnívoros selvagens podem atuar como espécies sentinelas, pois são capazes de refletirem as perturbações do meio ambiente, servindo como indicadores de conservação do ecossistema, e ajudam a esclarecer aspectos ecológicos e sanitários que vêm ocorrendo em uma determinada região (Deem et al., 2001; Aguirre et al., 2002).

O Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu), unido ao Parque Nacional Iguazú, na Argentina, representa o mais importante contínuo biológico do Centro-Sul do continente sul-americano. Essas áreas são negativamente influenciadas pela intensa ocupação agrícola e urbana no lado brasileiro e agroflorestal no lado argentino, pela existência de quatro grandes usinas hidroelétricas em seu entorno, pela presença de estradas vicinais que cortam o Parque, além da pressão antrópica direta sobre as suas bordas e a ação de caçadores, pescadores e palmiteiros (Ricobom, 2001). São listadas no PARNA Iguaçu 17 espécies de carnívoros selvagens (Brocardo et al., 2019) que são de grande importância na dinâmica florestal, pois deslocam-se amplamente em seus territórios, atuando ativamente na cadeia trófica e, no caso dos carnívoros generalistas, agem como bons dispersores de sementes (Alves-Costa, 1998; Costa, 2003). O onivorismo das espécies generalistas permite que muitos indivíduos se aproximem de habitações humanas em busca de alimentos, tornando-os mais vulneráveis ao contato com patógenos de animais domésticos (Irvine, 2006).

As parasitoses em animais selvagens de vida livre podem estar latentes ou aparentes, dependendo do ciclo biológico do parasita, e apesar de a monitorização da saúde em animais selvagens de vida livre ser praticamente impossível e um desafio, ela deve ser priorizada em algumas áreas neste século (Galecki et al., 2015). Segundo o conceito de “Uma Saúde”, que visa demonstrar a integração indissociável existente entre a saúde animal, humana e ambiental (OIE, 2016), o monitoramento de doenças em espécies sentinelas é uma forma válida de avaliar a circulação de patógenos em determinada área, fornecendo subsídios para outros estudos epidemiológicos. Além disso, nos últimos anos, tem sido observada expansão da ocorrência de zoonoses de transmissão vetorial para novas regiões geográficas (Barcellos et al., 2009), devido às mudanças climáticas decorrentes do

aquecimento global e da degradação ambiental, com consequente ampliação da distribuição de vetores e de patógenos associados entre animais selvagens, domésticos e os seres humanos (Pampiglione et al., 1995).

Entre as parasitoses transmitidas por vetores estão as filariose, que têm distribuição cosmopolita e são originadas pela infecção por helmintos da família Onchocercidae (Anderson, 2000). Esses parasitos podem ser encontrados em diferentes órgãos, desde tecido subcutâneo (Pampiglione et al., 2001) e cavidades corporais (Magnis et al., 2013) até órgãos importantes como coração e pulmões (Orihel e Eberhard, 1998). No PARNA Iguaçu, foram identificados por técnicas parasitológicas tradicionais, quatro gêneros de filarídeos com potencial zoonótico, *Dirofilaria*, *Brugia*, *Acanthocheilonema* e *Mansonella*, parasitando quatis (*Nasua nasua*) de vida livre, e dois filarídeos parasitando cães domésticos do seu entorno (Moraes et al., 2017). Não existem relatos de filariose humanas no estado do Paraná, provavelmente por subnotificação, uma vez que também não existem registros de *Dirofilaria immitis* na região oeste paranaense, apesar de anticorpos contra o parasita terem sido detectados em 22% dos cães do entorno do PARNA Iguaçu (Moraes et al., 2017). Este fato sugere que, apesar de não existirem casos notificados, a circulação desses filarídeos na região é incontestável.

Outra enfermidade zoonótica transmitida por vetores e de crescente preocupação é a leishmaniose visceral (Werneck, 2014). Essa enfermidade tem sido registrada em novas áreas, caracterizando franca expansão de sua área de ocorrência (Maia-Elkhoury et al., 2008; Souza et al., 2009). Até o ano de 2014, o estado do Paraná era considerado livre desta enfermidade, porém perdeu esse status com o registro dos primeiros casos de leishmaniose visceral canina. Logo no ano seguinte, foram registrados os primeiros casos humanos, com o primeiro óbito já no início de 2016 (Sesa, 2016). O município de Foz do Iguaçu tem importância fundamental na epidemiologia dessa zoonose em território paranaense por ter sido o local da primeira confirmação de caso autóctone. É importante ressaltar que este município recebe anualmente milhares de turistas de todo o mundo para visita das famosas Cataratas do Iguaçu no Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu), correndo o risco de adquirir a doença durante a estadia na região.

Dessa forma, devido à extrema importância para o cenário da saúde pública atual, bem como por ser uma ferramenta complementar na conservação da fauna silvestre local, esta pesquisa visou o estudo de filarioses e leishmaniose visceral em carnívoros generalistas no PARNA Iguaçu e cães domésticos do seu entorno, de modo a entender a relação parasito-hospedeiro estabelecida e a caracterização espacial destes agentes na área de abrangência do referido Parque.

5. CONCLUSÃO

Os cães domésticos da área urbana e do entorno do PARNA Iguaçu são importantes hospedeiros de *L. infantum* na região estudada. Apesar da grande diversidade de espécies selvagens e de ambientes naturais que favorecem um ciclo selvagem de *L. infantum*, a infecção por este parasita não foi detectada em nenhum mamífero selvagem amostrado nesta pesquisa. Este achado alerta para a necessidade de que ações de controle dos vetores e reservatórios domésticos sejam implementadas na região estudada. Até o momento, a leishmaniose visceral vem ocorrendo nas áreas urbanas e periurbanas de Foz do Iguaçu, e estas ações visariam minimizar o risco de o parasita se estabelecer na área florestal, uma vez que a quantidade de espécies de hospedeiros susceptíveis à *Leishmania* spp que habitam o PARNA Iguaçu poderia amplificar o parasita (spillback), o que poderia levar a uma explosão de casos da doença em animais domésticos e seres humanos no entorno do PARNA Iguaçu.

Além disso, a presença de *T. cruzi* na região é mais um fator de alerta, pois não há registros de sua presença no oeste paranaense, sendo este o primeiro relato do parasita no hospedeiro e na localização geográfica. Por se tratar de uma enfermidade de grande importância para a Saúde Pública e que, apesar das diversas ações para seu controle, continua em expansão pelo território nacional, é recomendada a implantação da vigilância entomológica e epidemiológica nas áreas rurais e periurbanas do entorno do PARNA Iguaçu, visando prevenir que ocorram casos da doença em humanos.

6. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 10 (6), 2016.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 7(5), 2012.

ALVES-COSTA, C.P.; FONSECA, G.A.B.; CHRISTÓFARO, C. Variation in the diet of the 27 brown-nosed coati (*Nasua nasua*) in southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, 85(3): 478-28 482, 2004.

ALVES, F.M.; OLIFIERS, N.; BIANCHI, R.C.; DUARTE, A.C.; COTIAS, P.M. Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, 11: 835–841, 2011.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, 30: 1269–1281, 2000.

ASSIMINA, Z.; CHARILAOS, K.; FOTOULA, B. Leishmaniasis: an overlooked public health concern. **Health Science Journals**, 2:196–205, 2008.

BAG, S.; SAHA, B.; MEHTA, O.; ANBUMANI, D.; KUMAR, N.; DAYAL, M. et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**, v. 6, 26775, 2016.

BISETTO-JUNIOR, A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NAVARRO, I. T. Leishmaniose visceral no Estado do Paraná. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 6-7, 2014.

CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; GIRÓN, I.; SHERLOCK, I.A.; GALVÃO, C.; MARTINEZ, A. Fontes e padrões alimentares. In: Carcavallo RU, Girón GI, Juberg J, Lent H (orgs) **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz, p. 537-560, 1997.

CHAGAS, C. Nova especie morbida do homem, produzida por um Trypanozoma (Trypanozoma cruzi): nota prévia. **Brazil-Médico**, Rio de Janeiro, 23 (16), p.161, 1909.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110(3): 277-82, 2015.

COUSIÑO, B. Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay. In: **Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) editors**. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. Rio de Janeiro. Panaftosa/OPS. p. 34-36. 2006.

DAHROUG M.A., ALMEIDA A.B., SOUSA V.R., DUTRA V., TURBINO N.C., NAKAZATO L.; DE SOUZA R.L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 104:73-74, 2010.

DARIO, M.A. **Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de triatomíneos silvestres coletados no estado do Espírito Santo**. Vitória, ES. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas] – Universidade Federal do Espírito Santo; 2013.

DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, 3: 336-341, 1987.

DIAS, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Rev Soc Bras Med Trop**, 39(4): 370-5, 2006.

DIAS, R.C.F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PASQUALI, A.K.S.; ALBAN, S.M.; FENDRICH, R.C.; POZOLLO, E.M.; CHIYO, L.; BISETTO-JÚNIOR, A.; PINTO, F. Variables associated with the prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs on the tri-border of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, 27 (3): 338-347, 2018.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186–94, 1998.

FIGUEIREDO, F.B.; GREMIÃO, I.D.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A.; SCHUBACH, T.M.; MADEIRA M.F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102:200-201. 2008.

FRAGA, J.; MONTALVO, A.M.; DE DONCKER, S. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infectious, Genetics and Evolution**, 10:238–45. 2010.

GALVÃO, C. **Vetores da Doença de Chagas no Brasil** (SciELO Boo). Curitiba: 2014.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. CONSED: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, 8, p. 195-202, 1998.

GREEN, P. PHRAD documentation, 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

HERRERA, H.M.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; OLIFIERS, N.; BIANCHI, R.C. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main

lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102: 1133–1139. 2008.

HOTEZ PJ, BOTTAZZI ME, FRANCO-PAREDES C, AULT SK AND PERIAGO MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2: 1-10. 2008.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. «Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies». **Molecular, Biologia and Evolution**, 23 (2). p. 254–267, 2006.

HUSON, D.H.; SCORNAVACCA, C. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. **Systematic Biology**. 61, 2012.

IBAMA. **Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza. Brasília, 2000.

JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L.R. **Domestic and wild mammalian reservoirs**. Chapter 11. In: J. Telleria and M. Tibayrenc (eds.). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier, Burlington. 2010.

JANSEN, A.M; XAVIER, S.C.; ROQUE, A.L. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Tropical**, 151:1- 15, 2015.

JURBERG, J.; GALVÃO, C.; NOIREAU, F.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; LENT, H. Uma iconografia dos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae). **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. Entomología y Vectores 11. Rio de Janeiro: Universidade Gama Filho, p. 457-494, 2004.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals

genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, 9, 334–343. 2007.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 163: 123-520, 1979.

LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; YEO, M.; ACOSTA, N.; GAUNT, M.W.; MILES, M.A. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 5:e1363, 2011.

LOPES, E. G.;, GERALDO JUNIOR, C.A.; MARCILI, A.; SILVA, R.D.; KEID, L.B; OLIVEIRA, T.M.F.da S.; SOARES, R. M. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo** [online], vol.58, 41, 2016.

LUPPI, M.M.; MALTA, M.C.C.; SILVA, T.M.; SILVA, F.L.; MOTTA, R.O.; MIRANDA, I.; ECCO R.; SANTOS, R.L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 155:146-151. 2008.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 13(2): 226-35, 2014.

MALTA, M.C.; TINOCO, H.P.; XAVIER, M.N.; VIEIRA, A.L.; COSTA, E.A.; SANTOS, R.L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 169:193-197, 2010.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.N. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, 39:615-23, 2009.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical Veterinary Entomology Journal**, 27: 123–47. 2013.

MAURÍCIO, I.L. *Leishmania* taxonomy. In: Bruschi F, Gradoni L, editors. **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. Rome: Springer International Publishing. p. 15–30. 2018.

MAURÍCIO, I.L.; YEO, M.; BAGHAEI, M.; DOTO, D.; PRATLONG, F.; ZEMANOVA, E.; DEDET, J. P.; LUKES, J.; MILES, M. A. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **International Journal for Parasitology**, 36, 757–769. 2006.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A.M. Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, 40(2):26. 2009.

NOWAK, R.M. **Walkers carnivores of the world**. USA: The John Hopkins University Press. 313 p. 2005.

NOYES, H.A.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN J.; HOLZ, P. A nested PCR for 291 the ssrRNA gene detects Trypanosoma binneyi in the platypus and Trypanosoma 292 sp. In wombats and kangaroos in Australia. **Int. J. Parasitol.**, 29, 331-39, 1999.

OLIFIERS, N.; BIANCHI, R de C.; D'ANDREA, P.S.; MOURÃO, G.; GOMPPER, M.E. Estimating age of carnivores from the Pantanal region of Brazil. **Wildlife Biology**, v. 16, p. 389-24 399, 2010.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 129:219-227. 2005.

PASQUALI, A.K.S.; BAGGIO, R.A.; BOEGER, W.A.; GONZALEZ-BRITEZ, N.; GUEDES, D.C.; CHAVES, E.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 13(8):e0007639, 2019.

PORFIRIO, G.E.O.; SANTOS, F.M.; DE MACEDO, G.C.; BARRETO, W.T.G.; CAMPOS, J.B.V.; MEYERS, A.C.; ANDRÉ, M.R.; PERLES, L.; DE OLIVEIRA, C.E.; XAVIER, S.C.D.C.; ANDRADE, G.B.; JANSEN, A.M.; HERRERA, H.M. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, 17;7(3):398-404. 2018.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 136:1915–1934. 2009.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. **Chagas disease**. *Lancet*, 375(9723): 1388-402, 2010.

REBELO, J.M.M. Distribuição de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera , Reduviidae, Triatominae) no Estado do Maranhão, Brasil. **Acta Amazonica**, 29(3): 455-461, 1999.

RIBEIRO, A.R.; LIMA, L.; ALMEIDA, L.A. de; MONTEIRO, J; MORENO, C.J.G.; NASCIMENTO, J.D.; ARAÚJO, R.F.; MELLO, F.; MARTINS, L.P.A.; GRAMINHA, M.A.S.; TEIXEIRA, M.M.G.; SILVA, M.S. Biological and Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains from Four States of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 98(2), 453–463, 2018.

ROCHA, F.L.; ROQUE, A.L.; ARRAIS, R.C.; SANTOS, J.P.; LIMA, V.S.; XAVIER, S.C.; CORDEIR-ESTRELA, P.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**. 2013.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SALOMÓN, O.D.; FERNÁNDEZ MS, SANTINI MS, SAAVEDRA S, MONTIEL N, RAMOS MA. Distribution de *Lutzomyia longipalpis* em la Mesopotamia Argentina. **Med (Buenos Aires)**, 71:22-26. 2010.

SANTIAGO, M.E.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, O.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, 150:283-290, 2007.

SANTOS, D.R.DOS; FERREIRA, A. C.; BISETTO-JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 45, n. 5, p. 643-645, Oct. 2012.

SCHALLIG, H.O.; DA SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host of zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne Zoonotic Diseases**, 7:387-393, 2007.

SECRETARIA DE SAUDE DO PARANÁ, SESA. **Paraná registra primeiro caso de leishmaniose visceral em humanos**. Curitiba, 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, 4(6): 845-52, 2012.

SILVA, A.V.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.; CARREIRA, J.C. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Caderno de Saúde Pública**, 21:324-8. 2005.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002, 141p.

SIM, J.; WRIGHT, C. The Kappa statistic in reliability studies: Use, interpretation, and sample size requirements. **Physical Therapy**, 85 (3), 257-268, 2005.

SOUZA, N.P.; ALMEIDA, A.B.P.F.; FREITAS, T.P.T.; PAZ, R.C.R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43:333- 335. 2010.

SOUZA, R.F. de; MACHADO, S. do A.; GALVAO, F.; FIGUEIREDO FILHO, A. Fitossociologia da vegetação arbórea do Parque Nacional do Iguaçu. **Ciências Florestais** [online], vol.27, n.3, 2017.

SOUZA, T.D.; TURCHETTI, A.P.; FUJIWARA, R.T.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, 200:233-241. 2014.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv. Parasitol.**, 48: 1-56, 2001.

STEVENSON, M. **An R package for the analysis of epidemiological data**. 2012. URL: <http://epicentre.massy.ac.nz>.

THOMAZ-SOCCOL, V.; PASQUALI, A.K.S.; POZZOLO, E.M.; LEANDRO, A.S.; CHIYO, L.; BAGGIO, R.A.; MICHAELISZYN, M.S.; SILVA, C.S.; CUBAS, P.H.; PETERLLE, R.; PAZ, O.L.S.; BELMONTE, I.L.; BISETTO-JÚNIOR, A. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS ONE**, 12(12): e0189182, 2017.

TOLEDO, M.J.O.; KUHL, J.B.; SILVA, J.C.; GASPERI, V. AND ARAÚJO, S.M. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no Estado do Paraná, sul do Brasil, Resultados preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30, 197-203, 1997.

VILLELA, M.M.; RODRIGUES, V. L. C.C.; CASANOVA, C.; DIAS, J.C.P. Análise da fonte alimentar de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) e sua atual importância como vetor do *Trypanosoma cruzi*, no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(2):125-128, 2010

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.J. Origins of chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, 35:225-33, 2005.

WESTENBERGER, S.J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, 171:527–43, 2005.

ZEMANOVA, E.; JIRKU, M.; MAURÍCIO, I.L.; HORAK, A.; MILES, M.A.; LUKES, L. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **International Journal for Parasitology**, 37, 149–160. 2007.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infectious, Genetics and Evolution**, 12:240-53, 2012.

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quatis do Parque Nacional do Iguaçu, dentre os carnívoros selvagens avaliados nesta pesquisa, demonstraram ser excelentes animais sentinelas para o estudo de agentes infecciosos com potencial zoonótico. A presença de cinco espécies de filarídeos parasitando este hospedeiro, além da infecção por *Trypanosoma cruzi*, indica o potencial desta espécie de carnívoro generalista como importante reservatório de patógenos na Mata Atlântica. Desta forma, é de suma importância que, em programas de vigilância em saúde, esta espécie seja incluída como espécie-chave em levantamentos e monitoramentos de enfermidades zoonóticas na região.

Apesar do número crescente de casos de leishmaniose visceral canina na cidade de Foz do Iguaçu – PR, com base nos dados levantados nesta pesquisa é possível afirmar que *Leishmania infantum* tem circulado prioritariamente na área urbana da cidade, tendo os cães domésticos como reservatório da doença. Além disso, os mamíferos selvagens avaliados no PARNA Iguaçu não apresentaram infecção por *Leishmania spp.*, apesar de poderem atuar como reservatórios de algumas espécies do gênero, e dessa forma, sugere-se que não tenham importância epidemiológica no ciclo da enfermidade que vêm ocorrendo na região atualmente.