

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

Investigação da presença de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos silvestres no município de Botucatu, São Paulo

LARISSA PEREIRA RODRIGUES

BOTUCATU, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

Investigação da presença de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em
pequenos mamíferos silvestres no município de Botucatu, São Paulo

LARISSA PEREIRA RODRIGUES

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Animais Selvagens como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Assoc. Lígia Souza Lima Silveira da
Mota.

Coorientadora: Profa. Assoc. Renata Cristina Batista
Fonseca

BOTUCATU, 2022

R696i	<p>Rodrigues, Larissa Pereira</p> <p>Investigação da presença de <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> em pequenos mamíferos silvestres no município de Botucatu, São Paulo / Larissa Pereira Rodrigues.</p> <p>-- Botucatu, 2022</p> <p>71 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu</p> <p>Orientadora: Lígia Souza Lima Silveira da da Mota</p> <p>Coorientadora: Renata Cristina Batista Fonseca Fonseca</p> <p>1. zoonoses. 2. reservatório. 3. pequenos mamíferos. 4. leishmaniose. 5. doença de Chagas. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Aos meus pais Luzia e José Nilton, as pessoas que mais amo no mundo.

AGRADECIMENTOS

A minha família, que esteve sempre presente em todas as etapas da minha vida, me apoiando e realizando junto comigo os meus sonhos.

Aos meus pais, Luzia e José Nilton que abriram mão de muitas coisas para que eu pudesse prosseguir na minha formação acadêmica, sempre acreditando na educação como ferramenta de transformação social, me apoiando e me incentivando nesta jornada.

As minhas irmãs, Patrícia, Vanessa, Vania e Roberta que me ajudaram ao longo de toda a minha graduação e no mestrado não poderia ser diferente, assim como os meus pais, sempre me incentivando, me auxiliando e cuidando dos meus pais enquanto eu estava longe.

Aos meus sobrinhos, Gyovanna, Arthur, Fernanda, Yasmin, Kaique, Mikael, e agora a pequena Helena, que se espelham e acreditam em mim, que muitas vezes foram plateia para eu treinar minhas apresentações, me deixando mais calma e segura.

Aos meus tios postiços que estiveram sempre presentes ao longo desses anos, a Maura que me acompanhou junto com a minha mãe durante a mudança para Botucatu e me ligava todos os finais de semana para saber como estava a faculdade. Ao Tio Zé a Dona Cida por me acolherem e serem meu primeiro lar em Botucatu, e assim como os demais, sempre acreditando e torcendo por mim. Infelizmente Maura e dona Cida não se encontram mais aqui, mas tenho certeza que estão vibrando pela minha conquista onde quer que estejam.

Aos meus amigos do grupo “Todo mundo se vestido”, Giovana, Camarão, Carolina, a família que eu pude escolher para viver comigo a graduação e se fazem presentes até hoje. Obrigada por me auxiliarem em cada prova, cada atividade, cada aula junto, sem vocês eu jamais teria conseguido. A Giovana, por ser uma das melhores amigas, por ser a minha gêmea da terceira idade, que saía comigo para comprar chás e tricôs, que sempre me deu colo, me acolheu como irmã, meu deu muitas caronas, soltou muitos gambás, e me auxiliou sempre que possível nas atividades do mestrado e da vida. Ao Camarão, que sentou do meu lado na biblioteca para estudar na primeira semana de aula comigo, e nunca mais saiu. A Carolina que me salvou em diversos momentos, sendo na faculdade ou em casa quando dividimos apartamento. Eu amo vocês!

Aos meus amigos Pérola e Alan, que também estiveram presentes ao longo da graduação e me dão suporte até hoje.

Aos meus antigos amigos de república Surra, Smeagol, Beijo e Tuani, que tornaram meus dias mais felizes e também são uma família que eu pude escolher.

As minhas amigas Águeda e Clarice da UNB, e as demais pessoas que tive a oportunidade de conhecer lá, por me acolherem, me ensinarem grande parte do que sei hoje de atividades de campo e manejo de pequenos mamíferos.

A minha orientadora Ligia Mota, que me acolheu de braços abertos em seu laboratório, estando sempre presente e me auxiliando ao longo de todo o mestrado. Obrigada por confiar no meu trabalho, acreditar nas minhas ideias e por ser uma orientadora maravilhosa que me inspira diariamente.

A minha coorientadora Renata Fonseca pelo suporte com as atividades de campo.

Aos meus amigos de Laboratório Bruna e Pedro, que pegaram na minha mão, me ensinaram todas as técnicas moleculares utilizadas nesse trabalho, me auxiliaram sempre que necessário, se tornando meus amigos independente da academia.

A minha equipe de campo, Eduardo, João, Laura, Mateus e novamente ao Pedro, que estiveram presentes em todos os momentos, me auxiliando na captura e manejo dos animais, na instalação das armadilhas, nas solturas dos gambás, nas fotografias. A ajuda de vocês foi fundamental para esse trabalho acontecer, obrigada por tanto!

Ao Marcelo Santos da Silva por auxiliar nas atividades de biologia molecular, cedendo as amostras de *Leishmania* e *Trypanosoma*.

À Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação, Dra. Débora Andrade Silva e Dr. William Pinheiro Costa pelas sugestões que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos membros da Comissão Examinadora da defesa de Dissertação de Mestrado Dr. Marcelo Santos da Silva e Dr. Felipe Fornazari pelo interesse e disponibilidade em analisar o trabalho e pelas considerações que foram de extrema importância para que a finalização do trabalho.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, que foi minha casa durante todos esses anos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Programa de Pós Graduação em Animais Selvagens.

À Vigilância Ambiental em Saúde do município de Botucatu por ceder os animais participantes deste estudo.

À Faculdade de Ciências Agronômicas por ceder as áreas de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

meu recado às mulheres

contem suas histórias

descubra o poder
de milhões de vozes
que foram caladas
por séculos.

Ryane Leão

RESUMO

RODRIGUES, L. P. Investigação da presença de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos silvestres no município de Botucatu, São Paulo. Botucatu, 2022. 71 p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMVZ – UNESP).

Problemas ecológicos envolvendo a destruição da fauna e da flora são consequências da crescente urbanização, promovendo maior contato com animais sinantrópicos, possibilitando a emergência ou reemergência de zoonoses como leishmanioses e doença de Chagas. O papel dos mamíferos silvestres como potenciais reservatórios tem sido discutido. Espécies silvestres de ordens distintas como gambás (*Didelphis* spp.) e roedores já se apresentam como potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar pequenos mamíferos com protozoários causadores das leishmanioses e/ou doença de Chagas, por meio de técnicas moleculares. O estudo foi desenvolvido em Botucatu, São Paulo e foram amostrados fragmentos de vegetação natural nas Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado. Para captura dos animais de vida livre foram utilizadas armadilhas de interceptação e queda, Shermans e Tomahawks, além de animais resgatados em domicílios e cedidos pela Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) de Botucatu. Foram capturados 51 indivíduos de seis gêneros em campo (*Didelphis albiventris* e *Gracilinanus microtarsus*, *Akodon* sp., *Juliomys ossitenius*, *Juliomys pictipes*, *Necromys lasiurus*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes*) e 65 cedidos pela VAS (*Didelphis albiventris*, *Guerlinguetus aestuans* e *Lutreolina crasicaudata*), totalizando 115 animais pertencentes às ordens Didelmorpha e Rodentia. Os animais foram identificados, tiveram material biológico coletado, e após os procedimentos, encaminhados para a soltura em locais adequados. A partir do material coletado foi realizada a extração de DNA e PCRs empregando *primers* específicos previamente avaliados em testes de sensibilidade a detecção dos patógenos. Todas as amostras obtiveram resultados negativos para a presença de DNA dos agentes causadores de leishmanioses e doença de Chagas, os *primers* se mostraram para detecção destes patógenos. Ainda que os resultados obtidos neste trabalho não tenham identificado a presença destes protozoários nas amostras analisadas, os pequenos mamíferos foram relatados como reservatórios destes parasitas e a atenção para com esses animais deve se manter sempre ativa.

Palavras chave: zoonoses, reservatório, pequenos mamíferos, leishmaniose, doença de Chagas.

ABSTRACT

RODRIGUES, L. P. Investigation of the presence of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in small wild mammals in Botucatu, São Paulo. Botucatu, 2022. 71 p. Dissertation (Master in Wild Animals) Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (FMVZ – UNESP).

Ecological problems involving the destruction of fauna and flora are consequences of increasing urbanization, promoting more significant contact with synanthropic animals, and enabling the emergence or reemergence of zoonoses such as leishmaniasis and Chagas disease. The role of wild mammals as potential reservoirs has been discussed. Wild species of different orders such as skunks (*Didelphis* spp.) and rodents are already potential reservoirs of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. The present study aimed to diagnose small mammals with protozoa that cause leishmaniasis and/or Chagas disease, using molecular techniques. The study was carried out in Botucatu, São Paulo, and samples were collected in fragments of natural vegetation at the Edgárdia and Lageado Experimental Farms. To capture the free-living animals, traps and pitfalls, Shermans and Tomahawks were used, in addition to animals rescued from homes and provided by the Environmental Health Surveillance (VAS) of Botucatu. Fifty-one individuals of six genera were captured in the field (*Didelphis albiventris* and *Gracilinanus microtarsus*, *Akodon* sp., *Juliomys ossitenius*, *Juliomys pictipes*, *Necomys lasiurus*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes*) and 64 provided by VAS (*Didelphis albiventris*, *Guerlinguetus aestuans* and *Lutreolina crasicaudata*), totalling 115 animals belonging to the Didelmorpha and Rodentia orders. The animals were identified, had biological material collected, and after the procedures, they were released in appropriate places. DNA extraction and PCRs were performed using specific primers that underwent sensitivity tests from the collected material. All samples obtained negative results for the presence of DNA of the causative agents of leishmaniasis and Chagas disease, the primers were shown to detect these pathogens. Although the results obtained in this work did not identify the presence of these protozoa in the analyzed samples, small mammals were reported as reservoirs of these parasites and attention to these animals must always remain active.

Keywords: zoonoses, reservoir, small mammals, leishmaniasis, Chagas disease.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIQ – Armadilha de interceptação e queda

CEMPAS – Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DC – Doença de Chagas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDG – Fragmento Fazenda Experimental Edgárdia

EDG 1 – Parcela um da Fazenda Experimental Edgárdia

EDG 2 – Parcela dois da Fazenda Experimental Lageado

FEE – Fazenda Experimental Edgárdia

FEL – Fazenda Experimental Lageado

ha – Hectares

kDNA – DNA do cinetoplasto

LAG – Fragmento Fazenda Experimental Lageado

LAG 1 – Parcela um da Fazenda Experimental Lageado

LAG 2 – Parcela dois da Fazenda Experimental Lageado

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

ng - nanograma

ng/ μ L – Nanograma/ Microlitro

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

v – volt

VAS – Vigilância Ambiental em Saúde

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da Fazenda Experimental Edgardia, destacando as parcelas amostradas: Fazenda Edgardia 1 (EDG 1), Fazenda Edgardia 2 (EDG 2).	26
Figura 2. Mapa da Fazenda Experimental Lageado, destacando as parcelas amostradas: Fazenda Lageado 1 (LAG 1), Fazenda Lageado 2 (LAG 2).	26
Figura 3. Armadilhas utilizadas para a captura de pequenos mamíferos. (a): Armadilha de interceptação e queda; (b): Sherman e (c): Tomahawk.....	28
Figura 4. Coleta de sangue. (a): coleta por gotejamento a partir da veia facial em roedores; (b): coleta por venopunção a partir da veia caudal em marsupiais.	29
Figura 5. Animais resgatados pela Vigilância Ambiental em Saúde. (a) e (b): <i>Didelphis albiventris</i> ; (c) e (d): <i>Lutreolina crasicaudata</i> ; (e): <i>Guerlinguetus aestuans</i>	32
Figura 6. Local de resgate dos animais retirados pela VAS no município de Botucatu e cedidos e cedidos ao presente estudo.....	33
Figura 7. Marsupiais capturados nas parcelas amostradas. (a) e (b): <i>Didelphis albiventris</i> ; (c) e (d): <i>Gracilinanus microtarsus</i>	35
Figura 8. Roedores capturados nas parcelas amostradas. (a): <i>Akodon</i> sp. (b): <i>Necromys lasiurus</i> ; (c) e (d): <i>Oligoryzomys nigripes</i> ; (f): <i>Juliomys ossitenius</i>	35
Figura 9. Abundância e riqueza das Fazendas Experimentais Edgárdia (azul) e Lageado (laranja).....	36
Figura 10. Índices de diversidade e equabilidade na Fazendas Experimentais Edgárdia (azul) e Lageado (laranja).	36
Figura 11. Curva de acumulação de espécies ou curva do coletor.	37
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Coluna 2: controle negativo; Coluna 3: Amostra de DNA de <i>T. cruzi</i> . As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).	38
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Coluna 2: controle negativo; Coluna 3: Amostra de DNA de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; Coluna 4: Amostra de DNA de <i>L. (L.) infantum</i> ; Coluna 5: Amostra de DNA de <i>L. (L.) major</i> ; Coluna 6: Amostra de DNA de <i>Leishmania (Viannia)</i>	38

braziliensis. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70 em diferentes concentrações de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *L. (V.) braziliensis* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....

39

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações de DNA deste protozoário. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *T. cruzi* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....

39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade dos conjuntos de primers na detecção dos patógenos em diferentes diluições.....	31
Tabela 2. Espécies de pequenos mamíferos não-voadores cedidos pela VAS.....	32
Tabela 3. Lesões apresentadas por indivíduos da espécie <i>Didelphis albiventris</i>	34
Tabela 4. Espécies de pequenos mamíferos não-voadores registrados nas Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado.....	34

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
1 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Zoonoses e Trypanosomatidae	16
1.2 <i>Leishmania</i> spp. e as Leishmanioses	16
<u>1.2.1 Leishmaniose Tegumentar</u>	17
<u>1.2.2 Leishmaniose Visceral</u>	18
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	20
1.4 Pequenos mamíferos como reservatório de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.5 Biologia molecular como ferramenta de diagnóstico	23
2 OBJETIVO	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Locais de estudo	25
<u>3.1.1 Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado</u>	25
<u>3.1.2 Vigilância Ambiental em Saúde (VAS)</u>	27
3.2 Captura de pequenos mamíferos	27
3.3 Armadilhas de interceptação e queda	27
3.4 Armadilhas do tipo gaiola	28
3.5 Coleta de material biológico	29
3.6 análises moleculares	29
<u>3.6.1 Extração de DNA</u>	29
<u>3.6.2 Detecção de <i>Leishmania</i> spp.</u>	30

3.6.3 Detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3.6.4 Teste de sensibilidade dos primers	31
3.6.5 Visualização dos produtos amplificados na PCR.....	31
3.7 Análise de dados.....	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Animais provenientes da vigilância ambiental em saúde.....	32
4.2 Animais capturados em campo.....	34
4.3 Análises moleculares	38
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTIFICO	53
ABSTRACT	54
RESUMO	54
INTRODUCTION	55
MATERIAL AND METHODS.....	56
RESULTS AND DISCUSSION	59
ACKNOWLEDGMENT.....	60
BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.....	60
ANEXOS	66
Anexo 1. Protocolo de extração de DNA – sangue fenol/clorofórmio	66
Anexo 2. Lista de endereços dos animais capturados e cedidos pela VAS.....	67

CAPÍTULO I

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Zoonoses e Trypanosomatidae

Problemas ecológicos envolvendo a destruição da fauna e da flora são consequências da crescente urbanização, promovendo maior contato com animais sinantrópicos, possibilitando a emergência ou reemergência de zoonoses causadas por diferentes agentes etiológicos (FEITOSA et al., 2020). As zoonoses são enfermidades que acometem os animais vertebrados, incluindo os seres humanos (COLVILLE; BERRYHILL, 2007) com ocorrência global. Essas doenças incluem uma ampla diversidade de vetores e de agentes patológicos, como fungos, vírus, bactérias, protozoários e helmintos, (GUILLAUMOT, 2005; HAN; KRAMER, DRAKE, 2016) e geram impactos na saúde única mundial (FEITOSA et al., 2020).

Nesse contexto, destaca-se a importância do conceito de Saúde Única (*One Health*), que busca discutir os aspectos indissociáveis da saúde humana, animal e ambiental. Essa abordagem sugere que as condições sanitárias dos seres humanos estão relacionadas com a saúde animal e, ambas as populações, afetam o ambiente no qual coexistem e são igualmente afetadas pelo mesmo (LIMONGI; OLIVEIRA, 2020). Essa percepção ampla das situações de saúde tem possibilitado a adoção de medidas mais efetivas de saúde-adoecimento e cuidado.

Diante disso, a família Trypanosomatidae é um grupo que reúne espécies de protozoários de diversos gêneros de interesse médico, veterinário e agrícola. Esses microrganismos são capazes de infectar um grande número de vertebrados e invertebrados (que agem como vetores) (PODLIPAEV, 2001). Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais conhecidos dessa família e causam diversas doenças (HOARE, 1972) nas quais os mecanismos de interação parasita-hospedeiro-ambiente são complexos e carecem estudos (COOPER et al., 2017).

1.2 *Leishmania* spp. e as leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que são transmitidas aos mamíferos silvestres, domésticos e ao homem por meio da picada de fêmeas de dípteros chamados flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) (GALATI; OVALLOS, 2012; MCINTYRE et al., 2017; QUARESMA; 2011) e faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021).

Os flebotomíneos são insetos conhecidos popularmente como “mosquito-palha” e geralmente se deslocam por apenas alguns metros, durante o crepúsculo ou à noite. Os criadouros naturais incluem diversos microhabitats, mas a maioria das espécies estão associadas a ambientes naturais como florestas e cavernas. De maneira geral, se adaptam bem a locais úmidos, escuros e ricos em matéria orgânica (MARCONDES, 2011). Ao se alimentarem de um reservatório vertebrado parasitado os flebotomíneos são infectados. Por meio do repasto sanguíneo eles ingerem sangue e tecido contendo macrófagos com amastigotas, que se diferenciam em promastigotas no sistema digestivo do vetor (AZAMI-CONESA et al., 2021).

Estas doenças apresentam uma heterogeneidade epidemiológica e clínica atribuída à diversidade de espécies de parasitas, vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos (QUARESMA, 2011). A maioria dos humanos e animais infectados pelo parasita não desenvolvem sintomas mas, quando presente, a doença pode seguir três formas clínicas básicas em humanos: cutânea, mucocutânea e visceral enquanto que, em animais, são observadas apenas as formas cutânea e/ou visceral (AZAMI-CONESA et al., 2021).

Historicamente, as leishmanioses tem sido difundidas em climas tropicais em vários continentes, incluindo Europa, África, Ásia e Américas (MAXFIELD; CRANE, 2021). Até o ano de 2018, 92 países foram considerados endêmicos ou já haviam reportado casos de leishmanioses dos tipos cutânea e/ou visceral (OMS, 2020).

1.2.1 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma enfermidade infecciosa, não contagiosa, que produz úlceras na pele e mucosas. Existe uma variedade de protozoários envolvidas nos casos de LT no Brasil, dentre essas, as mais importantes são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Estima-se que, anualmente ocorram um milhão de novos casos de LT no mundo (OMS 2020). No continente americano há registros de casos de LT desde os Estados Unidos até a Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (RODRÍGUEZ; DÍAZ; PÉREZ, 2013).

Todas as regiões do Brasil possuem registros de casos de LT devido as características específicas de ocupação de territórios e de ecossistemas que propiciam a existência de habitats e ambientes onde localizam-se diferentes vetores e hospedeiros do parasita. No entanto, ambientes florestais antropizados associados ao desmatamento e a urbanização próximas as florestas apresentam casos mais frequentes da doença, favorecendo o desenvolvimento do ciclo peridomiciliar das leishmanioses (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Estima-se que de 72.000 a 120.000 pessoas sejam afetadas no Brasil anualmente. E no estado de São Paulo foram notificados 4.388 casos entre os anos de 2007 a 2018, além de 221 casos no ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Não foram encontrados dados do contexto municipal de LT na cidade de Botucatu

Os roedores silvestres são considerados os principais reservatórios da espécies de *Leishmania* causadoras da LT (AZAMI-CONESA et al., 2021).

1.2.2 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma doença de evolução crônica, com acometimento sistêmico e, quando não tratada de forma adequada, pode levar a óbito em até 90% dos casos. Em humanos, apenas uma parcela dos indivíduos infectados desenvolve a enfermidade. Estima-se que ocorram anualmente 30.000 novos casos de LV (OMS 2020). No Brasil o agente etiológico da LV é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O Brasil é o país com maior ocorrência de LV na América Latina, tendo em média 90% dos casos registrados no continente. O primeiro caso foi descrito em 1913 no Mato Grosso. No ano de 1934, 41 casos foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem* em pacientes da região Norte e Nordeste. A partir deste momento, a enfermidade vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, incluindo mudanças importantes no padrão de transmissão. Anualmente são registrados em média cerca de 3.500 casos (2,0 casos/100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A evolução da leishmaniose visceral no estado de São Paulo vem ocorrendo de maneira concomitante ao desmatamento associado as fronteiras agrícolas no centro-oeste do estado (MORETTI; FERREIRA, 2011). Até a década de 90, o estado de São Paulo era considerado livre de casos autóctones de LV, onde os vetores estavam presentes apenas em áreas rurais de alguns municípios (PAULA et al., 2020). Todavia, esse cenário vem se modificando e, até o ano de 2018, o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi detectado em 201 municípios do estado (SUCEN, 2018). De acordo com o Ministério da Saúde, foram registrados 72 casos de LV em humanos no ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

No município de Botucatu não foram identificados casos positivos autóctones de LV (COIRO et al., 2014) e o vetor *Lutzomyia longipalpis* não foi encontrado nos levantamentos entomológicos realizados pela SUCEN até o ano de 2018. Entretanto, há registros do vetor em cidades próximas como Agudos, Bauru e Barra Bonita e recentemente (SUCEN, 2018).

O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) atua como importante reservatório de *L. (L.) infantum*, sendo a principal fonte de infecção para os humanos em ambientes urbanos. Estima-se que, para cada caso humano relatado, exista em média 200 cães infectados (SOLANO-GALLEGU et al., 2011).

Um estudo empregando anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* foi realizado em mamíferos silvestres de vida livre pertencentes a 38 espécies na região de Botucatu. O resultado mostrou anticorpos nas espécies *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco), *Lepus europaeus* (lebre europeia), *Sphiggurus villosus* (ouriço-cacheiro), *Nasua nasua* (quati), *Eira barbara* (irara) e *Galictis* (furão). Já os gambás não foram soropositivos nesse estudo, porém a possibilidade de infecção nesses animais não deve ser descartada (PAIZ et al., 2015).

1.3 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana, conhecida como doença de Chagas também é uma doença tropical negligenciada (DTN), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). É considerada um problema de saúde com implicações socioeconômicas em países da América Latina, devido a mortalidade precoce, altos custos com assistência médica e previdenciária, além da perda de anos de vida por incapacidade (SIMÕES et al., 2018; WHO, 2002).

A enfermidade apresenta uma fase aguda, que pode ser sintomática e uma fase crônica que se manifesta de diferentes formas. A transmissão ocorre de diversas maneiras, com destaque para a vetorial, devido ao contato com as fezes dos “barbeiros” (ordem, subfamília Triatominae) contaminadas (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Além disso, pode ser transmitida via oral, por ingestão de alimentos contaminados, ou ainda transfusão de sangue infectado, transmissão vertical, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (GUHL; RAMÍREZ, 2021) .

Anteriormente, essa doença era considerada um problema de saúde pública apenas na América Latina contudo, se expandiu para áreas não endêmicas como Canadá, EUA e países da Europa (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Atualmente estima-se que sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo protozoário em todo o mundo e 75 milhões de pessoas correm risco de contrair a infecção. (WHO, 2022).

Os primeiros dados entomológicos e sorológicos sobre a doença no Brasil foram realizados entre os anos de 1975 a 1983 trazendo informações sobre as áreas endêmicas da enfermidade e priorizando esses locais para as ações de controle (SILVEIRA, REZENDE, 1994). Por meio de programas de controle vetorial e melhoria nas condições de moradia, houve uma diminuição na incidência da doença. No entanto, no Nordeste, o número de casos ainda é alarmante, tendo em vista que essa região possui uma grande quantidade de vetores secundários (ARRAIS et al., 2019; COSTA et al., 2018).

Atualmente a transmissão oral tem se mostrado uma importante via de infecção no Brasil, e está frequentemente envolvida nos casos agudos de DC registrados no país nos últimos anos, com destaque para a região amazônica (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021; SANTOS et al., 2020). Isso ocorre dado ao elevado consumo de alimentos contaminados e não pasteurizados, como produtos naturais de palma açáí (*Euterpe oleracea*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*) (SANTOS et al., 2020).

No estado de São Paulo, entre os anos de 1985 e 2006, foram registrados em média 40.000 óbitos por DC (SANTO, 2009). Até 2019, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), foi o órgão responsável pela investigação da presença dos vetores associados às infecções por *T. cruzi* em ambiente intradomiciliar (DE CARVALHO et al., 2011). Atualmente existem fatores que geram preocupação quanto a possível reemergência da transmissão vetorial no estado: o frequente encontro de marsupiais (*Didelphis* spp.) (TEODORO et al., 2019) e triatomíneos (*Panstrongylus megistus*) (RIMOLDI et al., 2016).

Existem registros disponíveis sobre paciente positivos que realizam ou realizaram acompanhamento médico ambulatorio de Doenças Tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. A maioria dos casos está associada a prováveis picos de transmissão entre 1950 e 1970, no entanto, até o ano de 2018, novos pacientes foram acometidos (NUNES, 2020). Acredita-se que pessoas que foram infectadas até o ano de 1983 têm conhecimento de como contraíram a doença (DE GODOY; MEIRA, 2007).

Cachorros e gatos também foram diagnosticados como positivos para *T. cruzi* (LUCHEIS et al., 2005; LUCIANO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2009; ELOY, 2010;), o que poderia indicar um novo ciclo de transmissão em que algum vetor secundário possa estar envolvido, mesmo que não tenha sido detectado em residências, criando um estado de alerta para a vigilância da doença na cidade (LUCHEIS et al., 2005). Os dados sobre DC em Botucatu referem-se a seres humanos e cachorros, sem informações sobre a participação de mamíferos silvestres como reservatórios.

1.4 Pequenos mamíferos como reservatório de *Leishmania* e *Trypanosoma*

Os pequenos mamíferos são os responsáveis pela formação do grupo ecológico mais diversificado e que compõem a maior parte da riqueza de mamíferos brasileiros. No Brasil existem, em média, 240 espécies de pequenos mamíferos (REIS et al., 2006). No entanto, esse número pode ser subestimado, devido as grandes divergências taxonômicas e as descobertas de novas espécies que vem ocorrendo ao longo dos anos (WEKSLER et al., 2020).

Esses animais apresentam características bem definidas, como tamanho reduzido, alta taxa metabólica e uso de territórios de pequena dimensão, além de diversas estratégias de forrageamento (COROMINAS, 2004), sendo capazes de responder de maneira efetiva as modificações ambientais (PARDINI et al., 2005; NICOLA, 2009). Em contrapartida, existem algumas espécies generalistas que são favorecidas pelo desmatamento e também vetores de doenças humanas (DONALISIO et al., 2008; UMETSU; PARDINI, 2007).

O papel de mamíferos silvestres como potenciais reservatórios tem sido discutido em relatos ocasionais de manifestações clínicas de leishmaniose em espécies silvestres de ordens distintas (DÍAZ-SÁEZ et al., 2014). Algumas espécies ainda apresentam poucos estudos no entanto, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), gambás (*Didelphis* spp. e *D. marsupialis*) e roedores (*Akodon cursor*, *Necromys lasiurus*, *Rattus rattus*, entre outros) já se apresentam como potenciais reservatórios de *Leishmania* sp. e tem sido descritos em áreas de transmissão nas Américas (ACHILLES, 2018; ROQUE; JANSEN, 2014).

Os marsupiais são os mamíferos com relatos mais frequentes de infecção por *T. cruzi* em todos os biomas (BARROS et al., 2017). Os gambás são reconhecidos como reservatórios e podem ter um papel importante no ciclo de transmissão (ROQUE et al., 2008). Sabe-se que estes animais podem se infectar com *T. cruzi* por via oral pois são onívoros e se alimentam tanto de triatomíneos quanto de outros pequenos mamíferos que podem estar infectados. (JANSEN; XAVIER,; ROQUE, 2018).

A propagação das leishmanioses e DC ocorre de áreas florestadas para áreas antropizadas e/ou periurbanas pela adaptação do vetor por meio do processo de sinantropização (GUERRA et al., 2015; REIS et al., 2013). Os animais silvestres infectados servem como reservatório e como fonte dos protozoários para os vetores, contribuindo para a manutenção e ciclo de transmissão dos patógenos aos seres humanos.

Partindo deste pressuposto, roedores e marsupiais sinantrópicos assumem um papel importante como hospedeiros, tendo em vista a facilidade de adaptação de algumas espécies aos ambientes peridomiciliares (KHLIYAP; WARSHAVSKY, 2010) e por serem considerados reservatórios de relevantes parasitas zoonóticos (HAN et al., 2015; HAN, KRAMER; DRAKE, 2016).

Ainda que o conhecimento sobre a infecção por protozoários do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* tenha crescido ao longo dos anos, por ora há escassez de informações sobre a participação efetiva das diferentes espécies de protozoários e mamíferos envolvidos na transmissão dessas doenças (PAIZ, 2018). Entre os fatores que contribuem para essas lacunas de informações sobre o tema podemos citar as dificuldades referentes ao estudo da relação parasita-hospedeiro em mamíferos silvestres e ao isolamento e identificação das espécies de parasitas nesses animais (ROQUE; JANSEN, 2014).

1.5 Biologia molecular como ferramenta de diagnóstico

Uma das metodologias aplicadas rotineiramente na biologia molecular, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), passou a ser utilizada como método alternativo no diagnóstico de doenças infecciosas, em consequência da sua alta capacidade de detectar microrganismos patogênicos com alta sensibilidade e especificidade (HOFMANN; GRIOT, CHAIGNAT et al., 2008). Desta forma, torna-se uma ferramenta de diagnóstico valiosa para a detecção e monitoramento de doenças infecciosas em animais, empregando diferentes amostras biológicas com baixas quantidade de DNA como leite, sangue, fezes, secreções e tecidos.

Outra vantagem da técnica PCR é que não é necessário encontrar patógenos viáveis nas amostras biológicas, o que facilita o diagnóstico de doenças complexas e a identificação de microrganismos patogênicos que possuem alto potencial zoonótico e com crescimento *in vitro* lento e fastigioso. Em vista disso, a técnica PCR é recomendada e prescrita pela Organização de Saúde Animal como método de diagnóstico de diversas doenças infecciosas (HAAS; TORRES, 2016).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a infecção por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos provenientes de diferentes fragmentos de vegetação e também animais resgatados de domicílios pela Vigilância Ambiental em Saúde do município de Botucatu, estado de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Conhecer a fauna de pequenos mamíferos sinantrópicos resgatados pela Vigilância Ambiental em Saúde, assim como dados referentes às informações do local de resgate e estado geral de saúde;
- Caracterizar a comunidade de pequenos mamíferos nos fragmentos de vegetação natural das Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado;
- Investigar, por meio de técnicas moleculares, a presença de DNA de *Leishmania* spp. e/ou *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Locais de estudo

3.1.1 Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado

O estudo dos animais de vida livre foi desenvolvido na Fazenda Experimental Edgárdia (FEE) (22°47'30" a 22°50'00" S/ 48°26'15" a 48°22'30") (Figura 1) e na Fazenda Experimental Lageado (FEL) (22°51'2.12" S, 48°25'54.44" W) (Figura 2), localizadas no município de Botucatu-SP e pertencentes ao Campus da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP/FCA).

A FEE faz parte da bacia do Rio Capivara e possui cinco fragmentos de vegetação natural com uma área aproximada de 1.152 ha, que engloba áreas de floresta estacional semidecidual e transições entre a floresta e cerrado (JORGE; SARTORI, 2002). Na FEE existem fragmentos de remanescentes florestais conservados e que passaram por distúrbios em intensidade e frequência distintas, como a extração de espécies de valor madeireiro, entrada de gado e a passagem de fogo (JORGE; SARTORI, 2002).

Já a FEL conta com uma área de 904 ha e possui um mosaico fitofisionômico demarcado pelo histórico de desmatamento registrado desde o século XIX e pelas periódicas atividades agronômicas desenvolvidas na área. É considerada um patrimônio histórico e cultural da UNESP, por acompanhar intensamente a expansão da cafeicultura no século passado e passou de uma Estação Experimental de Café a um espaço destinado ao ensino superior, onde hoje abriga a sede da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) (ANTONINI, 1998).

Dois fragmentos de vegetação natural foram selecionados em cada Fazenda, nomeados Edgárdia(EDG) e Lageado (LAG), com duas parcelas de amostragem em cada fragmento: Fazenda Edgárdia1 (EDG 1), Fazenda Edgárdia2 (EDG 2), Fazenda Lageado 1 (LAG 1), Fazenda Lageado 2 (LAG 2). As parcelas receberam um conjunto de armadilha de interceptação e queda e dois transectos de armadilhas do tipo Sherman e Tomahawk.

O clima da região de Botucatu é do tipo Cfa, temperado (mesotérmico). Apresenta dois períodos bem demarcados ao longo do ano, período seco e frio (abril a agosto) e quente e chuvoso (setembro a março) (DA CUNHA; MARTINS, 2009).



Figura 1. Mapa da Fazenda Experimental Edgárdia, destacando as parcelas amostradas: Fazenda Edgárdia 1 (EDG 1), Fazenda Edgárdia 2 (EDG 2).



Figura 2. Mapa da Fazenda Experimental Lageado, destacando as parcelas amostradas: Fazenda Lageado 1 (LAG 1), Fazenda Lageado 2 (LAG 2).

3.1.2 Vigilância Ambiental em Saúde (VAS)

A Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) pertence à Secretária de Saúde do município de Botucatu, São Paulo sendo o órgão responsável pela retirada de animais silvestres que, por ventura adentram domicílios na cidade.

3.2 Captura de pequenos mamíferos

Os animais de vida livre foram capturados por meio de armadilhas de interceptação e queda (AIQ) e armadilhas do tipo gaiola. Os animais de áreas peridomiciliares foram capturados pela VAS e encaminhados ao Laboratório de Genética Animal do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências, UNESP – campus de Botucatu. Todos os animais foram pesados, medidos, identificados, fotografados e tiveram material biológico coletado. Além disso, cada animal recebeu dois brincos com numerações individuais. Os espécimes cedidos pela VAS tiveram seus endereços de resgate registrados. Após a realização dos procedimentos, os animais de vida livre foram soltos no mesmo local de captura, e os animais resgatados pela VAS foram soltos em locais determinados pelo órgão. As armadilhas ficaram abertas por seis dias (cinco noites) consecutivos por campanha durante a realização do estudo, sendo vistoriadas diariamente no período em que estiveram abertas.

Quatro campanhas de campo foram realizadas, sendo estas nos meses de novembro e dezembro de 2021 e abril e maio de 2022. As amostras dos animais resgatados pela VAS foram coletadas no período de julho a novembro de 2021. Os espécimes que, por ventura, vieram a óbito encontram-se armazenados e serão destinados a coleção biológica do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS) pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP). Os protocolos envolvendo a captura e manejo dos animais foram aprovados pelo CEUA (0055/2021) e SISBIO (78287-1).

3.3 Armadilhas de interceptação e queda

As armadilhas de interceptação e queda são formadas por baldes de plásticos, enterrados no solo a uma determinada distância um do outro e ligados por uma cerca-guia (Figura 3a). Quando um animal encontra a cerca, normalmente ele caminha até defrontar-se com o recipiente enterrado, no qual acaba caindo (CECHIN; MARTINS, 2000).

Cada uma das áreas selecionadas receberam um conjunto de armadilha de queda disposto no interior de cada parcela. Cada conjunto foi composto por seis baldes de 65 litros com 10 m de distância um do outro, formando uma linha. Os baldes foram furados no fundo para evitar o acúmulo de água e placas de isopor foram colocadas no interior de cada um para

proteger os animais de possíveis afogamentos em dias chuvosos, além de um recipiente com água, para manter a umidade e resguardar os animais quanto ao dessecação.

3.4 Armadilhas do tipo gaiola

Foram utilizadas armadilhas do tipo Sherman (23 cm x 7,5 cm x 8,5 cm) e Tomahawk (34 cm x 13cm x 12cm) (Figuras 3b e 3c). Cada transecto de armadilha tem 120 m de comprimento e seis estações de armadilhas, totalizando 12 armadilhas por linha. Foram montadas duas linhas por parcela, distribuídas de maneira semelhantes aos baldes citados anteriormente. Uma Sherman e uma Tomahawk foi colocada em cada estação. Em locais com presença de árvores e/ou arbustos, uma das armadilhas foi colocada de forma alternada no alto (até 1,5 m do chão). As armadilhas receberam iscas para atrair os animais, sendo compostas por uma mistura de paçoca, banana e fubá (UMETSU; PARDINI, 2007).



Figura 3. Armadilhas utilizadas para a captura de pequenos mamíferos. (a): Armadilha de interceptação e queda; (b): Sherman e (c): Tomahawk.

3.5 Coleta de material biológico

Para coleta de amostras biológicas, todos os animais foram submetidos à contenção física manual, passando por uma breve avaliação das condições gerais de saúde com o intuito de verificar a presença de lesões cutâneas. O volume total de sangue colhido por animal variou de 100 a 200 μL . A coleta foi feita por venopunção a partir da veia caudal nos marsupiais (PAIZ, 2018) (Figura 4b) e da veia facial dos roedores por meio de gotejamento (Figura 4a). Animais que por ventura vieram a óbito tiveram fragmentos de fígado, baço, pele de orelha e pele de cauda coletados.



Figura 4. Coleta de sangue. (a): coleta por gotejamento a partir da veia facial em roedores; (b): coleta por venopunção a partir da veia caudal em marsupiais.

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA total das amostras obtidas foi realizada pela técnica de fenol/clorofórmio, segundo protocolo descrito em Sambrook e Russel (2001), com modificações (Anexo 1). Para a quantificação do DNA extraído, utilizamos o espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Termo Fisher Scientific*), por meio de absorvância a 260-280nm. A qualidade do material foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de agarose à 1,5%, corado com *Gel Red (Uniscience)* (0,1 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$), imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético – EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens sob luz ultravioleta.

3.6.2 Detecção de *Leishmania* spp.

Foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) em termociclador Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2 para a detecção da presença de fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de sangue, fragmentos de fígado, baço, pele de orelha e de cauda dos animais capturados. As reações foram realizadas com um volume final de 50µL, contendo: 20µL de 2,0x Taq DNA Polymerase Master Mix (Class Five PCR Master Mix), 0,5µL de cada primer, 1µL de DNA genômico (50ng/µL) e 28µL de água ultrapura.

Cada ensaio foi composto por 10 ng de DNA de *L. (Leishmania) amazonenses* (MHOM/BR/71973/M2269); *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV); *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) e *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) como controles positivos, além de água ultrapura como controle negativo.

Foram empregados *primers* específicos de segmentos de DNA dos genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70kD (HSP70) de *Leishmania* HSP70F (AGGTGAAGGCGACGAACG) e HSP70R (CGCTTGTCATCTTTGCGTC) (FOLGUEIRA et al., 2007) que amplificam uma sequência de aproximadamente 330 pb, seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.6.3 Detecção de *Trypanosoma cruzi*

Assim como para a detecção de *Leishmania* spp., foram realizadas PCRs com os mesmos volumes e concentrações descritos acima para detectar a presença de DNA de *T. cruzi* nas amostras de sangue, fígado e coração coletadas. Cada ensaio foi composto por 10 ng de de DNA extraído de cultivo *in vitro* da cepa CL Brener de *T. cruzi* e água ultrapura como controle negativo.

O conjunto de *primers* empregado foi o 121 (AAAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA) e 122 (GGTTCGATTGGGGTTGGGTAATATA) (VIRREIRA et al., 2003) que amplificam uma sequência de 330 pb do DNA do cinetoplasto (kDNA) do protozoário, seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.6.4 Teste de sensibilidade dos primers

A sensibilidade dos conjuntos dos *primers* utilizados para a detecção de *Leishmania brasiliensis* e *T. cruzi* foi estimada pela avaliação da amplificação do DNA extraído de ambos os protozoários. As amostras foram diluídas em série na solução de DNA (Tabela 1) (VIRREIRA et al., 2003) e foram feitas PCRs em duplicatas com os mesmos volumes, concentrações e perfis térmicos citados anteriormente.

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade dos conjuntos de *primers* na detecção dos patógenos em diferentes diluições.

Diluições	a	b	c	d	e	f	g
Quantidade de DNA por diluição (ng)	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001

3.6.5 Visualização dos produtos amplificados na PCR

A identificação dos produtos amplificados nas reações foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red® (Uniscience) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético – EDTA) corrido a 90 v por 2 horas. Os géis foram visualizados no transiluminador (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, Reino Unido) com o software UVP® VisionWorksLS™ (LifeScience Software) comparados a um padrão de peso molecular de um 1 Kb Plus.

3.7 **Análise de dados**

A identificação dos roedores foi feita empregando o Guia de Roedores do Brasil (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008) e com auxílio de pranchas de identificação para pequenos mamíferos (ROSSI, 2011) a nível de espécie e, quando não era possível, a nível de gênero. Já, os marsupiais, foram identificados a nível de espécie pelo Guia de Marsupiais do Brasil: guia de identificação com base em caracteres morfológicos e cranianos (FARIA; LANES; BONVICINO, 2019).

A estrutura da comunidade foi avaliada segundo a abundância (número de indivíduos) e riqueza (número de espécies). Também foram analisados os de índices de diversidade: Shannon (atribui maior peso as espécies raras), Simpson (pouco influenciado por espécies raras) e de equabilidade (MAGURRAN, 1988). A curva de acumulação de espécies foi utilizada para observar se houve suficiência amostral na caracterização de pequenos mamíferos na FEE e FEL.

4 RESULTADOS

4.1 Animais provenientes da Vigilância Ambiental em Saúde

Foram selecionados aleatoriamente 65 animais resgatados pela VAS no período de julho a novembro de 2021 (Tabela 1). Desses, 63 animais pertencem a ordem Didelphimorphia, sendo 62 indivíduos da espécie *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) e um indivíduo da espécie *Lutreolina crasicaudata* (cuíca-da-cauda-grossa), além de dois animais pertencentes a ordem Rodentia e da espécie *Guerlinguetus aestuans* (caxinguelê) (Figura 5).

Tabela 2. Espécies de pequenos mamíferos não-voadores cedidos pela VAS.

Ordem	Espécie	Número de animais
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	62
	<i>Lutreolina crasicaudata</i>	1
Rodentia	<i>Guerlinguetus aestuans</i>	2

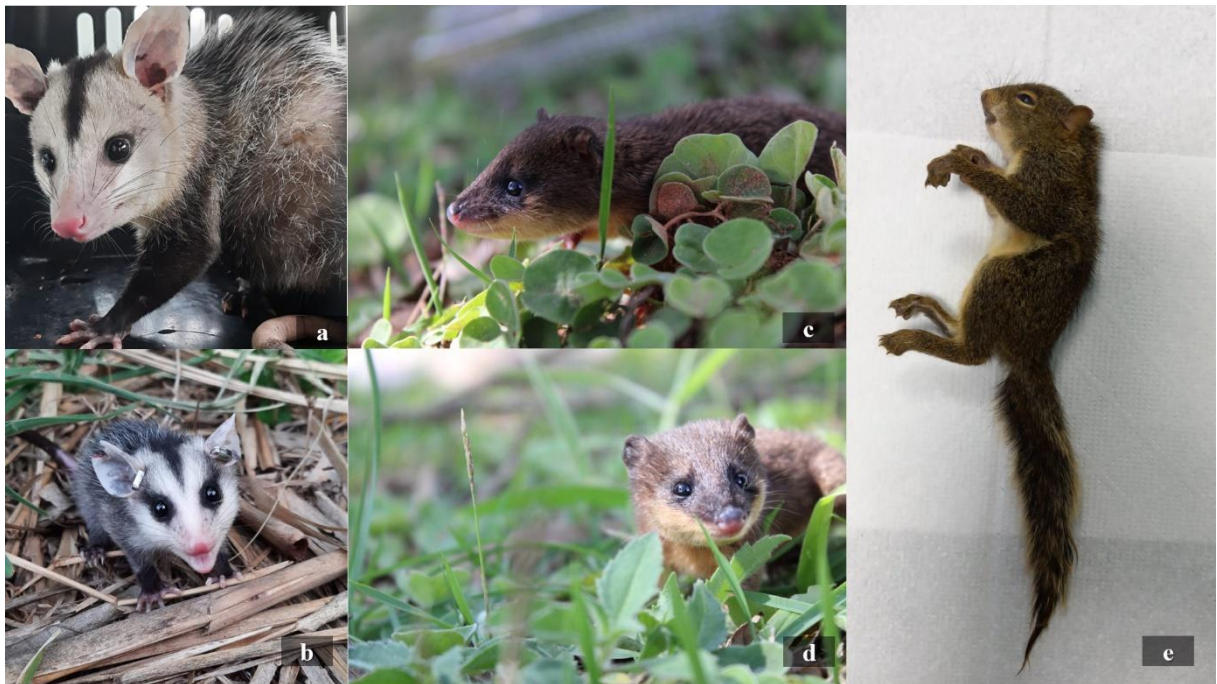


Figura 5. Animais resgatados pela Vigilância Ambiental em Saúde. (a) e (b): *Didelphis albiventris*; (c) e (d): *Lutreolina crasicaudata*; (e): *Guerlinguetus aestuans*.

Dos 62 *Didelphis albiventris* capturados, havia 23 machos e 39 fêmeas. Do total de fêmeas, 13 carregavam filhotes no marsúpio, sete eram lactantes, 12 não apresentavam características reprodutivas e sete eram filhotes. O espécime *L. crasicaudata* era um macho filhote e, dos *G. ingram*, uma fêmea e um macho, ambos filhotes.

Dos 65 animais resgatados pela VAS, 31 foram retirados de áreas urbanizadas do município de Botucatu, mesmo em locais sem a presença de fragmentos de vegetação natural (Figura 6). Os animais foram capturados em diferentes localidades apresentando maiores incidências nos bairros Vila Maria e Jardim Dona Nicota de Barros com 12 e seis animais respectivamente (Anexo 2).

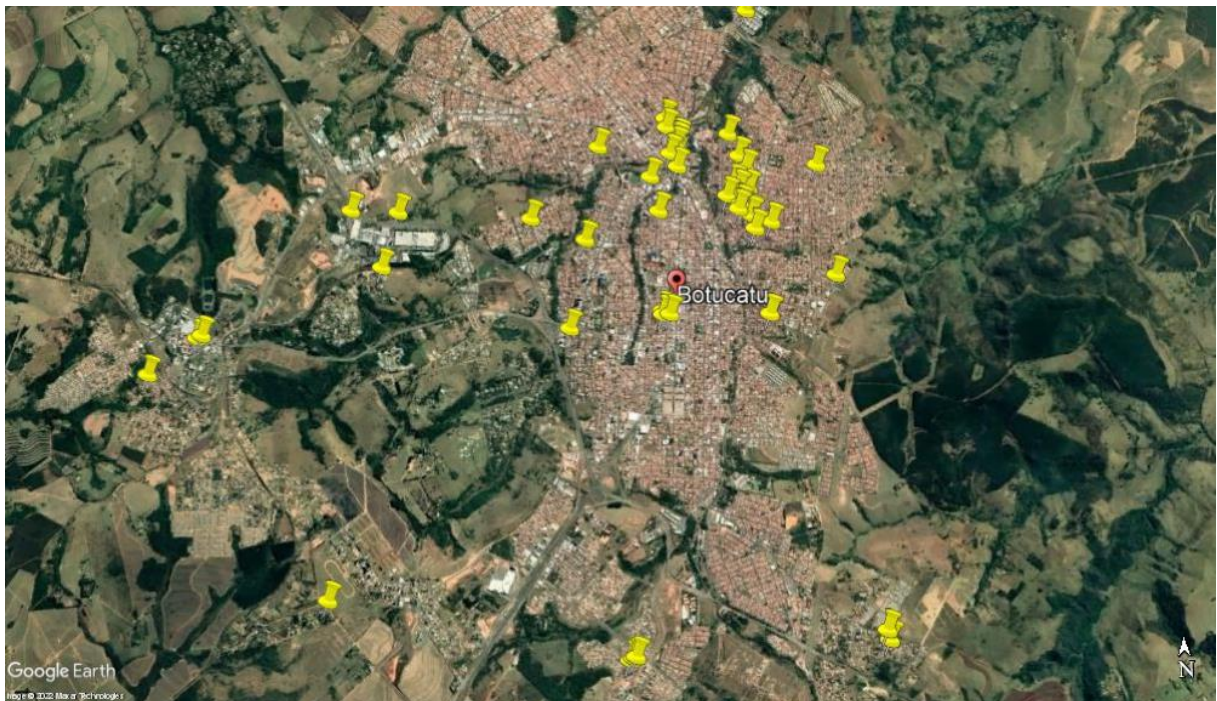


Figura 6. Local de resgate dos animais retirados pela VAS no município de Botucatu e cedidos ao presente estudo.

Das espécies amostradas, apenas a espécie *D. albiventris* apresentou lesões, totalizando 19 animais lesionados (Tabela 3). As lesões foram observadas na cauda (8), na boca (2) e no focinho (5) e, alguns animais, apresentaram mais de um tipo de ferimento, como cauda e focinho (3) e cauda, focinho e boca (1).

Tabela 3. Lesões apresentadas por indivíduos da espécie *Didelphis albiventris*.

Tipo de lesão	Número de animais lesionados
Boca	2
Cauda	8
Focinho	5
Cauda e focinho	3
Cauda, focinho e boca	1

4.2 Animais capturados em campo

Foram capturados 51 indivíduos de seis gêneros, sendo duas espécies de marsupiais pertencentes à família Didelphidae (*Didelphis albiventris* e *Gracilinanus microtarsus*) (Figura 7) e seis espécies de roedores pertencentes a família Cricetidae (*Akodon sp.*, *Juliomys ossitenius*, *Juliomys pictipes*, *Necomys lasiurus*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes*) (Figura 8).

Oligoryzomys nigripes e *Juliomys pictipes* estiveram presentes em todas as parcelas amostradas, sendo *Oligoryzomys nigripes* a espécie mais abundante. *Didelphis albiventris*, *Necomys lasiurus* e *Oecomys catherinae* estiveram presentes em ambos os fragmentos nas parcelas EDG 2 e LAG 1. Alguns animais tiveram captura restrita apenas a um fragmento amostrado entre eles, um roedor do gênero *Akodon sp.* presente nas parcelas LAG 1 e 2, além de um marsupial pertencente a espécie *Gracilinanus microtarsus* presente na parcela LAG 1 e *Juliomys ossitenius* na parcela EDG 1. (Tabela 4).

Tabela 4. Espécies de pequenos mamíferos não-voadores registrados nas Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado.

Ordem	Espécie	Fragmento amostrado				Número de animais
		EDG 1	EDG 2	LAG 1	LAG 2	
Rodentia	<i>Akodon sp.</i>	-	-	X	X	2
	<i>Juliomys ossitenius</i>	X	-	-	-	1
	<i>Juliomys pictipes</i>	X	X	X	X	7
	<i>Necomys lasiurus</i>	-	X	X	X	6
	<i>Oecomys catherinae</i>	-	X	X	-	3
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	X	X	X	X	28
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	-	X	X	-	3
	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	-	-	X	-	1

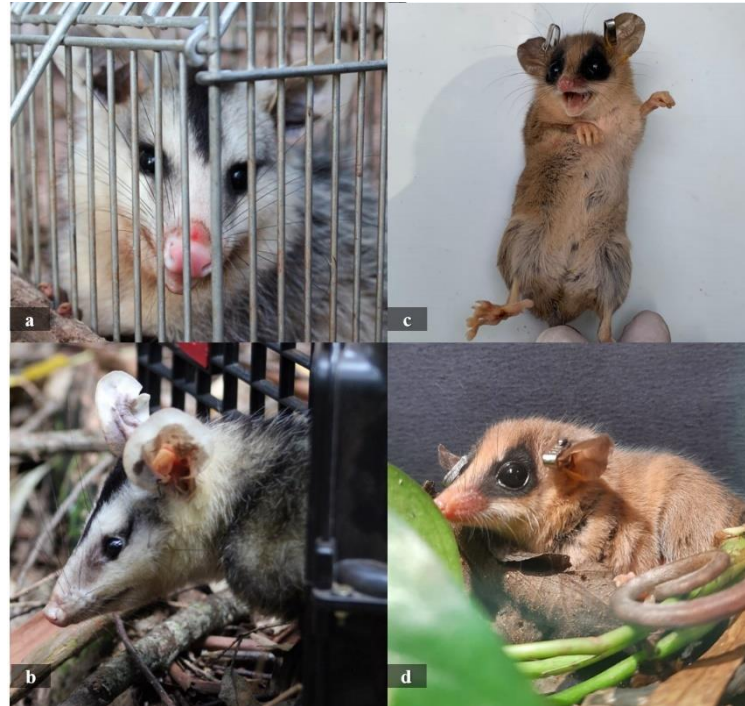


Figura 7. Marsupiais capturados nas parcelas amostradas. (a) e (b): *Didelphis albiventris*; (c) e (d): *Gracilinanus microtarsus*.



Figura 8. Roedores capturados nas parcelas amostradas. (a): *Akodon* sp. (b): *Necromys lasiurus*; (c) e (d): *Oligoryzomys nigripes*; (f): *Juliomys ossitenius*.

A abundância e riqueza de espécies foram maiores no fragmento LAG (Figura 9). Os índices de diversidade de Simpson e Shannon apontaram uma maior diversidade para a Fazenda Lageado bem como as espécies deste fragmento se distribuíram de maneira mais uniforme de acordo com índice de equabilidade (Figura 10).

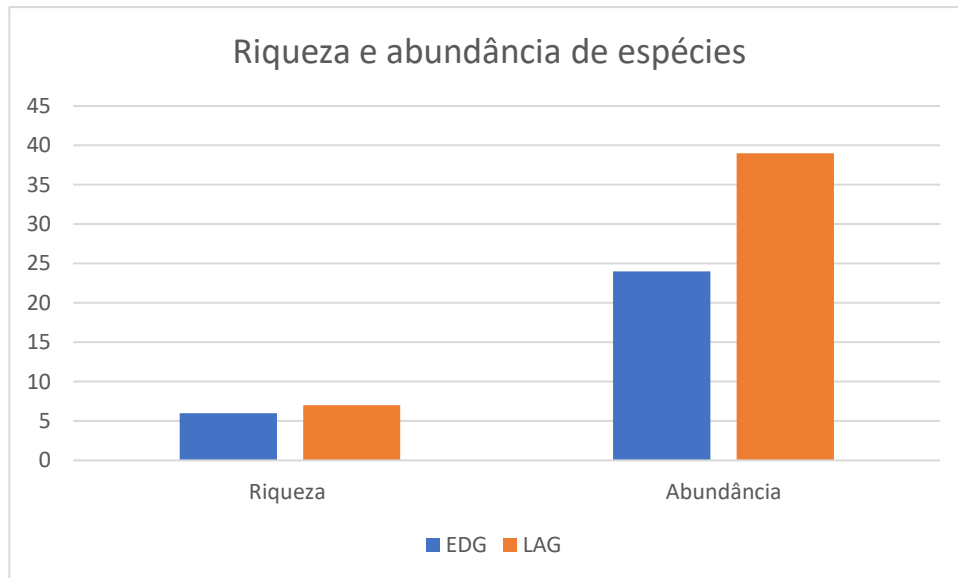


Figura 9. Riqueza e abundância de espécies das Fazendas Experimentais Edgárdia (azul) e Lageado (laranja).

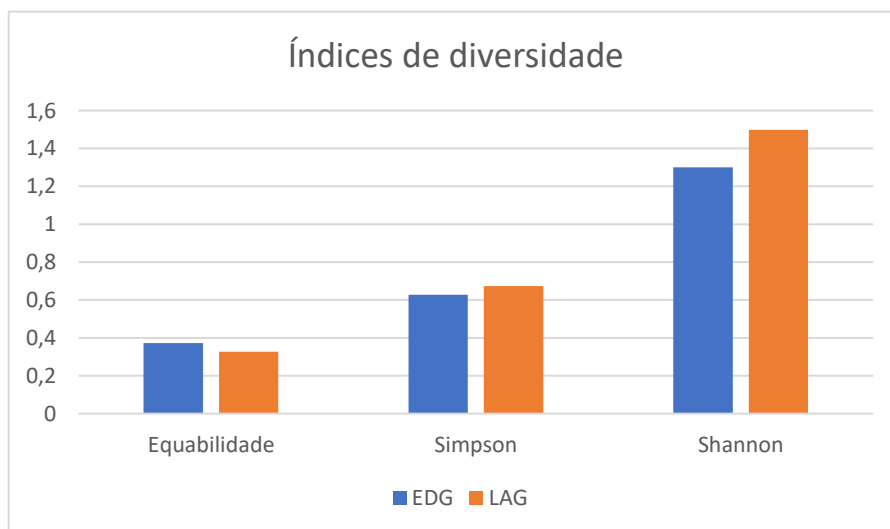


Figura 10. Índices de diversidade e equabilidade na Fazendas Experimentais Edgárdia (azul) e Lageado (laranja).

A curva de acumulação de espécies (Figura 11) demonstrou que a partir do 24º dia de amostragem o número de espécies registradas manteve uma tendência levemente ascendente, no entanto, não atingiu a assíntota.

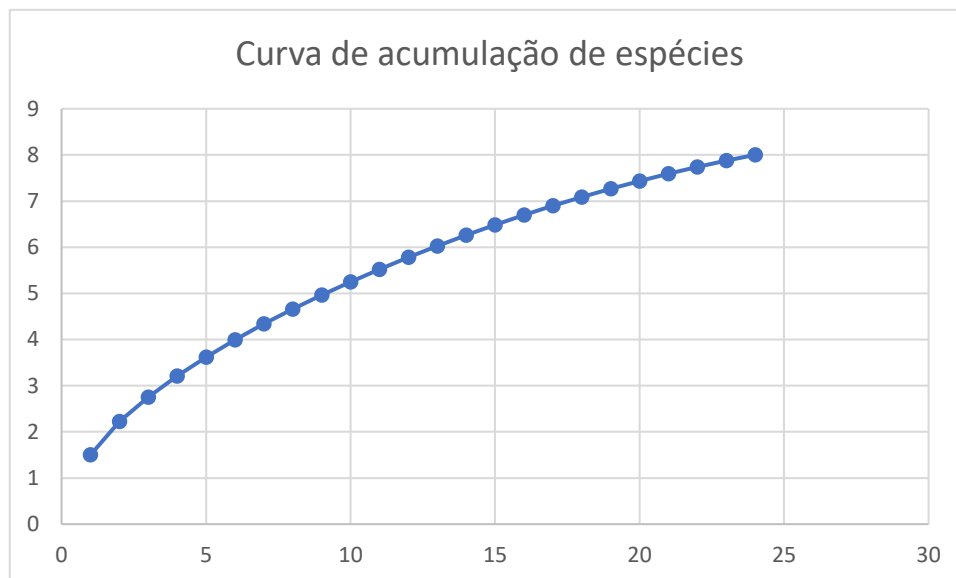


Figura 11. Curva de acumulação de espécies ou curva do coletor.

4.3 Análises moleculares

Ao todo 115, animais tiveram amostras biológicas de sangue e/ou tecidos coletadas (fragmentos de fígado, baço, pele de orelha e pele de cauda), compreendendo 207 amostras, destas, 111 eram provenientes de sangue e 96 de tecidos, sendo as últimas oriundas de tecidos de 24 animais. As amostras apresentaram concentração de DNA superiores a 10 ng/μL e relação 260/280 entre 1,6 e 2,1, indicando serem satisfatórias para as análises moleculares propostas.

Todas as amostras obtiveram diagnóstico negativo para a presença dos agentes causadores de leishmanioses (Figura 12) e doença de Chagas (Figura 13) tanto no sangue, quanto nos demais tecidos avaliados.

Em relação a sensibilidade dos *primers* e, conseqüentemente, uma validação de nossas análises para *Leishmania brasiliensis* houve amplificação do fragmento desejado até a diluição de 0,001 ng de DNA (Figura 14). Já, para *T. cruzi*, o conjunto de *primers* se mostrou ainda mais sensível, amplificando o fragmento desejado até a diluição de 0,000001 ng (Figura 15).

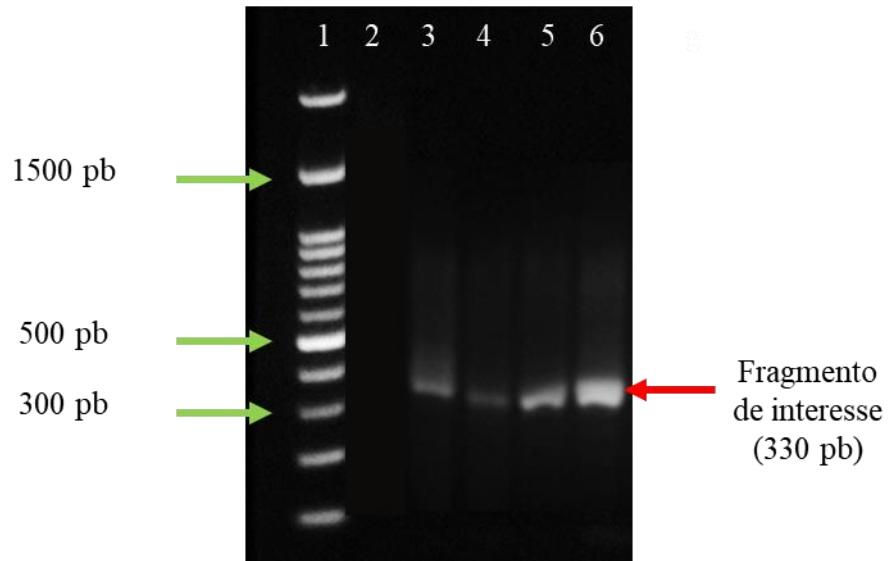


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Coluna 2: controle negativo; Coluna 3: Amostra de DNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; Coluna 4: Amostra de DNA de *L. (L.) infantum*; Coluna 5: Amostra de DNA de *L. (L.) major*; Coluna 6: Amostra de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

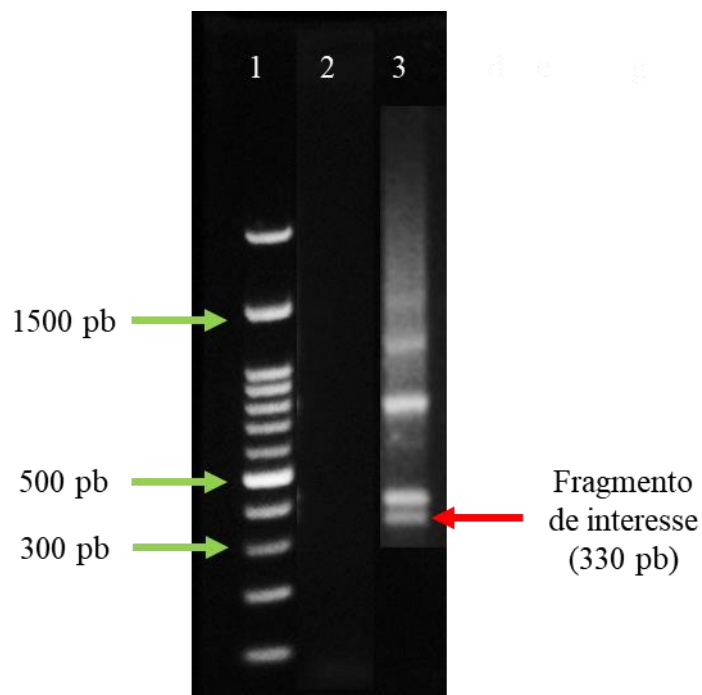


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Coluna 2: controle negativo; Coluna 3: Amostra de DNA de *T. cruzi*. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha

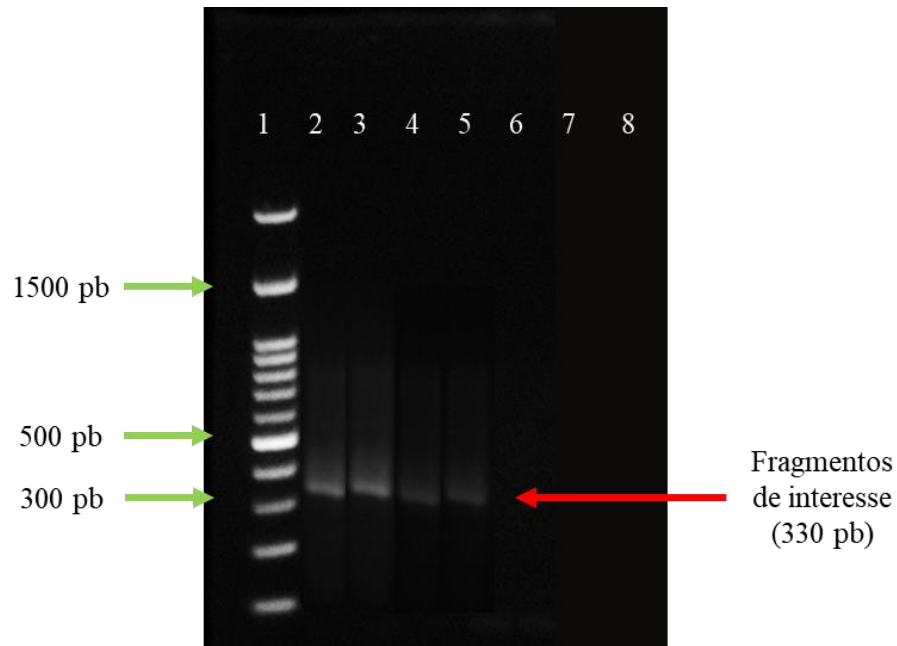


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70 em diferentes concentrações de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *L. (V.) braziliensis* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

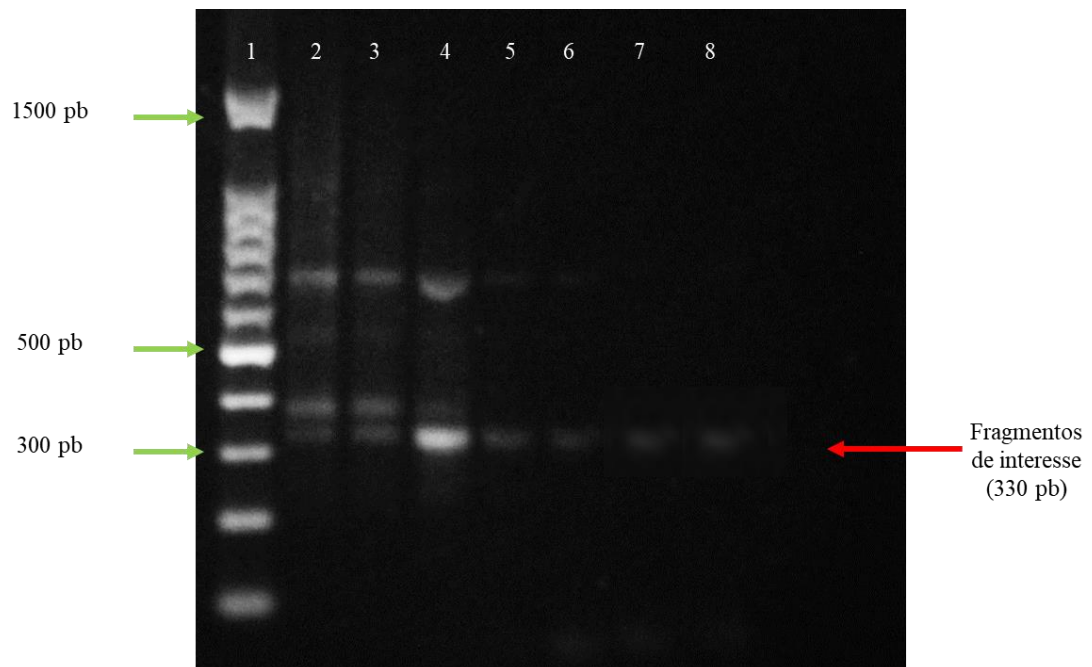


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações de DNA deste protozoário. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (marcador de peso molecular); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *T. cruzi* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

5 DISCUSSÃO

As áreas de incidência dos gambás podem ser explicadas pelo fato desses marsupiais serem considerados animais sinantrópicos sendo que a espécie *D. albiventris* é altamente adaptável às variações ambientais, estando presente nos grandes biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica e o Cerrado. Por apresentarem uma dieta ampla e variada (onívoros), isso facilita sua aproximação com animais de outras espécies e até mesmo com humanos (FERNANDES et al., 2020).

A espécie *L. crassicaudata* é pouco estudada (CARDIA et al., 2016), com escassas informações sobre zoonoses, no entanto, assim como os *D. albiventris*, esses animais têm buscado alimento e abrigo em áreas urbanas, como consequência da destruição do seu habitat, compondo a fauna de animais sinantrópicos das cidades (ROSSI et al., 2006).

As espécies capturadas em campo coincidem com as listas de espécies de roedores e marsupiais existentes para a região de Botucatu (HEIRAS, 2008; LEIVA, 2010), com exceção do gênero *Juliomys*, que foi catalogado em cidades próximas (MARTIN et al., 2012). E também corroboram com espécies encontradas em áreas de Mata Atlântica e Cerrado como as Fazendas Experimentais Lageado e Edgardia (ROSSI, 2011).

Os roedores do gênero *Akodon* (rato da mata) não foram identificados a nível de espécie devido à dificuldade de comprovação empregando apenas caracteres morfológicos externos, sendo necessário realizar análises de cariótipos e/ou moleculares para sua correta identificação (ROSSI, 2011). São encontrados em formações florestais abertas e em campos de altitude ao longo da Mata Atlântica, semelhantes ao Fragmento Lageado. É onívoro, mas com certa preferência por insetos (FINOTTI; SANTOS; CERQUEIRA, 2012), fato este que pode ser importante no ciclo de transmissão de zoonoses.

A espécie *Oligoryzomys nigripes* (rato do arroz) foi a mais abundante nesse estudo (n=28). Esses animais são comuns e amplamente distribuídos, capazes de usar florestadas e áreas abertas, além de ocuparem habitats alterados e não serem afetados pela fragmentação (ROSSI, 2011). São frugívoros-granívoros, mas podem se alimentar de insetos. (PINOTTI; NAXARA; PARDINI, 2011).

Necromys lasiurus (rato do capim) habitam regiões de Cerrado e Cerradão, porém também estão presentes em regiões de ecótono entre Cerrado e Mata Atlântica. Essa espécie é

majoritariamente associada a ambientes abertos (COSTA et al., 2019). Todavia, neste estudo, foi capturado em interior de mata com baixa densidade (n= 6). São considerados onívoros mas, foi encontrado com maior frequência em seu conteúdo estomacal material vegetal (TALAMONI et al., 2008).

Juliomys e *J. pictipes* são espécies semelhantes sendo que, a primeira habita ambientes florestados, não ocorre em áreas abertas ou ambientes modificados e são afetadas pela fragmentação de habitat além de escassas informações na literatura. A espécie *J. pictipes* é predominantemente florestal, porém encontram-se registros em áreas abertas e é mais amplamente distribuída que *J. ossitenuis*, tendo preferências por matas maduras, podendo ser um indicador de estágios de regeneração (GATTO-ALMEIDA et al., 2016; ROSSI, 2011).

A espécie *Oecomys catherinae* distribui-se ao longo da Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, no entanto os limites de ocorrência não são bem documentados (WILSON; REEDER, 2006). Esses animais se alimentam de frutos e sementes, mas não foram encontrados dados específicos sobre a dieta desta espécie (ROSSI, 2011).

Gracilinanus microtarsus (cuíca graciosa) predomina em ambientes florestados, ocorrendo ocasionalmente em áreas abertas de agricultura, sendo favorecida pela fragmentação de habitat (ROSSI, 2011). Essa espécie é considerada insetívora-onívora, com preferência para o consumo de artrópodes (MARTINS et al., 2006).

Os atributos ecológicos analisados indicaram que a comunidade de pequenos mamíferos do fragmento Lageado pode ser mais estruturada, mesmo que os fragmentos amostrados sejam próximos fisicamente, tendo em vista que a estrutura da vegetação e a complexidade de habitat afeta a composição das espécies (HANNIBAL et al., 2020), justificando assim as diferenças aqui observadas.

Apesar da curva de acumulação de espécies (Figura 11) ter demonstrado uma tendência levemente ascendente a partir do 24º dia, não atingiu a assíntota, indicando que novas amostragens devem ser realizadas por, possivelmente, existirem outras espécies nessas áreas.

Há relatos sobre a importância dos marsupiais e roedores no ciclo selvagem das leishmanioses (ACHILLES, 2018; PAIZ, 2018; DÍAZ-SÁEZ et al., 2014; ROQUE; JANSEN, 2014). No entanto, não foi encontrado DNA de *Leishmania* spp. nas amostras analisadas, mesmo em animais que apresentaram lesões de pele.

As lesões aqui encontradas não correspondem aos padrões encontrados em animais acometidos pela infecção, tendo como referência os cães, tendo em vista que a as manifestações clínicas da leishmaniose visceral em animais silvestres é pouco conhecida, sobretudo quando se trata de pequenos mamíferos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Tendo em vista que o município de Botucatu não é considerado uma área endêmica para leishmaniose visceral, que não há registros da presença do *Lutzomyia longipalpis* (SUCEN, 2018) e que os dados disponíveis na literatura sobre investigação da doença também indicam resultados negativos para cães e gatos da cidade, os nossos resultados corroboram com o cenário epidemiológico municipal.

Não foram encontrados registros referentes a leishmaniose tegumentar no município de Botucatu em humanos e/ou animais. Mas sabe-se que as espécies de roedores capturadas neste estudo já foram reconhecidos como reservatórios importantes das espécies de *Leishmania* envolvidos no ciclo da doença (AZAMI-CONESA et al., 2021).

Os marsupiais apresentam relatos frequentes de infecção por *T. cruzi* (BARROS et al., 2017). Já, gambás, incluindo a espécie *D. albiventris*, foram reconhecidos como reservatórios de *T. cruzi* e podem ter um papel importante no ciclo de transmissão (ROQUE et al., 2008). Uma cepa de *T. cruzi* foi isolada em um roedor do gênero *Guerlinguetus*, no estado de São Paulo, sendo capaz de produzir infecções graves em camundongos, com muitas formas amastigotas no coração e facilmente transmitida por triatomíneos, mostrando que os caxinguelês são hospedeiros naturais do parasita (RIBEIRO; BARRETTO, 1972).

Dos gêneros capturados em campo, os roedores *Akodon*, *Oligoryzomys*, *Necomys*, *Oecomys* e *Oligoryzomys* e os marsupiais *D. albiventris* e *G. microtarsus* já foram comprovadamente reconhecidos como reservatórios de *Trypanosoma* e *Leishmania* (BERBIGIER et al., 2021; BRANDÃO et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2018; FERREIRA et al., 2015).

Apesar de existirem dados que comprovam infecções por *T. cruzi* em marsupiais e roedores, os resultados do presente trabalho demonstraram não haver DNA deste parasita nas amostras analisadas. Além dos casos relatados anteriormente, outras pesquisas utilizando metodologia semelhante ao nosso estudo e empregando o mesmo conjunto de *primers* mostraram resultados positivos, reforçando a eficácia das técnicas moleculares como ferramenta de diagnóstico (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2022; ZAPPAROLI et al., 2022; DUMONTEIL et al., 2021).

Ainda que o resultado para *T. cruzi* tenha sido negativo nas amostras analisadas, este achado não exclui a possibilidade da existência de um ciclo domiciliar. Isto porque devemos considerar que existem pacientes positivos para DC (NUNES, 2020); presença de vetores secundários com a possibilidade de transmissão reconhecida; amostras positivas de *T. cruzi* terem sido encontradas em amostras de açaí na região (ZAPPAROLI et al., 2022), sendo estas capazes de infectar camundongos; além da presença gambás em todas as regiões do município e relatos de cachorros e gatos positivos (ELOY, 2010; LUCHEIS et al., 2005; LUCIANO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2009).

Ressaltamos ainda a confiabilidade dos resultados moleculares de diagnóstico tanto para *Leishmania* spp. como para *T. cruzi* aqui obtidos visto a sensibilidade de detecção da presença de DNA dos protozoários observados nos testes de diluição.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Por meio deste estudo foi possível descrever a comunidade de pequenos mamíferos de vida livre das Fazendas Experimentais Edgardia e Lageado e a distribuição de pequenos mamíferos sinantrópicos no município de Botucatu.
- Os resultados negativos da presença de DNA de *Leishmania* spp. nos animais capturados corroboram com os dados referentes a ausência de casos autóctones de leishmaniose visceral no município de Botucatu.
- Ainda que os resultados obtidos neste trabalho não tenham identificado a presença de *Trypanosoma cruzi* nos possíveis hospedeiros, a literatura mostra os marsupiais didelfídeos como reservatórios naturais deste parasita e a atenção para com esses animais deve se manter sempre ativa.
- Este é o primeiro estudo que investiga *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. em roedores silvestres em Botucatu, SP, contribuindo para o conhecimento atual não só nos aspectos relacionados à vigilância ambiental e ao controle de endemias no município, mas também aos aspectos ecológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONINI, I.G. **Lageado: um esboço de sua história**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 11 p., 1998.
- ACHILLES, G. R. **iversidade de pequenos mamíferos, das ordens Rodentia e Didelphimorphia, reservatórios de Tripanossomatídeos (Sarcostigophora: Kinetoplastida) em um assentamento rural na Amazônia Central**. Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus 2018.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- ARRAIS, F. M. DE A. et al. Perfil entomológico da doença de Chagas no município de Potengi – CE, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 45, n. 1, 23 abr. 2019.
- AZAMI-CONESA, I.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic leishmania. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1101, 1 maio 2021.
- BARROS, J. H. S. et al. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. **Acta Tropica**, v. 172, p. 173–179, 1 ago. 2017.
- BERBIGIER, A. P. et al. Trypanosomatid Richness in Wild and Synanthropic Small Mammals from a Biological Station in Rio de Janeiro, Brazil. **Pathogens 2021, Vol. 10, Page 1442**, v. 10, n. 11, p. 1442, 5 nov. 2021.
- BONVICINO, C.; OLIVEIRA, J.; D’ANDREA, O. Guia dos Roedores do Brasil. **Rio de Janeiro: Or**, p. 120, 2008.
- BRANDÃO, E. M. V. et al. Trypanosomatids in Small Mammals of an Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in an Anthropogenic Landscape. **Pathogens 2019, Vol. 8, Page 190**, v. 8, n. 4, p. 190, 14 out. 2019.
- BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 37, 12 mar. 2021.
- CARDIA, D. F. F. et al. First report of *Strongyloides* sp. (Nematoda, Strongyloididae) in *Lutreolina crassicaudata* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 884–887, 3 maio 2016.
- CECHIN, S. Z.; MARTINS, M. Eficiência de armadilhas de queda (pitfall traps) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 3, p. 729–740, 2000.
- COIRO, C. J. et al. Sistemática de vigilância para Leishmaniose Visceral Canina no Município de Botucatu-SP. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 2014, n. 9, p. 1689–1699, 2014.
- COLVILLE, J.; BERRYHILL, D. **Handbook of Zoonoses: Identification and Prevention**. 1ª ed. Missouri, USA,: Mosby, 2007.
- COOPER, C. et al. Host–Parasite Relationships and Life Histories of Trypanosomes in Australia. In: **Advances in Parasitology**. Crawley: Academic Press, 2017. v. 97p. 47–109.

COROMINAS, I. T. Distribution, population dynamics and habitat selection of small mammals in Mediterranean environments: the role of climate, vegetation structure, and predation risk. **Small**, v. PhD, n. 707, p. 1–178, 2004.

COSTA, M. M. R. DA et al. Doença de chagas: tendência epidemiológica por regiões do Brasil Chagas disease: epidemiological trend by regions of Brazil. **Brazilian Journal of health Review Braz. J. Hea. Rev**, v. 1, n. 1, p. 252–259, 4 nov. 2018.

COSTA, N. A. et al. Metacommunity Structure of Helminths of *Necromys lasiurus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Different Land Use Areas in the Brazilian Cerrado. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 271–282, 1 abr. 2019.

DA CUNHA, A. R.; MARTINS, D. Climatic classification for the districts of Botucatu and São Manuel, SP. **Irriga**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2009.

DE CARVALHO, M. E. et al. Chagas disease Control Program in the State of São Paulo, Brazil: Serological and entomological aspects of primary school-children surveys. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 95–106, 2011.

DE GODOY, I.; MEIRA, D. A. Seroprevalence of Chagas infection among inhabitants of municipalities in the Botucatu region, State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 516–520, 2007.

DÍAZ-SÁEZ, V. et al. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 119–127, 2014.

DONALISIO, M. R. et al. Aspectos climáticos em áreas de transmissão de hantavirose no Estado de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 24, n. 5, p. 1141–1150, 2008.

DUMONTEIL, E. et al. Shelter cats host infections with multiple *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in southern Louisiana. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 1 dez. 2021.

ELOY, L. J. **Avaliação da técnica de hemocultura pela reação em cadeia da polimerase (pcr) utilizando os iniciadores p35/p36 e tcz1/tcz2 para a detecção de *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

FARIA, M. B.; LANES, R. O.; BONVICINO, C. R. Marsupiais do Brasil: guia de identificação com base em caracteres morfológicos externos e cranianos. 2019.

FEITOSA, L. S. et al. A relevância dos dados epidemiológicos das zoonoses e sua aplicabilidade na saúde única. **Brazilian Journal of health Review Braz. J. Hea. Rev**, v. 3, n. 4, p. 10634, 27 ago. 2020.

FERNANDES, J. J. et al. *Didelphis albiventris* as a carrier of *Leptospira* sp. in the central nervous tissue in the semiarid region of Northeast, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 73, p. 101560, 1 dez. 2020.

FERNÁNDEZ, M. S. et al. Assessment of the role of small mammals in the transmission cycle of tegumentary leishmaniasis and first report of natural infection with *Leishmania braziliensis* in two sigmodontines in northeastern Argentina. **Parasitology Research**, v. 117, n. 2, p. 405–412, 1 fev. 2018.

FERREIRA, E. DE C. et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania*

- braziliensis in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 20 mar. 2015.
- FINOTTI, R.; SANTOS, M. M.; CERQUEIRA, R. Diet, digestive tract gross anatomy and morphometry of *Akodon cursor* Winge (Sigmodontinae): Relations between nutritional content, diet composition and digestive organs. **Mammalia**, v. 76, n. 1, p. 81–89, 1 fev. 2012.
- FOLGUEIRA, C. et al. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 369–377, mar. 2007.
- GALATI, E. A. B.; OVALLOS, F. G. Description of Two New Sand Fly Species Related to *Nyssomyia antunesi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p. 238–252, 1 mar. 2012.
- GATTO-ALMEIDA, F. et al. Diversidade, biogeografia, caracterização cariotípica e tricológica dos pequenos mamíferos não voadores do Parque Estadual Rio da Onça, litoral sul do Paraná. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 56, p. 69–96, 2016.
- GUERRA, J. A. O. et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of Amazonas: What have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12–19, 2015.
- GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 52–58, 1 mar. 2021.
- GUILLAUMOT, L. Arboviruses and their vectors in the Pacific—status report. **Pacific Health Surveillance and Response**, p. 45–52, 2005.
- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, 2012.
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais | R. cient. eletr. Med. Vet.;26: 1-15, jan. 2016. tab | VETINDEX. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 26, p. 1–15, 2016.
- HAN, B. A. et al. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. v. 112, n. 22, p. 7039–7044, 2015.
- HAN, B. A.; KRAMER, A. M.; DRAKE, J. M. Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 565–577, 1 jul. 2016.
- HANNIBAL, W. et al. Traits reveal how habitat-quality gradients structure small mammal communities in a fragmented tropical landscape. **Austral Ecology**, v. 45, n. 1, p. 79–88, 1 fev. 2020.
- HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.**, 1972.
- HOFMANN, M. et al. Bluetongue disease reaches Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 150, n. 2, p. 49–56, 2008.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 502, 6 set. 2018.
- JORGE, L. A. B.; SARTORI, M. S. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na fazenda experimental Edgardia, em Botucatu-SP. **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p.

585–592, out. 2002.

KHLYAP, L. A.; WARSHAVSKY, A. A. Synanthropic and agrophilic rodents as invasive alien mammals. **Russian Journal of Biological Invasions**, v. 1, n. 4, p. 301–312, 24 out. 2010.

LIMONGI, J. E.; OLIVEIRA, S. V. DE. COVID-19 e a abordagem One Health (Saúde Única): uma revisão sistemática. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. 3, p. 139–149, 27 ago. 2020.

LUCHEIS, S. B. et al. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 492–509, dez. 2005.

LUCIANO, R. M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181, 2009.

MAGURRAN, A. E. Why diversity? In: **Ecological Diversity and Its Measurement**. [s.l.] Springer Netherlands, 1988. p. 1–5.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F. et al. *Trypanosoma cruzi*, beyond the dogma of non-infection in birds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 99, p. 105239, 1 abr. 2022.

MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105948, 1 ago. 2021.

MARTINS, E. G. et al. Diet of the gracile mouse opossum (*Gracilinanus microtarsus*) (*Didelphimorphia: Didelphidae*) in a Brazilian cerrado: patterns of food consumption and intrapopulation variation. **Journal of Zoology**, v. 269, n. 1, p. 21–28, 1 maio 2006.

MAXFIELD, L.; CRANE, J. S. **Leishmaniasis**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

MCINTYRE, S. et al. Species-specific ecological niche modelling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* following climate change in South America. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 157, 24 mar. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/1/lt#:~:text=A%20Leishmaniose%20Tegumentar%20%C3%A9%20uma,\(Leishmania\)%20amazonensis%2C%20L.>](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/1/lt#:~:text=A%20Leishmaniose%20Tegumentar%20%C3%A9%20uma,(Leishmania)%20amazonensis%2C%20L.>)>. Acesso em 12 out. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/1/leishmaniose-visceral>> Acesso em 12 out. 2022.

MORETTI, A. I. P.; FERREIRA, M. C. Dinâmica espacial e regionalização da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo. **Geografia**, v. 36, n. 3, p. 453–468, 2011.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percursos – NEMO**, p. 147–168, 2014.

NICOLA, P. A. Comunidades De Pequenos Mamíferos Como Indicadores De Qualidade Ambiental No Planalto Norte Catarinense. p. 145, 2009.

NUNES, É. A. P. **Epidemiologia espacial da Doença de Chagas no Estado de São Paulo e Fatores associados ao Desenvolvimento das formas cardíacas e digestivas em uma coorte de pacientes admitidos com a forma crônica indeterminada.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2020.

PAIZ, L. M. et al. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 11, p. 667–673, 13 nov. 2015.

PAIZ, L. M. **Infecção por agentes das leishmanioses, doença de Chagas e febre maculosa brasileira em mamíferos silvestres de vida livre em área de proteção ambiental do município de Campinas.** Tese (Doutorado Saúde Coletiva) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

PARDINI, R. et al. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**, v. 124, n. 2, p. 253–266, 2005.

PAULA, E. M. N. DE et al. Análise espacial e temporal da leishmaniose visceral no Estado de São Paulo em 1970 a 2014: aumento das áreas de risco ao longo do tempo. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e685974494, 30 maio 2020.

PINOTTI, B. T.; NAXARA, L.; PARDINI, R. Studies on Neotropical Fauna and Environment Diet and food selection by small mammals in an old-growth Atlantic forest of south-eastern Brazil Diet and food selection by small mammals in an old-growth Atlantic forest of south-eastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 46, n. 1, p. 1–9, 2011.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 648–652, 1 maio 2001.

QUARESMA, P. F. **Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores.** Belo Horizonte : Fundação Oswaldo Cruz , 2011. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2011.

REIS, S. R. et al. Occurrence of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the peridomestic environment in an area of transmission focus for cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazon. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 121–124, 2013.

RIBEIRO, R. D.; BARRETTO, M. P. Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LH-Natural infections of *Sciurus (Guerlingueutus) aestuans ingrami* by *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** , v. 14, n. 6, p. 352–359, 1972.

RIMOLDI, A. R. et al. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 183–189, 2016.

RODRÍGUEZ, E. M.; DÍAZ, F.; PÉREZ, M. V. Spatio-temporal clustering of American Cutaneous Leishmaniasis in a rural municipality of Venezuela. **Epidemics**, v. 5, n. 1, p. 11–19, mar. 2013.

ROQUE, A. L. R. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic

mammals in three areas of orally transmitted chagas disease outbreaks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 742–749, 1 nov. 2008.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 1 dez. 2014.

ROSSI, N. F. **Pequenos mamíferos não-voadores do Planalto Atlântico de São Paulo: Identificação, história natural e ameaças**. [Dissertação (Mestrado em Ciências - Área zoológica), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTO, A. H. Tendência da mortalidade relacionada à doença de chagas, estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2006: Estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 26, n. 4, p. 299–309, out. 2009.

SANTOS, E. F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, 1 ago. 2020.

SIMÕES, T. et al. Chagas disease mortality in Brazil: A Bayesian analysis of age-period-cohort effects and forecasts for two decades. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006798, 1 set. 2018.

SOLANO-GALLEGO, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, 4(86):1-16.

SUCEN. **Presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo** . Disponível em: <<https://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/homepage/downloads/arquivos-leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

TALAMONI, S. et al. Diet of some species of Neotropical small mammals. **Mamm Biol**, v. 73, p. 337–341, set. 2008.

TEODORO, A. K. M. et al. Gastrointestinal, skin and blood parasites in *Didelphis* spp. from urban and sylvatic areas in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, p. 100286, 1 abr. 2019.

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 118–123, 14 out. 2009.

UMETSU, F.; PARDINI, R. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats — evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecology**, p. 517–530, 2007.

VALENTE, D.; FERREIRA, M. C. Análise geoespacial da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo : uma contribuição à geografia da saúde . (Geospatial analysis of American cutaneous leishmaniasis in ... **Estudos Geográficos: Revista Eletrônica de Geografia**, n. October, p. 0–17, nov. 2020.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Society of Tropical**

Medicine and Hygiene574, v. 68, n. 5, p. 574–572, maio 2003.

WEKSLER, A. et al. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae : Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae : Sigmodontinae). **American Museum of Natural History**, v. 2006, n. May, p. 1–29, 2020.

WHO. **WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.** 2002.

WHO, W. H. O. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**WHO technical report series. Geneve , 22 mar. 2010.

WHO, W. H. O. **Leishmanioses.** Disponível em <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 21 de out. 2022.

WHO, W. O. H. **Doença de Chagas (tripanosomíase americana).** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>. Acesso em: 5 mar. 2022.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference - Google Livros.** 3. ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland,: [s.n.].

ZAPPAROLI, D. et al. Commercially acquired açaí pulps contamination by Trypanosoma cruzi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, p. 109508, 16 fev. 2022.

CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTIFICO

Trabalho a ser enviado para a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Normas disponíveis em <http://rbpv.org.br/guia-do-autor>

Investigation of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in small wild mammals in
Botucatu, Brasil

Investigação de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos silvestres
em Botucatu, Brazil

Tripanossomatídeos in small mammals in Botucatu, Brazil

Larissa Pereira Rodrigues

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo
State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Pedro Paulo de Oliveira Nogueira

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo
State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Renata Cristina Batista Fonseca

Departament of Forest Science, Soils and Environment, Faculty of Agronomic Sciences, São
Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State
University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

The *Trypanosoma* and *Leishmania* genera are protozoa of the *Trypanosoma* tidae family and cause several diseases. The role of wild mammals as potential reservoirs has been discussed. Wild species of different orders such as rodents and marsupials have already presented themselves as potential reservoirs of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. The aim of the presente study was to investigate small mammals as a reservoir of *Leishmania* spp. and *T. cruzi*. The study was carried out in Botucatu, São Paulo, and animals were captured in fragments of natural vegetation at the Edgárdia and Lageado Experimental Farms, as well as synanthropic animals provided by the Environmental Health Surveillance (VAS) of Botucatu, were evaluated. Altogether 115 individuals of 10 species of the Didelmorpha and Rodentia orders were captured and had blood and/or liver samples collected. From the collected material, DNA extraction and Polymerase Chain Reactions were performed using specific *primers*. All analyzed samples obtained negative results for the presence of DNA in the evaluated protozoa. Although the results obtained in this work did not identify the presence of these pathogens in the analyzed samples, small mammals were reported as reservoirs of these parasites and attention to these animals must always remain active.

Keywords: zoonoses, reservoir, small mammals, Leishmaniasis, Chagas disease.

RESUMO

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são protozoários da família *Trypanosoma* tidae e causam diversas doenças. O papel dos mamíferos silvestres como potenciais reservatórios tem sido discutido. Espécies silvestres de ordens distintas como roedores e marsupiais já se apresentaram como potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. A presente pesquisa teve por objetivo investigar pequenos mamíferos como reservatório de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. O estudo foi desenvolvido em Botucatu, São Paulo e foram avaliados animais capturados em fragmentos de vegetação natural nas Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado além de animais sinantrópicos cedidos pela Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) de Botucatu. Ao todo 115 indivíduos de 10 espécies das ordens Didelmorpha e Rodentia foram capturados e tiveram amostras de sangue e/ou fígado coletadas. A partir do material coletado foi realizada a extração de DNA e Reações em Cadeia da Polimerase utilizando *primers* específicos. Todas as amostras analisadas obtiveram resultados negativos para a presença de DNA dos protozoários avaliados. Ainda que os resultados obtidos neste trabalho não tenham identificado a presença destes patógenos nas amostras analisadas, os

pequenos mamíferos foram relatados como reservatórios destes parasitas e a atenção para com esses animais deve se manter sempre ativa.

Palavras chave: zoonoses, reservatório, pequenos mamíferos, leishmaniose, doença de Chagas.

INTRODUCTION

Ecological problems that cause consequences for the fauna and the growing importance of urbanization, promoting greater contact with synanthropic animals, with emergence or reemergence due to etiological differences (FEITOOSA et al., 202). Zoonoses are diseases that affect vertebrate animals, including humans (COLVILLE; BERRYHILL, 2007) with global occurrence and unique global health impacts.

The Trypanosomatidae family is a group that brings together species of protozoa of different genera of medical, veterinary and agricultural interest. These microorganisms are capable of infecting a large number of vertebrates and invertebrates (PODLIEV, 20). The genera *Trypanosoma* and *Leishmania* are the best known of this family and cause several diseases (HOARE, 1972) in which the mechanisms of parasite-environment interaction are complex and lack studies (COOPER et al., 2017).

Leishmania sis are zoonoses caused by protozoa of the genus *Leishmania* which are transmitted to wild and domestic mammals and to humans through the bite of female dipterans called sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) (GALATI; OVALLOS; 2012; MCINTYRE et al., 2017)), and is part of the group of neglected tropical diseases (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). These diseases present an epidemiological and clinical heterogeneity, attributed to the diversity of species of parasites, vectors and vertebrate hosts involved (QUARESMA, 2011).

Chagas disease is a neglected tropical disease, as well as *Leishmania* sis, being caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). It is considered a public health problem with socioeconomic implications in Latin American countries due to early mortality and high medical and social security costs (SIMÕES et al., 2018; WHO, 2002). Transmission can occur in several ways, especially vectorial, due to contact with contaminated feces of “barbers” (order Diptera, subfamily Triatominae) (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; MINISTRY OF HEALTH, 2020). In addition, it can be transmitted orally, by ingestion of contaminated food or transfusion of infected blood.

The role of wild mammals as potential reservoirs has been discussed where there are occasional reports of clinical manifestations of *Leishmania* spp. in wild species of different orders (DÍAZ-SÁEZ et al., 2014). Some species still have few studies, however the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), skunks (*Didelphis* spp. and *D. marsupialis*) and rodents (*Akodon cursor*, *Necromys lasiurus*, *Rattus rattus*, among others) are already potential reservoirs of *Leishmania* spp. and has been described in transmission areas in the Americas (ACHILLES, 2018; ROQUE; JANSEN, 2014).

Marsupials are the mammals with the most frequent reports of *T. cruzi* infection in all biomes (BARROS et al., 2017). Opossums are recognized as reservoirs and may play an important role in the transmission cycle (ROQUE et al., 2008). It is known that these animals can be infected with *T. cruzi* orally because they are omnivorous and feed on both triatomines and other small mammals that may be infected. (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

The spread of *Leishmania* spp. and Chagas disease occurs from forested areas to anthropized and/or peri-urban areas by adapting the vector through the process of synanthropization (GUERRA et al., 2015; REIS et al., 2013). Infected wild animals serve as a reservoir and as a source of protozoa for vectors, contributing to the maintenance and transmission cycle of pathogens to humans.

Although knowledge about infection by protozoa of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* has grown over the years, for now there is a lack of information on the effective participation of different species of protozoa and mammals involved in disease transmission (PAIZ, 2018). Among the factors that contribute to this lack of information on the subject, we can mention the difficulties related to the study of the parasite-host relationship in wild mammals and the isolation and identification of parasite species in these animals (ROQUE; JANSEN, 2014).

The aim of the present study was to investigate infection by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in small mammals from different vegetation fragments and also animals removed from households by the Environmental Health Surveillance in the city of Botucatu, state of São Paulo.

MATERIAL AND METHODS

The study of free-living animals was carried out at the Edgárdia Experimental Farm (FEE) (22°47'30" to 22°50'00"S/ 48°26'15" to 48°22'30") and at the Experimental Farm Lageado (FEL) (22°51'2.12"S, 48°25'54.44"W) located in the city of Botucatu-SP and belonging to the Campus of the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP/FCA). Two fragments of natural vegetation were selected in each farm, named Edgárdia (EDG) and Lageado (LAG).

Free-living animals were captured using pitfall traps (CECHIN; MARTINS, 2000) and cage-type traps containing food attractant made from a mixture of cornmeal, banana and paçoca (UMETSU; PARDINI, 2007). Animals from peridomiciliary areas were captured by the Environmental Health Surveillance of the city of Botucatu and sent to the Animal Genetics Laboratory of the Chemical and Biological Sciences Department of the Biosciences Institute, UNESP – Botucatu campus.

Four field campaigns were carried out in November and December 2021 and April and May 2022. Samples of animals rescued by VAS were collected from July to November 2021. Protocols involving the capture and handling of animals were approved by CEUA (0055/2021) and SISBIO (78287-1). All animals were weighed, measured, identified, photographed and had biological material collected. In addition, each animal received two earrings with individual numbers.

To collect biological samples, all specimens were submitted to manual physical restraint, undergoing a brief assessment of general health conditions. The total volume of blood collected per animal ranged from 100 to 200 μ L. The collection was performed by venipuncture from the caudal vein in marsupials (PAIZ, 2018) and from the facial vein of rodents by drip. Animals that eventually died had liver fragments collected.

Total DNA extraction from the obtained samples was performed using the phenol/chloroform technique, according to the protocol described in Sambrook and Russell (2001), with modifications and quantified using the spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Fisher Scientific Term) by means of absorbance at 260-280nm. The quality of the material was evaluated by the technique of electrophoresis in 1.5% agarose gel, stained with Gel Red (Uniscience) (0.1 μ L/10mL), immersed in 1X TAE buffer (Tris-Acetic Acid – EDTA) and visualized in an image scanner, under ultraviolet light. 52

Polymerase Chain Reactions (PCRs) were performed in an Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2 thermocycler to detect the presence of *Leishmania* spp. in samples from captured animals. The reactions were performed with a final volume of 50µl, containing: 20µl of 2.0x Taq DNA Polymerase Master Mix (Class Five PCR Master Mix), 0.5µl of each *primer*, 1µl of genomic DNA (50ng/µl) and 28µl of ultrapure water as a negative control.

Each assay consisted of 10 ng of DNA from *L. (L.) amazonenses* (MHOM/BR/71973/M2269); *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV); *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) and *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) as positive controls, in addition to ultrapure water. Specific *primers* from DNA segments of the genes encoding 70kD heat shock proteins from *Leishmania* HSP70F (AGGTGAAGGCGACGAACG-3) and HSP70R (CGCTTGTCATCTTTGCGTC) (FOLGUEIRA et al., 2007) were used, following the following thermal profile: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 1 minute, 59°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and final extension at 72°C for 10 minutes.

As for the detection of *Leishmania* spp., PCRs were performed with the same volumes and concentrations described above to detect the presence of *T. cruzi* DNA in the collected samples. Each assay consisted of 10 ng of DNA extracted from in vitro culture of the CL Brener strain of *T. cruzi* and ultrapure water as a negative control. The *primer* set used was 121 (AAAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA) and 122 (GGTTCGATTGGGGTTGGGTAATATA) (VIRREIRA et al., 2003), which amplify a 330 bp sequence of the protozoan kinetoplast DNA, following the following thermal profile: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 33 cycles at 94°C for 1 minute, 59°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and final extension at 72°C for 10 minutes.

The identification of products amplified in the reactions was performed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with Gel Red® (Uniscience) immersed in 1X TAE buffer (Tris-Acetic Acid - EDTA) run at 90v for 2 hours. Gels were visualized on the transilluminator (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, UK) with UVP® VisionWorksLS™ software (LifeScience Software) and compared to a molecular weight standard (ladder1Kb Plus). The size of the fragments averaged 330 base pairs for both protozoa.

The sensitivity of the *primer* sets used for the detection of *Leishmania braziliensis* and *T. cruzi* was estimated by evaluating the amplification of DNA extracted from both protozoa. The samples were serially diluted in the DNA solution (1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001;

0.00001 ng) (VIRREIRA et al., 2003) and PCRs were performed in duplicates with the same volumes, concentrations and thermal profiles mentioned above.

The identification of rodents was carried out using the Brazilian Rodent Guide (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008) and with the aid of identification boards for small mammals (ROSSI, 2011) at the species level and, when it was not possible, at the gender level. Marsupials, on the other hand, were identified at species level by the Guia de Marsupiais do Brasil: identification guide based on morphological and cranial characters (FARIA; LANES; BONVICINO; 2019).

RESULTS AND DISCUSSION

Sixty-five animals rescued by the VAS from July to November 2021 were randomly selected. Of these, 63 animals belong to the order Didelphimorphia, being 62 individuals of the species *Didelphis albiventris* (white-eared possum) and one individual of the species *Lutreolina crasicaudata* (Thick-tailed cuíca), in addition to two animals belonging to the order Rodentia and the species *Guerlinguetus aestuans* (caxinguelê).

At the end of the four field campaigns, 51 individuals of six genera were captured, being two species of marsupials belonging to the family Didelphidae (*Didelphis albiventris* and *Gracilinanus microtarsus*) and six species of rodents belonging to the family Cricetidae (*Akodon* sp., *Juliomys ossitenius*, *Juliomys pictipes*, *Necromys lasiurus*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes*).

A total of 115 animals had biological samples of blood and/or tissues collected (fragments of liver, spleen, ear skin and tail skin), comprising 207 samples, of which 111 were from blood and 96 from tissues, the last being from tissues of 24 animals. The samples showed DNA concentration above 10 ng/ μ L and a 260/280 ratio between 1.6 and 2.1, indicating that they are satisfactory for the proposed molecular analyses.

All samples obtained a negative diagnosis for the presence of the causative agents of *Leishmania* sis (Figure 1a) and Chagas disease (1b) both in the blood and in the other tissues evaluated.

Regarding the sensitivity of the *primers* and, consequently, a validation of our analyzes for *Leishmania brasiliensis*, there was amplification of the desired fragment up to a dilution of 0.001 ng of DNA (Figure 2a). For *T. cruzi*, the set of *primers* was even more sensitive, amplifying the desired fragment up to a dilution of 0.000001 ng (Figure 2b).

There are reports on the importance of marsupials and rodents in the wild cycle of *Leishmania* spp. (ACHILLES, 2018; PAIZ, 2018; DÍAZ-SÁEZ et al., 2014; ROQUE; JANSEN, 2014). However, no DNA from *Leishmania* spp. in the analyzed samples. Considering that the municipality of Botucatu is not considered an endemic area, that there are no records of the presence of *Lutzomyia longipalpis* (SUCEN, 2018) and that the data available in the literature on investigation of the disease also indicate negative results for dogs and cats in the city, our results corroborate the municipal epidemiological scenario.

Although there are data that prove infections by *T. cruzi* in marsupials and rodents, the results of the present work showed that there was no DNA of this parasite in the analyzed samples. In addition to the cases reported previously, other studies using a methodology similar to our study and using the same set of *primers* and containing positive results, reinforcing the effectiveness of molecular techniques as a diagnostic tool (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2022; ZAPPAROLI et al., 2022; DUMONTEIL et al., 2021).

Although the result for *T. cruzi* was negative in the analyzed samples, this finding does not exclude the possibility of the existence of a household cycle. This is because we must consider that there are positive patients for Chagas disease (NUNES, 2020); presence of secondary vectors with the possibility of transmission recognized; positive samples of *T. cruzi* have been found in açai samples in the region (ZAPPAROLI et al., 2022), which are capable of infecting mice; in addition to the presence of skunks in all regions of the municipality and reports of positive dogs and cats (ELOY, 2010; LUCHEIS et al., 2005; LUCIANO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2009).

This is the first study to investigate *Leishmania* spp. and *T. cruzi*. in wild rodents in Botucatu, SP, contributing to current knowledge not only in aspects related to environmental surveillance and control of endemic diseases in the city, but also in ecological aspects.

We also emphasize the reliability of molecular diagnostic results for both *Leishmania* spp. as for *T. cruzi* obtained here given the sensitivity of detection of the presence of DNA of the protozoa observed in the dilution tests.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

ACHILLES, G. R. **Diversity of young children, of the orders Rodentia and Didelphimorphia, reservoirs of *Trypanosoma* tids (Sarcomastigophora: Kinetoplastida) in a rural settlement in Central Amazon.** Dissertation (Master in Living Conditions and Health Situations in the Amazon) - Instituto Leônidas and Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus 2018.

BARROS, J.H.S. et al. Identification of new mammalian hosts and geographic distribution in the Brazilian biome of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. **Acta Tropica**, v. 172, p. 173-179, 1 ago. 2017.

BONVICINO, C.; OLIVEIRA, J.; D'ANDREA, O. Guide to Rodents of Brazil. **Rio de Janeiro: Or**, p. 120, 2008.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M.M.; CHANDA, K. An Overview of the Therapy of Neglected Infectious Diseases—*Leishmania* sis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 37, 12 Mar. 2021.

CECHIN, S.Z.; MARTINS, M. Efficiency of pitfall traps in amphibian and reptile samples in Brazil. **Brazilian Journal of Zoology**, v. 17, no. 3, p. 729-740, 2000.

COLVILLE, J.; BERRYHILL, D. **Handbook of Zoonoses: Identification and Prevention.** 1st ed. Missouri, USA, Mosby, 2007.

COOPER, C. et al. Host-parasite relationships and life histories of trypanosomes in Australia. In: **Advances in Parasitology**. Crawley: Academic Press, 2017. v. 97p. 47-109.

DÍAZ-SÁEZ, V. et al. High infection rates by *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) under sympatric and syntrophic conditions in an endemic area of canine *Leishmania* sis: epidemiological consequences. **Veterinary Parasitology**, vol. 202, no. 3-4, p. 119-127, 2014.

EL J. **Evaluation of the culture technique by reaction and on the polymerase chain (pcr) using primers p35/p36 and tcz1/tcz2 for the heme detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs.** Dissertation (Master in Tropical Diseases), Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

FARIA, M.B.; LANES, R.O.; BONVICINO, C. R. Marsupiais do Brasil: identification guide based on external and cranial morphological characters. 2019 56

- FEITOSA, L.S. et al. Applicability of epidemiological data on zoonoses and their unique health. **Brazilian Journal of Health Review Braz. J. Hea. Rev**, v. 3, no. 4, p. 10634, 27 ago. 2020
- FOLGUEIRA, C. et al. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology**, vol. 134, no. 3, p. 369-377, Mar. 2007.
- GALATI, E.A.B.; OVALLOS, F. G. Description of two new sand fly species related to *Nyssomyia antunesi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, no. 2, p. 238–252, 1 Mar. 2012
- GUERRA, J. A. O. et al. Cutaneous *Leishmania* sis in the State of Amazonas: What have we learned and what do we need? **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 48, p. 12-19, 2015.
- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, 2012.
- HOARE, C. A. Mammalian trypanosomes. **A zoological monograph**, 1972.
- JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.D.C.; ROQUE, A. L. R. Transmission of *Trypanosoma cruzi* in nature and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, no. 1, p. 502, 6 sets. 2018
- LUCHEIS, S.B. et al. *Trypanosoma* tids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease residing in the city of Botucatu and region, State of São Paulo, **Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, no. 4, p. 492-509, Dec. 2005.
- LUCIANO, R.M. et al. Evaluation of cross-reactivity between immunofluorescence of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* in the serological response of dogs by the indirect immunofluorescence technique (IFAT). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, no. 3, p. 181, 2009.
- MCINTYRE, S. et al. Species-specific ecological niche modeling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* after climate change in South America. **Parasites and Vectors**, v. 10, no. 1, p. 157, 24 March. 2017.
- MINISTRY OF HEALTH. **Chagas disease**. Available at: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>>. Accessed on: 27 Mar. 2021. 57

NUNES, E. A. P. **Spatial epidemiology of Chagas disease in the State of São Paulo and factors associated with the development of cardiac and digestive forms in a group of patients admitted with an undetermined chronic form.** Botucatu: State University of São Paulo Júio de Mesquita Filho, 2020.

PAIZ, L.M. et al. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, no. 11, p. 667–673, 13 Nov. 2015.

PODLIPAEV, S. The more insect *Trypanosoma* tids under study-the more diverse *Trypanosoma* tidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, no. 5–6, p. 648–652, 1 May 2001.

QUARESMA, P. F. **Study of Cutaneous *Leishmania* sis in the Xakriabá Indigenous Land: the parasite, hosts and vectors.** Thesis (Doctorate in Health Sciences), Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, 2011.

REIS, S.R. et al. Occurrence of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the peridomestic environment in an area of transmission focus for cutaneous *Leishmania* sis in Manaus, Amazon. **Acta Amazonica**, v. 43, no. 1, p. 121–124, 2013.

ROQUE, A.L.R. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, no. 5, p. 742–749, 1 Nov. 2008

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, no. 3, p. 251–262, 1 Dec. 2014.

ROSSI, N. F. **Non-flying small mammals from the São Paulo Atlantic Plateau: Identification, natural history and threats.** Dissertation (Master of Science - Zoology Area), Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, 2011 58

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SIMÕES, T. et al. Chagas disease mortality in Brazil: A Bayesian analysis of age-period-cohort effects and forecasts for two decades. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, no. 9, p. e0006798, 1 set. 2018.

SUCEN. **Presence of the vector *Lutzomyia longipalpis* in the State of São Paulo**. Available at: <https://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/homepage/downloads/arquivos-leishmaniose-visceral>. Accessed on: 23 Mar. 2021.

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, no. 2–4, p. 118–123, 14 Oct. 2009

UMETSU, F.; PARDINI, R. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats — evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecology**, p. 517–530, 2007.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, no. 5, p. 574–572, May 2003.

WHO, W. H. **The Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee**. 2002.

WHO, W. H. O. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis** WHO technical report series. Geneve , 22 mar. 2010.

ZAPPAROLI, D. et al. Commercially acquired açai pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, p. 109508, 16 Feb. 2022.

Figura 1

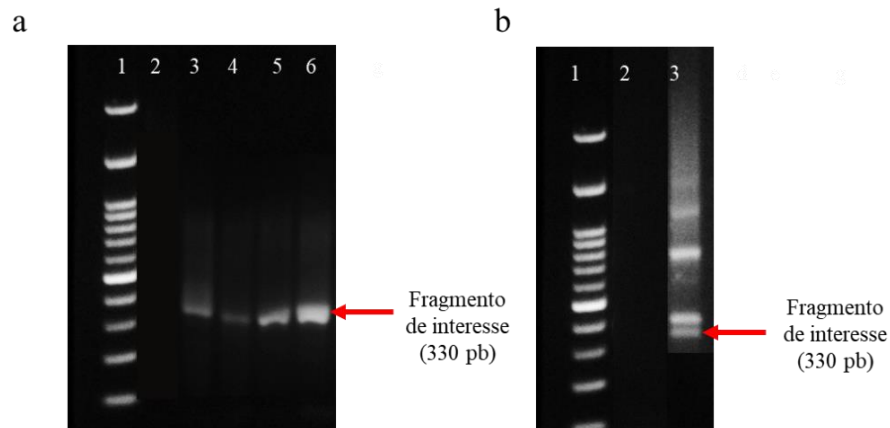


Figure 1. (a) 1.5% PCR agarose gel electrophoresis for a fragment of the HSP70 gene. Column 1: Ladder 1Kb Plus (molecular weight marker); Column 2: negative control; Column 3: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* DNA sample.; Column 4: DNA sample from *L. (L.) infantum*; Column 5: DNA sample from *L. (L.) major*; Column 6: *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA sample. The red arrow indicates the size of the amplicons (330 bp).

(b). 1.5% PCR agarose gel electrophoresis for a *Trypanosoma cruzi* kDNA fragment. Column 1: Ladder 1Kb Plus (molecular weight marker); Column 2: negative control; Column 3: *T. cruzi* DNA sample. The red arrow indicates the size of the amplicons (330 bp).

Figura 2

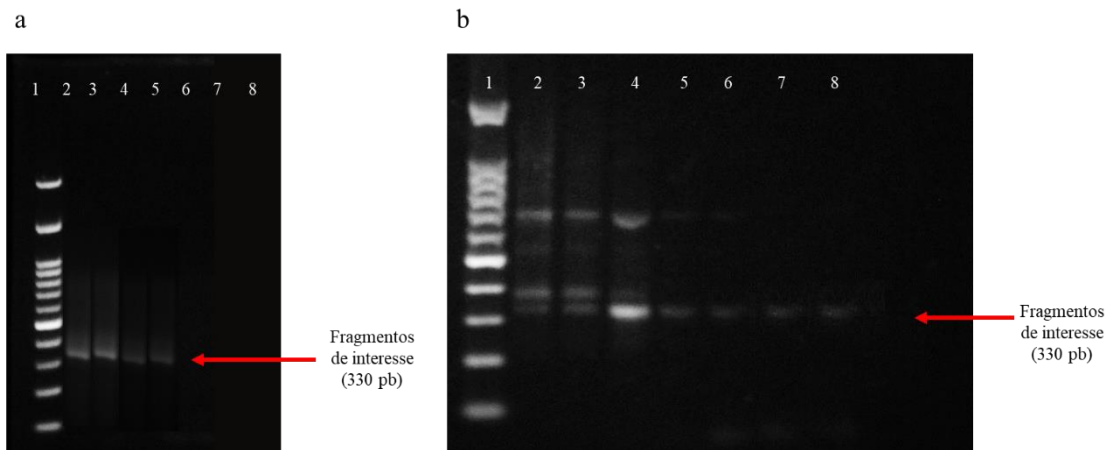


Figure 2. (a) 1.5% PCR agarose gel electrophoresis for an HSP70 gene fragment at different concentrations of *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA.; Column 1: Ladder 1Kb Plus (molecular weight marker); Columns 2 to 7: DNA sample from *L. (V.) braziliensis* at concentrations of 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001; 0.00001 ng respectively. The red arrow indicates the size of the amplicons (330 bp).

(b) 1.5% PCR agarose gel electrophoresis for a *Trypanosoma cruzi* kDNA fragment at different concentrations of this protozoan DNA. Column 1: Ladder 1Kb Plus (molecular weight marker); Columns 2 to 7: *T. cruzi* DNA sample at concentrations of 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001; 0.00001 ng respectively. The red arrow indicates the size of the amplicons (330 bp).

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Extração de DNA – sangue fenol/clorofórmio

1. Colocar o sangue (100 a 200 μL) em um tubo de 2 mL, adicionar as soluções de digestão: 300 μL de TNE 1x; 30 μL TRIS HCl pH 8 a 1m; 0.8 μL SDS 25%.
2. Adicionar 20 μL de Proteinase K.
3. Deixar o tubo em banho seco em 37°C overnight (ou 55°C por duas horas).
4. Adicionar 338 μL de fenol/clorofórmico isoamílico na proporção 25:24:1.
5. Levar ao vórtex por 15 segundos e centrifugar por 10 min a 12000 rpm.
6. Retirar sobrenadante e transferir para tubo limpo, adicionar dois volumes de etanol absoluto (observar a quantidade da amostra e multiplicar por 2. Inverter tubo até a precipitação do DNA.
7. Centrifugar por 30 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante.
8. Adicionar 500 μL de etanol 70%. Centrifugar por 10 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante.
9. Deixar secar e eluir em H₂O ultrapura (60 a 80 μL).
10. Armazenar a -20°C.

Anexo 2. Lista de endereços dos animais capturados e cedidos pela VAS

Espécie	Endereço	Bairro
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Rodrigues do Lago, 441	Centro
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Rodrigues do Lago, 441	Centro
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua das Camélias, 403	Convivio
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Carlos Guadanini, 2235	Jardim do Mirante
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Alameda Antonio Sartor, 246	Parque das Cascatas
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Cruz Pereira, 112	Vila dos Lavradores
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua das Costas, 613	Vila São Lúcio
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Costa Leite, 1346	Centro
<i>Didelphis albiventris</i>	Ana Maria Galdino Simonazzi, 349	Jardim Santa Cecília
<i>Didelphis albiventris</i>	Ana Maria Galdino Simonazzi, 349	Jardim Santa Cecília
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua das Costas, 613	Vila São Lúcio
<i>Didelphis albiventris</i>	CAIO INDUSCAR, Rod Marechal Rondon, Km 252	Distrito Industrial
<i>Didelphis albiventris</i>	Galvão Severino, 494	Vila Casa Branca
<i>Didelphis albiventris</i>	Av Geraldo Lima, 95 (Chacara Canaã)	Recanto Arvore Grande
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Otavio da Silva Teles, 61	Jardim Dona Nicota
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Maria Rosa Santiago, 41	Jardim Central
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Angelo Milanezi, 304	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Veiga Russo, s/ número (Escola Estadual José Pedretti Neto)	Jardim Dona Nicota de Barros
<i>Didelphis albiventris</i>	Ana Maria Galdino Simonazzi, 349	Jardim Santa Cecília
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua das Rosas, 892	Park Residencial Convivio
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Antonio Ingacio, 129	Jardim Dona Nicota
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Antonio Ingacio, 129	Jardim Dona Nicota
<i>Didelphis albiventris</i>	Alameda Antonio Sartor, 246	Parque das Cascatas

<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor José Barbosa de Barros, 1486	Jardim Paraíso
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Padre Euclides, 578	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Antonio Amaral César, 83	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Antonio Amaral César, 83	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Antonio Amaral César, 83	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Doutor Antonio Amaral César, 83	Vila Maria
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Nelo Cariola, 383	Vila São Lúcio
<i>Didelphis albiventris</i>	Benjamin Constant, 161	Vila Jahu
<i>Didelphis albiventris</i>	Benjamin Constant, 162	Vila Jahu
<i>Didelphis albiventris</i>	Benjamin Constant, 163	Vila Jahu
<i>Didelphis albiventris</i>	Major Maetus, 7 (Secretaria da Saúde)	Vila dos Lavradores
<i>Didelphis albiventris</i>	Avenida Rafael Serra, 311	Vila Eny
<i>Didelphis albiventris</i>	Avenida Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, S/N (HC UNESP)	Jardim São José
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua João Thomas de Almeida, 37	Vila Rodrigues
<i>Didelphis albiventris</i>	Rua Petrarca Bacchi, 870	Vila Maria
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	Gereone Rubim, 236	Jardim Botucatu - Rubião Júnior
<i>Guerlinguetus aestuans</i>	Rodovia Gastão Dal Farra, km 3, Sítio Terras de São	Demétria
<i>Guerlinguetus aestuans</i>	Rodovia Gastão Dal Farra, km 3, Sítio Terras de São	Demétria