

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

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

Marcela Figuerêdo Duarte Moraes
Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

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

Marcela Figuerêdo Duarte Moraes

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

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

M827c

Moraes, Marcela Figuerêdo Duarte

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

106 p. : tabs., fotos, mapas

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

Orientadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

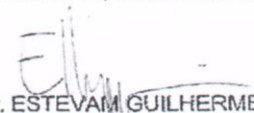
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: MARCELA FIGUERÊDO DUARTE MORAES

ORIENTADOR: ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

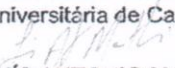
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


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


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


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

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


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

Jaboticabal, 23 de junho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

George Schaller

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

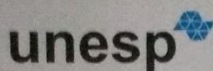
CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 05 de outubro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

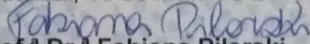
CERTIFICADO

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

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

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

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Carnívoros selvagens e parasitas zoonóticos transmitidos por vetores no Brasil

Os animais da Ordem Carnivora desempenham importantes papéis na estrutura da comunidade e, suas populações podem ser indicadoras das condições dos ecossistemas, pois apresentam funções e efeitos críticos nos ecossistemas no qual ocorrem (Crooks e Souleacute, 1999; Miller, 2000; Schmitz et al., 2000). Apresentam diversidade de comportamentos e ecologia, tais como serem especialistas solitários ou altamente sociais, frugívoros a hipercarnívoros, estritamente selvagens ou generalistas que vivem em estreita proximidade com os seres humanos (Valkenburgh, 2009). Na ausência de grandes carnívoros predadores de topo, os mesocarnívoros podem aumentar sua abundância e super-explorar vertebrados menores, levando a um controle da diversidade biológica (Crooks e Souleacute, 1999; Terborgh, 2001; Roemer et al., 2009). Entretanto, independentemente do tamanho corporal, os carnívoros selvagens geralmente estão entre os primeiros animais selvagens a desaparecerem devido ao aumento da pressão gerada pelos distúrbios ecológicos causados pela atividade humana (Morrison et al., 2007).

As alterações ambientais são de grande impacto para os carnívoros selvagens já que afetam negativamente os esforços para sua conservação, além de intensificar o contato da fauna selvagem com animais domésticos e com os seres humanos, gerando um meio propício para ocorrência de novos padrões de doenças. Isso ocorre porque, nestas condições a resiliência natural dos ecossistemas sofre estresse e as barreiras para transmissão de doenças se reduzem, levando à emergência, ao ressurgimento e à redistribuição de doenças infecciosas e parasitárias (Aguirre, 2009).

Os parasitas fazem parte da diversidade biológica, ocorrem em todo o mundo e estão entre os organismos mais antigos existentes na natureza (Zapalski e Hubert, 2011). Dentre os parasitas, os helmintos são responsáveis direta ou indiretamente

pela regulação das densidades e dinâmicas das populações de seus hospedeiros em seus habitats (Thomas et al., 2002). No entanto, espécies patogênicas de parasitas podem ameaçar a conservação de seus hospedeiros naturais, pois quando novos hospedeiros são infectados com parasitas que não são parte de sua fauna parasitária, a patogenicidade e a epidemiologia da infecção se tornam imprevisíveis (Cunningharn et al., 2003). Muitos destes parasitas não são transmitidos de forma direta, sendo necessário um hospedeiro intermediário, um vetor ou a maturação no ambiente para que o parasita complete seu ciclo biológico (Jay, 1996).

As doenças de carnívoros domésticos e selvagens transmitidas por vetores são de importância emergente na medicina veterinária e humana, devido ao potencial zoonótico destes patógenos (Otranto et al., 2009; Otranto e Dantas-Torres, 2011; Colwell et al., 2011; Dantas-Torres et al., 2012). Carnívoros selvagens e domésticos compartilham muitas espécies de artrópodes parasitas e patógenos zoonóticos associados (Otranto et al., 2015a, 2015b), porém em todo o mundo não há vigilância e controle sistemático de doenças infecciosas em carnívoros selvagens, além da raiva em alguns países (Otranto e Deplazes, 2019).

A infecção e a exposição a inúmeros parasitas transmitidos por vetores já foram relatadas em grande variedade de espécies de carnívoros selvagens pertencentes às famílias Canidae, Felidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Hyaenidae e Herpestidae (Alvarado-Rybak et al., 2016). No Brasil, parasitas transmitidos por vetores já foram descritos em diversos carnívoros selvagens, como a infecção por *Babesia spp.* diagnosticada em cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), graxaim (*Cerdocyon thous*), raposinha-do-campo (*Pseudolopex vetulus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), onça-pintada (*Panthera onca*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), onça-parda (*Puma concolor*) e gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) (André et al., 2011); por *Rangelia vitalii* em *C. thous* e *Lycalopex gymnocercus* (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; De Quadros et al., 2015); por *Cytauxzoon spp.* em *P. onca*, *L. wiedii*, *L. pardalis*, *P. concolor* e *P. yagouaroundi* (André et al., 2009; Furtado, 2010).

Parasitas da família Trypanosomatidae também têm sido relatados em carnívoros selvagens brasileiros. Estes parasitas apresentam grande diversidade de

hospedeiros e vetores, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, sendo assim, depois dos nematódeos, os eucariotos que apresentam maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (Steven e Rambaut, 2001; Simpson et al., 2006; Maslov et al., 2013; Lukes et al., 2014). Nesta família, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são os mais importantes para a saúde pública, com várias espécies que possuem como reservatórios carnívoros selvagens e domésticos.

A presença de *Trypanosoma cruzi* foi descrita em *C. thous* (Albuquerque et al., 1968; Herrera et al., 2011; Rocha et al., 2013), *L. pardalis* (Herrera et al., 2011; Rocha et al., 2013), quatis (*Nasua nasua*) (Laison et al., 1979; Miles et al., 1981; Ferriolli e Barreto, 1968; Herrera et al., 2008; Alves et al., 2011; Rocha et al., 2013), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (Barreto e Ferriolli, 1970; Rocha et al., 2013), *C. brachyurus* (Rocha et al., 2013), *L. vetulus* (Albuquerque e Barreto, 1970; Rocha et al., 2013), *P. concolor* (Rocha et al., 2013), irara (*Eira barbara*) (Deane, 1964; Barreto e Ribeiro, 1972), furão-pequeno (*Galictis cuja*) (Ferriolli e Barreto, 1969) e furão (*Galictis vittata*) (Barreto e Albuquerque, 1971; Lisboa et al., 2009). Enquanto *Trypanosoma evansi*, responsável por causar o “mal das cadeiras” e que recentemente teve reportado o seu potencial zoonótico na Índia e no Vietnã (Joshi et al., 2005; Van Chau et al., 2016), já foi diagnosticado em *C. thous*, *L. pardalis* (Herrera et al., 2011), *N. nasua* (Herrera et al., 2004; Aquino et al., 2010; Olifiers et al., 2015; Magalhães-Matos et al., 2016) e em *P. cancrivorus* (Magalhães-Matos et al., 2016) no Brasil.

Ainda dentro da família Trypanosomatidae, os carnívoros selvagens são hospedeiros de algumas espécies do gênero *Leishmania* (Roque et al., 2014). A espécie *L. infantum* (= sin *L. chagasi*) é o agente etiológico da leishmaniose visceral, tem como principal reservatório selvagem no Brasil o graxaim (*C. thous*) (Deane e Deane, 1954; Courtenay et al., 1996), mas também já foi detectada em outros carnívoros, como *S. venaticus* (Figueiredo et al., 2008; Lima et al., 2009), *P. vetulus* e *C. brachyurus* (Curi et al., 2006; Luppi, et al., 2008), *P. concolor* e *P. onca* (Dahroug et al., 2010), além da espécie *L. shawi*, agente etiológico da leishmaniose cutânea, diagnosticada em *N. nasua* (Lainson e Shaw, 1987).

Além dos protozoários, alguns nematódeos zoonóticos são transmitidos por vetores, como os filarídeos, que tem o gênero *Dirofilaria* como o mais conhecido, principalmente por causa da distribuição mundial de duas espécies principais, *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*, agentes etiológicos da dirofilariose canina e dirofilariose subcutânea, respectivamente (Otranto e Deplazes, 2019). No Brasil, foram descritos 26 gêneros com 91 espécies de filarídeos parasitando desde anfíbios até humanos (Vicente et al., 1997; Vieira et al., 2008; Moraes et al., 2017). Em carnívoros selvagens brasileiros, foram descritas *Dirofilaria incrassata* parasitando tecido subcutâneo de *N. nasua* e *P. cancrivorus* (Vicente et al., 1997); *D. repens* em tecido subcutâneo de *C. thous* e *N. nasua* (Noronha et al., 2002); *D. spectans* em pulmões e grandes vasos de *E. barbara* (Noronha et al. 2002), *Lontra longicaudis* (Noronha et al., 2002), *Pteronura braziliensis* (Vicente et al., 1997), além de *Dirofilaria striata* parasitando *L. wiedii* e *P. concolor* (Lent e Freitas, 1937; Vicente et al., 1997). Além dos gêneros *Brugia* sp., *Dirofilaria* sp., *Acanthocheilonema* sp. e *Mansonella* sp. que foram descritos em *N. nasua* recentemente (Moraes et al., 2017).

2.2 Filarioses zoonóticas e reservatórios selvagens

Os filarídeos são nematódeos pertencentes à família Onchocercidae, com ciclo de vida indireto e vetores amplamente distribuídos em todo o mundo (Cavallazzi et al., 2002; Garcez, 2006). O potencial zoonótico dos filarídeos é bem conhecido e a gravidade da enfermidade é dependente principalmente da localização do parasito nos órgãos do hospedeiro, da resposta do hospedeiro e carga parasitária (Pampiglione et al., 2001; Labarthe e Guerrero, 2005; Silva; Langoni, 2009). Na medicina humana, as filarioses mais estudadas são a filariose bancroftiana, causada por *Wuchereria bancrofti*, as filarioses linfáticas africanas e asiáticas, causadas por *Brugia timori*, *B. pahangi*, *B. malayi*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus* (WHO, 2010; Ramaiah e Ottesen, 2014), *Mansonella perstans* e *M. streptocerca*, além da *M. ozzardi* comum apenas na América Latina, sendo a região amazônica endêmica para esta filariose no Brasil (Lima et al., 2016; Silva, 2016; Medeiros et al., 2017; Tang et al., 2018).

Entretanto, outros filarídeos que tem animais selvagens e domésticos como reservatórios são relatados por seu potencial zoonótico, principalmente as filárias do gênero *Dirofilaria*, que tem cães domésticos como hospedeiros principais, além de parasitar carnívoros selvagens (Pampiglione et al., 2001). As espécies *D. repens* e *D. immitis* são as mais comumente recuperadas de infecções humanas no continente europeu e no americano (McCall et al., 2008). Outras espécies do gênero que já foram relatadas em infecções humanas (Cabrera et al., 2018) são a *D. ursi*, que tem como hospedeiros o urso-preto-americano (*Ursus americanus*) e o urso-preto-japonês (*Ursus thibetanus japonicus*) (Uni et al., 1980; Yamada et al., 2017), *D. subdermata*, considerada como uma espécie do grupo chamado por Beaver et al. (1987) como *Dirofilaria ursi-Like* e que tem como hospedeiros definitivos porcos-espinhos (*Erethizon dorsatum*) da região noroeste dos Estados Unidos e Canadá, além de *D. tenuis*, parasita de guaxinim (*Procyon lotor*) nos Estados Unidos (Canestri Trotti et al., 1997). Com exceção da *D. immitis*, que parasita coração, pulmões e grandes vasos (Simon et al., 2007), as outras espécies do gênero são parasitas de tecido subcutâneo, cavidades abdominal e torácica, olho (Beaver et al., 1987; Eberhard e Lammie, 1991; Richardson e Krause, 2002), além de serem reportados como causa de neurite periférica em seres humanos (Vicent et al., 2013).

Quanto ao gênero *Brugia*, bastante conhecido nos continentes africano e asiático pela elevada casuística de filarioses linfáticas em humanos, tem como espécies principais *Brugia malayi* e *B. pahangi*, cujos hospedeiros podem ser cães, gatos domésticos e macacos (Laing et al., 1960; Denham e McGreevy, 1977; Mak et al., 1982; Mak, 1984) e *B. timori* cujo reservatório animal não é conhecido (Fisher et al., 2004). A infecção humana por espécies do gênero *Brugia* era considerada até metade do século passado como de distribuição limitada àqueles continentes. Entretanto, já foram descritas três novas espécies zoonóticas nas Américas: *B. lepori*, cujo hospedeiro é o coelho selvagem do nordeste dos Estados Unidos da América (Compain et al., 2014), *B. beaveri* parasita de guaxinim e Bobcat (*Lynx rufus*) na América do Norte e *B. guyanensis*, parasitas de quatis na Guiana Inglesa, demonstrando que o gênero pode ter ampla distribuição geográfica (Richardson e Krause, 2002).

Dentre os filarídeos zoonóticos, ainda estão descritos parasitas do gênero *Mansonella*, com três espécies de importância para a saúde pública, *M. perstans*, *M. streptocerca* e *M. ozzardi*, porém apenas *M. perstans* e *M. streptocerca* têm relatos de hospedeiro animal (Marcos et al., 2012). *M. perstans* já foi relatada em gorilas (*Gorilla gorilla*) e chimpanzés (*Pan troglodytes*) (Nelson, 1965; Eberhard e Orihel, 1982), mas como a infecção humana tem sido relatada em regiões em que estes grandes primatas não ocorrem, e vem sendo discutido se realmente *M. perstans* é uma zoonose (Simonsen et al., 2011). *M. streptocerca* também foi descrita como parasita de chimpanzés nas florestas da África (Nurulhayati et al., 2018) e *M. ozzardi*, que não tem hospedeiro animal conhecido é de ocorrência restrita às Américas do Sul e Central, sendo no Brasil descrita pela primeira vez no Amazonas, em 1940, parasitando humanos e posteriormente já vem sendo detectada nos estados de Roraima, Acre e Mato Grosso (Medeiros et al., 2009).

Além dessas espécies mundialmente conhecidas, foi relatada a infecção humana num vilarejo em Gabão, na África, por *Mansonella rodhaini*, que tem os chimpanzés da África Central como reservatórios (Richard-Lenoble et al., 1988). De acordo com Medeiros et al. (2015), existe a possibilidade de estas espécies ampliarem sua área de distribuição para áreas não endêmicas, facilitada pelo grande número de trabalhadores que chegam a estas regiões para trabalhos temporários, contraem a infecção e retornam para suas regiões onde, porventura, também há disponibilidade de vetores adequados para a manutenção do ciclo epidemiológico nessa nova área.

2.3 Reservatórios silvestres e espécies de Trypanosomatidae de importância para a saúde pública no Brasil

A família Trypanosomatidae é constituída por eucariotos unicelulares e uniflagelados que pertencem à classe Kinetoplastea (Roger e Simpson, 2009). Com base em parâmetros tradicionais, os parasitos da família Trypanosomatidae foram distribuídos em 10 gêneros, sendo seis destes, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina* e *Sergeia*, que abrigam parasitas

monoxênicos de insetos, o gênero *Phytomonas*, que engloba parasitas heteroxênicos de plantas e insetos, e os gêneros heteroxênicos *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*, que compreendem as espécies de importância médica e veterinária, sendo parasitas de insetos e de vertebrados (Hoare e Wallace, 1966; Wallace, 1966; Wallace et al., 1983; Merzlyak et al., 2001).

As leishmanioses são zoonoses negligenciadas, que tem como agentes etiológicos várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, sendo endêmicas em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e da Bacia do Mediterrâneo, com graus variáveis de especificidade para hospedeiro (Herwaldt, 1999). São descritas 20 espécies de *Leishmania* transmitidas aos seres humanos por mais de 30 espécies de flebotomíneos (Oryan et al., 2013; Shirian et al., 2014). As manifestações clínicas da doença são diversas, e são dependentes da espécie de *Leishmania* presente na infecção e da resposta do hospedeiro, podendo ser classificada em leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral, leishmaniose dérmica pós-Calazar (WHO, 1990; Saha et al., 2006).

No Brasil, a leishmaniose visceral é um problema de saúde pública grave (Brasil, 2014a) e tem representado uma preocupação sanitária tanto pela sua expansão geográfica como pela tendência de urbanização (Souza, 2010). Tem como agente etiológico *Leishmania infantum* e é transmitida majoritariamente pela picada do flebotomíneo *Lutzomia longipalpis* (Cunha e Chagas, 1937; Lainson e Shaw, 1987; Rebêlo et al., 1996; Desjeux et al., 2004). Os reservatórios selvagens potenciais do agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil são raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e o graxaim (*C. thous*), além do gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), como importante hospedeiro. Porém a principal fonte de infecção nas áreas urbanas para o vetor são os cães domésticos (Deane e Deane, 1954; Deane, 1956; Sherlock et al., 1984; Sherlock, 1996).

Entretanto, em outros mamíferos selvagens brasileiros já foi descrita a infecção por *L. infantum*, como em lobo-guará (Curi et al., 2006), cachorro-vinagre (Figueiredo et al., 2008), onça-parda e onça-pintada (Dahroug et al., 2010), gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) e o gambá-comum (*D. marsupialis*), sendo estas consideradas apenas infecções esporádicas e de natureza benigna e inaparente, sugerindo uma antiga relação entre parasito e hospedeiro, porém ainda não é

conhecida a importância destes hospedeiros na transmissão da leishmaniose visceral no Brasil (Lainson, 2010).

Além da leishmaniose visceral, no Brasil ocorre a leishmaniose cutânea e a mucocutânea, listadas entre as oito doenças infectoparasitárias de maior importância pela Organização Mundial de Saúde (Pereira e Fonseca, 1994; Pinheiro et al., 2008). No Brasil, várias espécies de *Leishmania* são os agentes etiológicos das formas tegumentares da doença: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, agentes da forma cutânea e a mucosa da doença, e *L. amazonensis*, responsável da forma cutânea difusa (Piscopo e Azzopardi, 2007; Brasil, 2017). Como reservatórios selvagens da leishmaniose tegumentar, temos relatadas diversas espécies de pequenos roedores silvestres dos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys*, *Nectomys*, *Neacomys* e *Dasyprocta*; os marsupiais *Marmosa*, *Metachirus*, *Didelphis* e *Philander*, além do graxaim (Lainson, 2010). Embora geralmente interpretada como tal, a descrição de DNA de *Leishmania* em uma dada espécie de mamífero não é o suficiente para que se considere esta espécie um hospedeiro reservatório, pois como reservatório se entende um conjunto de espécies responsáveis pela manutenção duradoura e capaz de infectar os vetores de um parasita em um determinado meio ambiente (Roqu e Jansen, 2014).

Dentro do gênero *Trypanosoma* a principal espécie de importância para a medicina no Brasil é *Trypanosoma cruzi*. Este parasita é o agente etiológico da doença de Chagas, que tem distribuição espacial limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (Triatominae, Hemiptera, Reduviidae), que são encontrados principalmente na região Neotropical (Patterson, 2007) sendo também conhecida como “tripanossomose americana” (WHO, 2015). É transmitida principalmente através das fezes dos insetos triatomíneos sugadores de sangue infectados, mas também pode ocorrer troficamente quando um predador ingere sangue ou tecidos infectados de um mamífero ou inseto infectado (Silveira e Dias, 2011; Messenger et al., 2015). Devido ao histórico de inúmeros projetos de controle do principal vetor no Brasil, o *Triatoma infestans*, verificou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente neste século, entre os anos de 2000 a 2013 (1.081, 68,9%), seguida pela transmissão vetorial em 100 casos (6,4%) (Brasil, 2015).

Por se tratar de um parasito flagelado multi-hospedeiro, o *T. cruzi* é capaz de infectar várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos distribuídos em todas as regiões fitogeográficas do Brasil e, portanto, pode ser encontrado nos mais diversos nichos ecológicos e formar modalidades singulares de focos naturais de transmissão (Organização Pan-americana de Saúde, 2009; Roque et al., 2013; Brasil, 2014a; Coura, 2015; Messenger et al., 2015). *T. cruzi* estabelece infecções estáveis e duradouras, que exibem peculiaridades inerentes às diferentes espécies hospedeiras e outros múltiplos fatores, como as subpopulações de parasitas, rota de infecção, estado nutricional do hospedeiro e infecção concomitante com diferentes *T. cruzi* DTUs (unidades discretas de tipagem) ou outros taxa parasitas (Jansen et al., 2015).

As ordens Artiodactyla, Chiroptera, Primata, Carnivora, Rodentia, Cingulata, Pilosa e Didelphimorphia já demonstraram estar envolvidas no ciclo de transmissão de *T. cruzi* (Jansen et al., 2018), entretanto, são considerados como principais hospedeiros do parasita os primatas do gênero *Alouatta*, *Cebus* e *Sapajus*, os Didelphimorphia, morcegos dos gêneros *Artibeus*, *Noctilio*, *Mormoops*, *Natalus*, *Pteronotus*, *Myotis*, *Carollia*, *Desmodus*, *Glossophaga*, *Phyllostomus* e *Molossus*, (Marinkelle, 1982; Thomas et al., 2007) e os quatis (*N. nasua*), devido às taxas mais altas de parasitemia, expressas por hemoculturas positivas, além da competência na manutenção de maior diversidade de *T. cruzi* DTUs e de outras espécies de *Trypanosoma* (Jansen, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre AA (2009) Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites & Vectors** 2 (1): S7.

Aguirre, AA, O'hara, TM, Spraecker, TR, Jessup DA (2002) Monitoring the health and conservation of marine sea turtles and their ecosystems. IN.: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, HOUSE C, PEARL MC **Conservation Medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, p. 79-94.

Albuquerque, RD, Barretto, MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cerdocyon thous azarae*" (Wied, 1824) by "*T. cruzi*". **Revista Brasileira de Biologia** 28: 457–468.

Albuquerque RD, Barretto MP (1970) On wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLIV. Natural infection of the field fox, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lung, 1842) by *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo** 12: 375–382.

Alvarado-Rybak M, Solano-Gallego L, Millan J (2016) A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. **Parasites & Vectors** 9:538.

Alves-Costa CP (1998) **Frugivoria e dispersão de sementes por quatis (*Procyonidae: Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, MG**. Dissertação de Mestrado em Ecologia. UNICAMP, Campinas.

Alves FM, Olifiers N, Bianchi RC, Duarte AC, Cotias PM, D'Andrea OS, Gompper ME, Mourão GM, Herrera HM, Jansen AM (2011) Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. **Vector Borne Zoonotic Diseases** 11: 835–841.

Altizer S, Numm CL, Thrall PH, Gittleman JL, Antonovics J, Cunningham AA, Dobson AP, Ezenwa V, Jones KE, Pedersen AB, Poss M, Pulliam JRC (2003) Social organization and parasite risk in mammals: Integrating theory and empirical studies. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 34: 517-547.

Anderson RC (2000) **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission**. 2nd Edition. CABI Publishing: Wallingford, England. 650 p.

André M, Adania C, Machado R, Allegretti S, Felipe P, Silva K, Nakaghi A, Dagnone A (2009) Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Disease** 45:234-237.

André MR (2011) Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in Brazilian zoos. **Journal of Wildlife Diseases** 42 (1): 139-143.

Aquino LPCT, Machado RZ, Lemos KR, Marques LC, Garcia MV, Borges GP (2010) Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 19:112–118.

Baker PJ, Boitani L, Harris S, Saunders G, White PCL (2008) Terrestrial carnivores and human food production: Impact and management . **Mammal Review** 38:123-166.

Barcellos C, Monteiro AMV, Corvalán C, Gurgel HC, Carvalho MS, Artaxo P, Hacon S, Ragoni C (2009) Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 18 (3): 285-304.

Barretto MP, Albuquerque RD (1971) Studies on reservoirs and wild vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLVII. Natural infection of the mustelid, *Galictis vittata braziliensis* (Thunberg, 1820) by *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo** 13: 346– 351.

Barretto MP, Ferriolli FF (1970) Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXIX: Natural infection of *Procyon cancrivorus nigripes* Mivart, 1885, by *T. cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia** 30: 431–438.

Barretto MP, Ribeiro RD (1972) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LI. Natural infection of the mustelid, *Eira barbara barbara* (Lin., 1758) by *T. cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia** 32: 413–418.

Bateman PW, Fleming PA (2012) Big city life: Carnivores in urban environments. **Journal of Zoology** 287(1):1-23.

Beaver PC, Wolfson JS, Waldron MA, Swartz MN, Evans GW, Adler J (1987) *Dirofilaria ursi*-like parasites acquired by humans in the northern United States and Canada: report of two cases and brief review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 37(2):357-362.

Brasil (2014a) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil (2015) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico** 46(21):1-9.

Brasil (2017) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde.

Brocardo CR, Silva MXda, Ferracioli P, Candido JF, Bianconi GV, Moraes MFD, Galetti M, Passamani M, Policena A, Reis NR dos, Crawshaw Jr P (2019) Mamíferos do Parque Nacional do Iguaçu. **Oecologia Australis** 23(2): 165–190.

Cabrera ED, Carréton E, Morchón R, Falcón-Cordón Y, Falcón-Cordón S, Simón F, Montolya-Alonso JÁ (2018) The Canary Islands as a modelo of risk of pulmonar dirofilariasis in a hyperendemic area. **Parasitology Research** 117:933-36.

Canestri Trotti G, Pampiglione S, Rivasi F (1997) The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. **Parassitologia** 39: 369– 374.

Cavallazzi RS, Cavallazzi AC, Souza IV, Cardoso JJD (2002) *Dirofilariose* pulmonar humana: relato de sete casos. **Jornal de Pneumologia** 28 (2): 100-102.

Cleveland S, Laurenson MK, Taylor LH (2001) Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological Sciences** 356: 991–999.

Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D (2011) Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology** 182(1): 14–21.

Compain F, Decré D, Frazier I, Ramahefasolo A, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, Tackin A, Berger-Carbonne A, Podglajen I (2014) Zoonotic Filariasis Caused by Novel *Brugia* sp. Nematode, United States, 2011. **Emerging Infectious Diseases** 20 (7): 1248-1251.

Costa EMK (2003) **Movimentação, Frugivoria e dispersão de sementes por quatis (*N. nasua*) no Parque do Prosa, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul., Campo Grande.

Coura JR (2015) The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions: a comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110(3):277-282.

Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos LAB, Vasconcelos AW (1996) Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 90, 498–502.

Crooks KR, Souleacute ME (1999) Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. **Nature** 400:563 – 566.

Cunha AM, Chagas E (1937) Estudos sobre o parasito. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 32:329-37.

Cunningham AA, Daszak P, Rodriguez JP (2003) Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. **Journal of Parasitology** 89(Suppl.):S78-S83.

Curi NHA, Miranda I, Talamoni AS (2006) Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101:99-101.

Dahroug MA, Almeida AB, Sousa VR, Dutra V, Turbino NC, Nakazato L, De Souza RL (2010) *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 104:73-74.

Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D (2012) Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspectives. **Trends in Parasitology** 28(10): 437-446.

Deane LM, Deane MP (1954) Encontro de *Leishmanias* nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital** 45:419-21.

Deane LM (1956) **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará** [Thesis]. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária.

Deane LM (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 16: 27–48.

Deem SL, Karesh WB, Weishman W (2001) Putting theory into practice: wildlife health in conservation. **Conservation Biology** 15 (5): 24-33.

Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology. **Microbiol and Infectious Disease** 27: 305–318.

Denham D, McGreevy P (1977) Brugian filariasis: epidemiological and experimental studies. **Advances in Parasitology** 15: 243-309.

De Quadros R, Soares J, Xavier J, Pilati C, Da Costa J, Miotto B (2015) Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangelirosis. **Journal of Wildlife Disease** 51:787–9.

Eberhard ML, Lammie PJ (1991) Laboratory diagnosis of filariasis. **Clinics in Laboratory Medicine** 11(4):977-1010.

Ferriolli FF, Barretto MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXIX. Natural infection of *Nasua nasua solitaria* Schinz 1821 by *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo** 10: 354–363.

Ferriolli FF, Barretto MP (1969) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXV. Natural infection of the ferret *Galictis cuja furax* (Thomas,

1907) by *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo** 11: 264–273. 83.

Fischer P, Supali T, Maizels RM (2004) Lymphatic filariasis and *Brugia timori*: prospects for elimination. **Trends in Parasitology** 20 (8):351-355.

Figueiredo FB, Gremião ID, Pereira AS, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, Schubach TM, Madeira MF (2008) First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 102:200-201.

Fredo G, Bianchi M, De Andrade C, De Souza S, Leite-Filho R, Bandinelli M, Amorim DB, Driemeier D, Sonne L (2015) Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. **Journal of Wildlife Disease** 51:880–4.

Furtado MM (2010) Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de Onça-Pintada e animais domésticos em áreas preservadas de três biomas Brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia. Brazil: Dissertação , Universidade de São Paulo.

Galęcki R, Sokol R, Koziatsek S (2015) Parasites of wild animals as a potential source of hazard to humans. **Annals of Parasitology** 61(2): 105-108.

Gallup JL, Sachs JD (2001) The economic burden of malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 64: 85–96.

Garcez L M (2006) Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: A risk factor for human health. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39 (4): 333-336.

Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Yang GJ, Boatín BA, Kloos H (2012) A research agenda for helminth diseases of humans: social ecology, environmental determinants, and health systems. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6 (e1603).

Herrera HM, Dávila AMR, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea OS, Jansen AM (2004) Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazilian **Veterinary Parasitology** 125:263–275.

Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourão G, Jansen AM (2008) The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 102: 1133–1139.

Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourao GM, Jansen AM (2011) Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 105: 380–387.

Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. **Lancet**; 354 (9185):1191-1199.

Hoare CA, Wallace FG (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature** 212:1385-1386.

Jansen AM, Xavier SC, Roque AL (2015) The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Trop** 151:1–15.

Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR (2018) *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors** 11(502):1–25.

Irvine RJ (2006) Parasitas e da dinâmica de populações de mamíferos silvestres. **Zootecnia** 82.

Jay MT (1996) Zoonotic Diseases Of Carnivores And Occupational Safety Issues For Predator Control Employees. **Proceedings of the Seventeenth Vertebrate Pest Conference**.

Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J, Truc P (2005) Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 73:491–495.

Labarthe N, Guerrero J (2005) Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico? **Veterinary Parasitology** 133 (2-3): 149-156.

Laing AB, Edeson JF, Wharton RH (1960) Studies on filariasis in Malaya: the vertebrate hosts of *Brugia malayi* and *B. pahangi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 54: 92-9.

Lainson R (2010) The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 1: 13–32.

Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC (1979) Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 73: 193–204.

Lainson R, Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In.: Peters W, Killickkendrick R (editors) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press. 550 p.

Lent H, Freitas JFT (1937) Contribuição ao estudo do gênero *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 32, 37–54.

Lima BS, Dantas-Torres F, De Carvalho MR, Marinho-Junior JF, De Almeida EL, Brito ME, Gomes F, Brandão-Filho SP (2013) Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 107(9):592–7.

Lima VM, Fattori KR, Michelin AF, Nogueira FS, Souza LEO (2009) Evidence of *Leishmania* spp. antibodies and DNA in bush dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. **J. Zoo. Wildl. Med.** 40: 91-94.

Lima NF, Veggiani Aybar CA, Dantur Juri MJ, Ferreira UM (2016) *Mansonella ozzardi*: a neglected New World filarial nematode. **Pathogens and Global Health** 110(3): 97-107.

Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM (2009) The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. **Veterinary Parasitology** 165: 19–24.

Lukes J, Skalicky T, Tye J, Votypka J, Yurchenko V (2014) Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology** 1-8.

Luppi MM, Malta MCC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, Ecco R (2008) SANTOS, R.L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology** 155:146-151.

Magalhães-Matos PC, Cunha-Santos R, Sousa PGS, Sampaio-Júnior FDS, Barros FNL, Mourão FRP, Olibeira WBL, Gabriel AM, Monteiro SG, Góes-Cavalcante G, Scofield A (2016) Molecular detection of *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in procyonids (Carnivora: Procyonidae) in eastern Amazon, Brazil. **Ciência Rural** 46:663–8.

Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P (2013) Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonomes* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. **Parasites & Vectors** 6:48.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM de, Luna EA (2008) Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública** 24(12): 2941-2947.

Mak JW, Cheong WH, Yen PK, Lim PK, Chan WC (1982) Studies on the epidemiology of subperiodic *Brugia malayi* in Malaysia: problems in its control. **Acta Tropical** 39: 237-45.

Mak JW (1984) Zoonotic filariasis in Malaysia. **Malays Veterinary Journal** 8: 9-12.

Marcos LA, Arrospide N, Recuenco S, Cabezas C, Weil GJ, Fischer PU (2012) Short Report: Genetic Characterization of Atypical *Mansonella* (*Mansonella*) *ozzardi* Microfilariae in Human Blood Samples from Northeastern Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 87(3).

Marinkelle CJ (1976) The biology of trypanosomes of bats. In.: Lumsden WHR, Evans DA (Eds.) **Biology of the Kinetoplastida**, 1. Academic Press, London, New York, San Francisco.

Maslov DA, Votypka J, Yurchenko V, Lukes J (2013) Diversity and phyogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trend on Parasitology** 29(1): 43-52.

McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L (2008) Heartworm disease in animals and humans. **Advances in Parasitology** 66:193–285.

Medeiros JF, Crainey JL, Pessoa FAC, Luz SLB (2017) Mansonelliasis In.: **Arthropod borne diseases**, Springer, Heidelberg, Germany Marcondes, C.B. (Ed.), 645 p.

Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC (2009) *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104: 74-80.

Medeiros JF, Almeida TA, Silva LB (2015) A field trial of a PCR-based *Mansonella ozzardi* diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic M. ozzardi infections in both venous blood samples and FTA card dried blood spots. **Parasites & Vectors** 8:1–8.

Merzlyak E, Yuchencko V, Koslenikov A, Podlipaev S, Maslov D (2001) Diversity and phylogeny of insect trypanosimatids based on smal subunit rRNA genes: polyphylu of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 48:161-9.

Messenger LA, Miles MA, Bern C (2015) Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti Infective Therapy** 13(8):995-1029.

Miles MA, Povia MM, De Souza AA, Lainson R, Shaw JJ (1981) Chagas's disease in the Amazon Basin: I. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene** 75: 667–674.

Miller B (2000) The role of prairie dogs as keystone species. **Conservation Biology** 14:318–321.

Moraes MFD, Silva M X da, Magalhães-Matos PC, Albuquerque ACA, Tebaldi JH, Mathias LA, Lux Hoppe EG (2017) Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguazu National Park, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 8.

Morrison JC, Sechrest W, Dinerstein E, Wilcove DS, Lamoreux JF (2007) Persistence of large mammal faunas as indicators of global human impacts. **Journal of Mammalogy** 88: 1363-1380.

Nelson GS (1965) Filarial infections as zoonoses. **J. Helminthol.** 39: 229-250.

Noronha D, Vicente JJ, Pinto RM (2002) A survey of new records for nematodes from mammals deposited in the Helminthological collection of the Institute Oswaldo Cruz (CHIOC). **Revista Brasileira de Zoologia** 19: 945–949.

Nurulhayati AM, Faizah SN, Huda M, Prasadha P, Hendharta S, Amalisa N, Ndiko SAD, Dewi NA, Fahrurroji T, Pertiwi KA, Saffanah NU, Pratiwi E, Aslami FC, Nurdian DY (2018) *Mansonella streptocerca* Infestation. 2018.

Organização Internacional de Epizootias – OIE (2016) **One Health**. Paris, França.

Organização Pan-americana da Saúde (2009) Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: Organização Pan-Americana da Saúde.

Olifiers N, Jansen AM, Herrera HM, Bianchi R, D'Andrea OS, Mourão G de M, Gompper ME (2015) Co-infection and wild animal health: effects of trypanosomatids and gastrointestinal parasites on coatis of the Brazilian Pantanal. **PLoS One** 10: e0143997.

Orihel TC, Eberhard ML (1982) *Mansonella ozzardi*: a redescription with comments on its taxonomic relationships. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 31: 1142–1147.

Orihel TC, Eberhard ML (1998) Zoonotic Filariasis. **Clinical Microbiology Reviews** 11:366–81.

Oryan A, Shirian S, Tabandeh MR, Hatam GR, Randau G, Daneshbod Y (2013) Genetic diversity of *Leishmania major* strains isolated from different clinical forms of cutaneous leishmaniasis in southern Iran based on minicircle kDNA. **Infections, Genetics and Evolution** 19: 226-231.

Otranto D, Dantas-Torres F (2011) Zoonotic helminths affecting the human eye. **Parasites & Vectors** 4: 41.

Otranto D, Dantas-Torres F, Mallia E, Digeronimo PM, Brianti E, Testini G, Traversa D, Lia RP (2009) *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: report of new host species and ecological implications. **Vet. Parasitol.** 166: 262-267.

Otranto D, Cantacessi C, Pfeffer M, Dantas-Torres F, Brianti E, Deplazes P, Genchi C, Guberti V, Capelli G (2015a) The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part I: Protozoa and tick-borne agents. **Veterinary Parasitology** 213: 12-23.

Otranto D, Cantacessi C, Pfeffer M, Dantas-Torres F, Brianti E, Deplazes P, Genchi C, Guberti V, Capelli G (2015b) The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: helminths and arthropods. **Veterinary Parasitology** 213: 24-37.

Otranto D, Deplazes P (2019) Zoonotic nematodes of wild carnivores. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 9: 370 – 383.

Pampiglione S, Canestri TG, Rivasi F (1995) Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: a review of world literature. **Parassitologia** 37: 149–93.

Pampiglione S, Rivasi F, Angeli G, Boldorini R, Incensati RM, Pastormerlo M, Pavesi M, Ramponi A (2001) *Dirofilariarepens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. **Histopathology** 38:344-354.

Patterson JS (2007) Comparative morphometrics and molecular genetic analyses of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). PhD thesis, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Universidade of London, UK.

Pereira GFM, Fonseca HHR (1994) Leishmaniose Tegumentar Americana: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 27(supl.): 45-50.

Pinheiro FG, Luz SLB, Franco AMR (2008) Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica** 38(1): 165 – 172.

Piscopo TV, Azzopardi CM (2007) Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal** 83: 649-657.

Ramaiah K, Ottesen EA (2014) Progress and impact of 13 years of the global programme to eliminate lymphatic filariasis on reducing the burden of filarial disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 8: e3319.

Rebêlo JMM, Mendes WA, Costa JML, Cavaleiro N (1996) Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 12:545-9.

RENTAS (2016) I relatório nacional sobre gestão e uso sustentável da fauna silvestre. Ed. Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (RENTAS), Brasília, DF, Brasil. 668p.

Richard-Lenoble D, Kombila M, Bain O, Chandenier J, Mariotte O (1988) Filariasis in Gabon: human infections with *Microfilaria rodhaini*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 39:91–92.

Richardson DJ, Krause PJ (2002) **World Class Parasites. North American Parasitic Zoonoses**. 1st ed. Vol 6. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 224p.

Ricobom AE (2001) **O Parque do Iguaçu como unidade de conservação da natureza no âmbito do MERCOSUL: os problemas decorrentes da degradação ambiental**. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Geografia, do Setor de Ciências da Terra, da Universidade Federal do Paraná: Curitiba.

Ripple WJ, Estes JÁ, Beschta RL, Wilmers CC, Ritchie EG, Heblenwhite M, Berger J, Eimhagem B, Letnic M, Nelson MP, Schimitz OJ, Smith DW, Wallach AD, Wirsing

AJ (2014) Status and ecological effects of the world's largest carnivores. **Science** 343:124 -148.

Rocha FL, Roque AL, Arrais RC, Santos JP, Lima VD, Xavier SC, Cordeiro-Estrela P, D'Andrea OS, Jansen AM (2013) *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**, 140: 160–170.

Roemer GW, Gompper ME, Valkenburgh V (2009) The ecological role of the mammalian mesocarnivore. **Bioscience** 59: 165-173.

Roger AJ, Simpson AG (2009) Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree. **Current Biology** 19:R165-7.

Roque AL, Xavier SC, Gerhardt M, Silva MF, Lima VS, D'Andrea OS, Jansen AM (2013) *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. **Veterinary Parasitology** 193(1-3):71-77.

Roque ALR, Jansen AM (2014) Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania sp.* e sua importância na manutenção dos Ciclos de Transmissão nos ambientes silvestre e Sinantrópico. In.: Conceição-Silva F, De-Simone SG, Alves CR, Porrozzini R (2014) **Questões atuais em leishmanioses do continente americano**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 233 – 257.

Salvador S, Clavero M, Pitman RL (2011) Large mammal species richness and habitat use in an upper Amazonian forest used for ecotourism. **Mammalian Biology** 76: 115-123.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N (2006) Immune responses in kala-azar. **Indian Journal of Medicine Research** 123: 245-266.

Schmitz OJ, Hambäck PA, Beckerman AP (2000) Trophic cascades in terrestrial systems: A review of the effects of carnivore removal on plants. **American Naturalist** 155:141–153.

.

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

Sherlock IA, Miranda JC, Sadirgusky M, Grimaldi JRG (1984) Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 79:511.

Sherlock IA (1996) Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 91:671-83.

Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Panahi S, Daneshbod Y (2014) Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 138: 235-240.

Silva LBT (2016) **Mansanelose no Município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado. ILMD/Fiocruz-AM.

Silva RCD, Langoni H (2009) Dirofilariose: Zoonose emergente negligenciada. **Cienc Rural** 39 (5): 1615-1624.

Silveira AC, Dias JCP (2011) O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44 (supl 2): 52-63.

Simon F, Kramer LH, Roman A, Blasin W, Morchon R, Marcos-Atxuteg C, Grand G, Genchi C (2007) Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. **Veterinary Research Communications** 31: 161–171.

Simpson AG, Stevens JR, Lukes J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastids flagellates. **Trends on Parasitology** 22(4): 168-74

Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM (2011) *Mansonella perstans* filariasis in Africa. **Acta Tropical** 120: S109-S120.

Smith KF, Acevedo-Whitehouse K, Pedersen AB (2009) The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal Conservation** 12: 1-12.

Soares J, Dall'agnoli B, Costa F, Krawczak F, Comerlato A, Rossato B (2014) Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology** 202:156–63.

Souza W (2010) **Doenças negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 56p.

Stevens J, Rambaut A (2001) Evolutionary rate differences in trypanosomes. **Infection, Genetics and Evolution** 1(2): 143-50.

Tang T-HT, Crainey JL, Post RJ, Luz SLB, Rubio JM (2018) Mansonellosis: current perspectives. **Research and Reports in Tropical Medicine** 1-16.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ (2001) Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences** 356: 983–989.

Teborgh J, Nuñez PV, Rao M, Shahabuddin G, Irihuela G, Riveros M, Ascanio R, Adler GH, Lambert TD, Balbas L (2001) Ecological meltdown in predator-free forest fragments. **Science** 294:1923-1926.

Thomas F, Brown SP, Sukhdeo M, Renaud F (2002) Understanding parasite strategies: a state-dependent approach? **Trends in Parasitology** 18: 387–390.

Thomas ME, Rasweiler JJ, D'Alessandro A (2007) Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102 (5): 559–565.

Thorne ET, Williams ES (1988) Disease and endangered species: The black-footed ferret as a recent example. **Conservation Biology** 2: 66-74.

Treves A, Wallace RB, Naughton-Treves L, Morales A (2006) Co-Managing Human–Wildlife Conflicts: A Review Co-Managing Human–Wildlife Conflicts. **Human Dimensions of Wildlife** 11:383–396.

Uni S, Kimata I, Takada S (1980) Cross-section of *Dirofilaria ursi* in comparison with *D. immitis*. **Japanese Journal of Parasitology** 29:489–97.

Valkenburgh BV (2009) Costs of carnivory: tooth fracture in Pleistocene and Recent carnivorans. **Biological Journal of the Linnean Society** 96: 68–81.

Van Chau VN, Le BC, Desquesnes M, Herder S, Phu HLN, Campbell JI (2016) A clinical and epidemiological investigation of the first reported human infection with the zoonotic parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. **Clinical Infectious Diseases** 62:1002–1008.

Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM (1997) Nematódeos do Brasil. Parte V:Nematóides de Mamíferos. **Revista Brasileira de Zoologia** 14(1):1-152.

Vincent AL, Greene J, Tucci V, Cabrera-Cancio MR (2013) *Dirofilaria tenuis* Causing Neuritis. **Infectious Diseases in Clinical Practice** 21(5).

Vieira FM, Luque JL, Muniz-Pereira LC (2008) Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. **Zootaxa** 1721: 1–23.

Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I (1983) Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology** 30:308-13.

Wallace FG (1966) The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology** 18:124-93.

Werneck GL (2014) Leishmaniose visceral no Brasil: fundamentos e preocupações em relação ao controle de reservatórios . **Revista de Saúde Pública** 48 (5): 851-856.

WHO (1990) **Expert Committee on the Control of the Leishmaniases**. Control of the leishmaniases: report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 6 to 10 February 1989]. World Health Organization technical report series; no. 793. World Health Organization.

World Health Organization (2010) **WHO Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Progress Report for 2000–2009 and Strategic Plan 2010–2020**; World Health Organization: Geneva, Switzerland.

World Health Organization (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record** 90(6):33-44.

Yamada M, Shishito N, Nozawa Y, Uni S, Nishioka K, Nakaya T (2017) A combined human case of *Dirofilaria ursi* infection in dorsal subcutaneous tissue and *Anisakis simplex* sensu stricto (s.s.) infection in ventral subcutaneous tissue. **Tropical Medicine and Health** 45: 26.

Young TP (1994) Natural die-offs of large mammals - implications for conservation. **Conservation Biology** 8: 410-418.

Zapalski MK, Hubert BLM (2011) First fossil record of parasitism in devonian calcareous sponges (stromatoporoids). **Parasitology** 138: 132-138.

CAPÍTULO II: FILOGENIA DE FILARÍDEOS ZONÓTICOS (SPIRURIDA: ONCHOCERCIDAE) EM CARNÍVOROS SELVAGENS E CÃES DOMÉSTICOS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA

1. INTRODUÇÃO

Os filarídeos são helmintos cosmopolitas pertencentes à família Onchocercidae (ANDERSON, 2000), com 88 gêneros descritos no mundo (LEUFOULON et al., 2015). São responsáveis pelas filarioses, enfermidades originadas pela presença do nematódeo adulto em diferentes órgãos, desde tecido subcutâneo e cavidades corporais, até órgãos importantes como coração e pulmões de animais e humanos. A gravidade da doença é dependente do órgão-alvo acometido, resposta do hospedeiro e da intensidade parasitária (MAGNIS et al., 2013).

Os filarídeos possuem ciclo indireto e transmissão por vetores artrópodes hematófagos (ANDERSON, 2000), sendo várias espécies originalmente descritas em animais, como agentes etiológicos de infecção em humanos, dentro dos gêneros *Dirofilaria*, *Onchocerca*, *Brugia*, *Dipetalonema*, *Acanthocheilonema*, *Mansonella* (ORIHÉL, EBERHARD, 1998). Dentre os helmintos zoonóticos, os filarídeos possuem maior capacidade de aumentarem suas áreas de ocorrência devido a mudanças climáticas, que favorecem a expansão dos vetores para novas regiões e, portanto, se caracterizando como importante zoonose emergente (GORDON et al., 2016).

No Brasil, foram descritos 26 gêneros com 91 espécies de filarídeos parasitando desde anfíbios até humanos (VICENTE et al., 1997; VIEIRA et al., 2008; MORAES et al., 2017). Em carnívoros selvagens brasileiros, até o momento, foi relatada a ocorrência de sete espécies de filarídeos, sendo quatro destas identificadas por meio de técnicas parasitológicas tradicionais (MORAES et al., 2017).

O diagnóstico definitivo das filarioses é realizado com a utilização de técnicas parasitológicas convencionais, que se baseiam na concentração sanguínea e observação das microfírias no esfregaço sanguíneo. Outras técnicas

complementares utilizadas são os testes sorológicos imunocromatográficos e imunoenzimáticos, histoquímica das microfilárias e mais recentemente, o diagnóstico molecular (RAMZY, 2002). No entanto, em animais selvagens, é comum a ocorrência de coinfeção por mais de uma espécie de filarídeo em um mesmo indivíduo (CONGA et al., 2018) o que dificulta até mesmo a identificação molecular. Além disso, a dificuldade de localização e coleta dos parasitas adultos no cadáver de animais selvagens impossibilita a descrição de possíveis novas taxa, sendo um desafio o estudo destes nematódeos em animais de vida livre (ORIHIEL, EBERHARD, 1998).

Dessa forma, tendo em vista a relevância patogênica destes parasitas, o relativo desconhecimento do perfil epidemiológico dessa parasitose, bem como o risco notório à saúde humana, tanto da população local quanto dos turistas que visitam o Parque Nacional do Iguaçu, a presente pesquisa visou descrever a diversidade de espécies de filarídeos de ocorrência em uma população de quatis de vida livre e cães domésticos do entorno deste importante remanescente de Mata Atlântica do Sul do Brasil e ampliar o conhecimento filogenético sobre as filarioses neotropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os animais foram amostrados no Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu), localizado no oeste do Estado do Paraná, Brasil, entre as coordenadas geográficas 25°05'S e 25°40'S e 54°30'W e 54°40'W (IBAMA, 2000) (Figura 1). Este parque é uma das áreas de proteção ambiental mais importantes do Brasil, dentro do Bioma Mata Atlântica, com grande biodiversidade, mas também com forte atividade turística (KROPF; BRITO, 2017). Além disso, a área de entorno do parque é antropizada, devido principalmente às atividades agropecuárias, que resultaram, ao longo dos anos, em desmatamento e facilitaram a presença de caçadores ilegais em seu interior (SILVA, 2018).

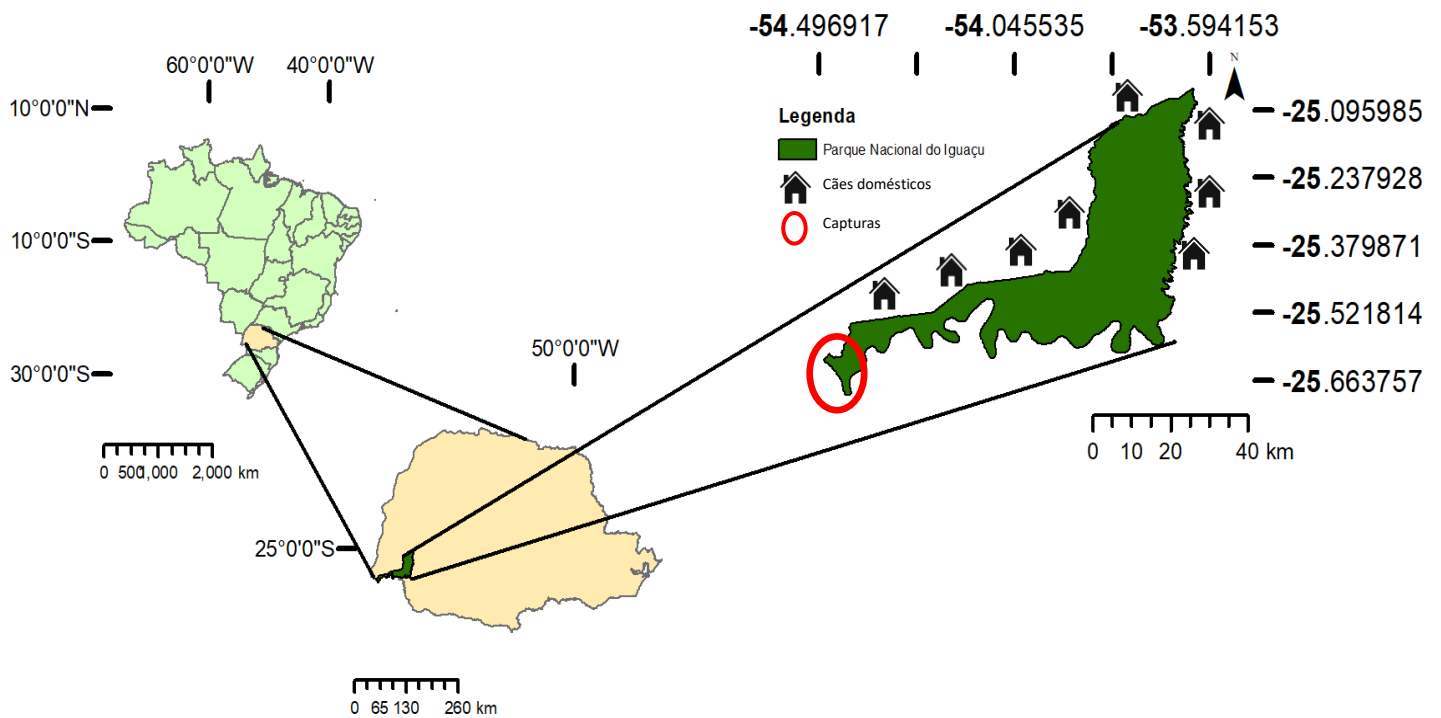


Figura 1. Localização geográfica do PARNA Iguaçu, Paraná, Brasil, e ponto de captura de carnívoros selvagens e amostragem de cães domésticos.

2.2. Capturas e coleta de amostras

Foram capturados 157 quatis (*Nasua nasua*), dois gatos-do-mato-pequenos (*Leopardus guttulus*), dois gatos-mouriscos (*Herpailurus yagouaroundi*) e uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), por meio de 12 armadilhas Tomahawk e pucás, no período entre agosto de 2014 e dezembro de 2017, totalizando 8.800 horas de campo. Foi utilizada como isca para as armadilhas a mistura de partes de frango ou bacon pré-cozido previamente com alguma fruta fresca (banana, abacaxi ou manga). Os animais foram sedados com a associação comercial de zolazepam e tiletamina 5 mg/kg, intramuscular, para avaliação física, biometria e coleta de amostras. Cada animal foi identificado com um brinco numerado, para evitar recapturas. Foram colhidos 10 mL de sangue após venopunção da jugular. A idade dos animais foi estimada de acordo com Olifiers et al. (2010). Após os procedimentos necessários para esta pesquisa, os animais foram soltos no mesmo local de coleta após retorno

da sedação. Além disso, foram amostrados quatro graxains (*Cerdocyon thous*) atropelados na rodovia PR-469, no interior do parque, realizada a necrópsia e colhidas amostras de baço e fígado para serem avaliadas quanto à presença de filarídeos.

A amostragem de cães domésticos foi dividida nas áreas rural e urbana. A área rural do entorno do Parque foi estabelecida em um raio de até 1 km de distância entre as propriedades rurais e o limite do PARNA Iguaçu; além disso, capturas ocasionais de cães domésticos também ocorreram no interior do parque. Foram visitadas 64 propriedades rurais em oito municípios limítrofes ao Parque: Foz do Iguaçu, Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu, Matelândia, Céu Azul, Santa Tereza do Oeste, Lindoeste e Capitão Leônidas Marques o que resultou na amostragem de 141 cães na área rural, além de quatro cães capturados no interior do parque.

A amostragem de cães da área urbana foi realizada em um abrigo particular no município de Foz do Iguaçu, com população de 180 cães. Após autorização dos proprietários, os cães foram contidos fisicamente para exame físico e coleta de amostras sanguíneas por punção da veia cefálica em tubos com e sem EDTA. No abrigo de cães foram avaliados 81 animais, totalizando a amostragem da pesquisa em 226 cães domésticos.

2.3 Diagnóstico das filariose

2.3.1 Morfologia e morfometria das microfilárias

Para a detecção de microfilárias, foi utilizada a técnica de concentração de Knott modificado por Newton e Wright (1956), para o qual 1 mL de sangue venoso foi adicionado em tubo de plástico cônico de 15 mL, contendo previamente 9 mL de formalina a 2%. O tubo foi centrifugado a 1.200 rpm durante cinco minutos. O fluido sobrenadante foi desprezado e com o sedimento foram feitos esfregaços em lâminas, que secaram à temperatura ambiente, e foram corados por Panótico rápido. A lâmina foi examinada ao microscópio, em aumento de 10x, com confirmação da morfologia em 40x. As características morfométricas e morfológicas das microfilárias foram obtidas em microscópio Olympus BX-51 dotado de câmera digital QColor 3, e

as imagens foram processadas pelo software analisador de imagens ImagePro Plus v. 4.0.

*2.3.3 Teste imunológico para a pesquisa de antígeno da *Dirofilaria immitis**

O teste imunocromatográfico *Dirofilariose AG Test Kit®* (ALERE, Estados Unidos da América) foi utilizado nesta pesquisa. O dispositivo de teste da embalagem foi colocado em uma superfície plana, seca, limpa, e o processamento e interpretação dos resultados realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Esse teste tem 100% de sensibilidade e 98,6% de especificidade para *D. immitis*. Para os quatis esse teste foi utilizado como um complemento no diagnóstico de *D. immitis* nas amostras positivas nas análises moleculares.

2.4 Estudos moleculares

2.4.1 Extração de DNA e triagem para filarídeos

A extração do DNA das amostras de sangue e tecidos foi realizada utilizando-se o protocolo otimizado pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular (FCAV/UNESP) de acordo com o proposto por Bag et al. (2016). Para triagem das amostras foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores das regiões S2/S16 (XIE; BAIN; WILLIAMS, 1994). As reações foram compostas por tampão 1X (KCl 50 mM, TRIS-HCl 200 mM, pH 8,4); 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 pmol de cada primer; BSA 0,001 mg, 100 ng de DNA genômico total e água pura estéril para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, e 72°C por 40 segundos; e um ciclo final a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas ainda para amplificação do gene GAPDH de mamíferos (BIRKENHEUER et al., 2003), a fim de testar a viabilidade do DNA obtido para reações de PCR.

2.4.2 Identificação molecular e filogenia

Com base nas sequências de diferentes regiões gênicas de filarídeos disponibilizadas por Lefoulon et al. (2015), as regiões que apresentaram maior acurácia na separação entre gêneros e espécies de filarídeos foram as codificadoras dos genes miosina e hsp70. Dessa forma, as reações de amplificação parcial dos genes miosina e hsp70 foram realizadas da mesma maneira descrita para a amplificação com os primers S2/S16 no item 2.4.1. Os fragmentos amplificados foram submetidos à PCR de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado por eletroforese de capilar em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GREEN, 1996; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) para verificação da qualidade de bases e corte das extremidades das sequências, levando-se em consideração bases com qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências qualificadas deste estudo e as do banco de dados do NCBI foram alinhadas utilizando-se a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004). Para as análises filogenéticas, o melhor modelo evolutivo foi selecionado de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC) utilizando-se a ferramenta ModelTest 3.7 (POSADA; BUCKLEY, 2004).

As árvores filogenéticas foram obtidas pela análise bayesiana utilizando-se o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). O modelo evolutivo utilizado foi correspondente ao tipo de substituição 6 para sequências de miosina, tipo de substituição 2 para o gene hsp70 e distribuição gamma para ambas as regiões. As análises foram realizadas em quatro cadeias com 10.000.000 de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. Os filogramas obtidos foram editados graficamente pelo software Dendroscope 3 (HUSON; SCORNAVACCA, 2012). Foram utilizados como grupos externos as espécies *Protuspirura muricola* (Spiruridae) e *Filaria latala* (Filariidae), segundo proposto em estudos prévios de Onchocercidae (CASIRAGHI et al., 2004;

LEFOULON et al., 2015). Os valores de distância genética entre as sequências foram obtidos pelo software PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) utilizando o modelo evolutivo general time-reversible (GTR) de acordo com o critério de AIC. Os haplótipos foram determinados com o auxílio do software DnaSP6 (ROZAS et al., 2017).

2.5 Avaliação hematológica e bioquímica

Uma alíquota de 3mL de sangue coletada, a partir de tubos acrescidos de K3-EDTA, foi utilizada para realização de hemograma. Para as dosagens bioquímicas, foram utilizadas alíquotas de 4 ml de sangue colhidos em tubos a vácuo sem anticoagulante, para a obtenção de soro.

Para a dosagem das concentrações de proteínas totais (PT, g/dL), de albumina (Alb, g/dL), de ureia (NNP, mg/dL), creatinina (CREA, mg/dL), as enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO, U/L), transaminase glutâmico pirúvica (TGP, U/L) e fosfatase alcalina (FA,U/L) foram utilizados kits comerciais (LABTEST® Diagnóstica, Belo Horizonte, MG), com as leituras feitas em analisador bioquímico automático. A concentração das globulinas foi determinada pela diferença entre a dosagem de proteínas totais e de albumina.

2.6 Interpretação dos dados e análise estatística

Os animais avaliados foram divididos nos grupos “infectados” e “livres de infecção”. Para verificação da interferência das parasitoses sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados por meio do teste de Anderson-Darling. Quando possível, os dados heterocedásticos foram submetidos à transformação logarítmica ou radicial (SAMPAIO, 2010). Os dados homocedásticos, por sua vez, foram submetidos ao teste F para comparação de variância e, no caso de igualdade de variâncias, foi utilizado o teste t para comparação de dois grupos. Dados heterocedásticos que não apresentaram normalidade de distribuição mesmo após transformação, foram comparados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011). Ainda foram

realizadas as análises multivariadas de Regressão Linear e Regressão Logística para verificar possível associação entre os parâmetros previamente citados. Os cálculos foram realizados utilizando o software R, com P ajustado em 0,05.

2.7 Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no uso dos Animais (protocolos 07553/14; 11.510/16 e 006106/19) e seguiram os padrões internacionais. As capturas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO protocolo 55594-6).

3. RESULTADOS

Dentre os carnívoros selvagens avaliados nesta pesquisa, apenas os quatis (*N. nasua*) apresentaram infecção por filarídeos. As prevalências de infecção por filarídeos nas amostras observadas no teste de Knott e no diagnóstico molecular foram de 84,4% (77,39%-89,59%) e 74,5% (67,67%-82,03%), respectivamente. Com relação aos cães domésticos, as prevalências no teste de Knott e no diagnóstico molecular foram de 7,96% (5,10%-12,26%) e 0,44% (0,08%-2,46%), respectivamente. Foram obtidas 134 sequências de filarídeos do gene codificador da miosina das amostras de quatis e duas de uma amostra de cão doméstico. Com relação ao gene hsp70, foram obtidas 22 sequências de filarídeos de quatis e duas de cão doméstico.

A espécie de microfilária dominante nas amostras de quatis avaliadas foi identificada pelas análises filogenéticas como pertencente ao gênero *Mansonella*. Esta espécie foi encontrada em 97,78% (93,67%-99,24%) das sequências das amostras analisadas. O subgrupo referente a esta espécie de *Mansonella* na árvore filogenética das sequências de miosina está representado pelos haplótipos Q2, Q10.1, Q36.1, Q50, Q54.1, Q73.1, Q99, Q146 e Q147.1 (Figura 2). Esta espécie apresentou identidade genética de 98,5% e 92,6% com *Mansonella ozzardi* no gene codificador de miosina e hsp70, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Ainda no grupo do

gênero *Mansonella* observou-se que duas amostras, Q59 e Q98, agruparam fora do subgrupo da *Mansonella* predominante, cuja identidade genética no gene codificador da miosina é de 98,2% com *M. ozzardi* para a amostra Q59 e de 99,04% com *M. ozzardi* para a amostra Q98. Quando foram realizadas as análises filogenéticas para o gene hsp70, essas duas amostras aparecem agrupadas em um mesmo subgrupo, com 96,3% de identidade com a sequência de *M. ozzardi* do banco (Figura 3).

Segundo os resultados das análises moleculares e morfológicas, concluiu-se que nenhuma das microfilárias presentes nos quatis estudados pertence à espécie *M. ozzardi* (identidade genética <98,7%). Além disso, é possível afirmar que as microfilárias presentes nas amostras Q59 e Q98 são do gênero *Mansonella* e diferem geneticamente da espécie de *Mansonella* predominante nos animais estudados. As microfilárias do gênero *Mansonella* detectadas nas amostras de quatis não foram identificadas em espécie, uma vez que não há sequências dos genes miosina e hsp70 para outras espécies do gênero no banco do NCBI, sendo assim classificadas aqui neste trabalho com *Mansonella* sp. 1 e *Mansonella* sp. 2. Devido à elevada prevalência de *Mansonella* spp. nos quatis estudados, é possível sugerir que estes carnívoros possam ser reservatórios de *Mansonella* spp. na Mata Atlântica do PARNA Iguaçu.

As amostras Q10.2, Q36.2, Q54.2, Q73.2 e Q147.2 apresentaram coinfeção por *Mansonella* e outras duas espécies de microfilárias com bainha, as quais foram separadas na árvore filogenética em dois subgrupos no grupo dos filarídeos linfáticos (Figuras 2 e 3). De acordo com as análises das sequências, as microfilárias presentes nas amostras Q10.2, Q73.2, e Q147.2 foram classificadas como Embainhadas 1, enquanto as amostras Q36.2 e Q54.2, como Embainhadas 2. Nas árvores filogenéticas de hsp70, as amostras Embainhadas 1 e 2 permanecem em subgrupos diferentes e agrupadas próximas às espécies do gênero *Brugia* e *Wuchereria bancrofti*. Assim, pode-se sugerir que essas microfilárias encontradas pertencem ao grupo de filarídeos que causam as filariose linfáticas e são dois gêneros distintos daqueles já identificados na literatura.

Duas amostras de quati (Q73 e Q147) apresentaram coinfeção por três espécies de filarídeos, *Mansonella* sp., microfilária embainhada 1 e *Dirofilaria immitis*. Além da identificação molecular de *D. immitis*, as amostras Q73 e Q147

foram positivas também no teste imunocromatográfico para detecção do antígeno desta espécie de *Dirofilaria*. Como controle de especificidade deste teste, foram utilizadas amostras que possuíam outros gêneros de filarídeos, e estas não apresentaram resultado positivo. Este resultado corrobora a identificação molecular da microfilária presente nessas amostras.

Em relação aos cães domésticos, apenas quatro amostras das 226 testadas foram positivas para filarídeos nas análises moleculares. Das quatro amostras positivas apenas uma, a C16, gerou sequências para análises filogenéticas, tendo sido possível a identificação da microfilária presente nesta amostra como *Acanthocheilonema* sp. Devido à ausência de sequências de miosina e hsp70 de *A. reconditum* no banco de dados não foi possível comparar a sequência obtida com a desta espécie.

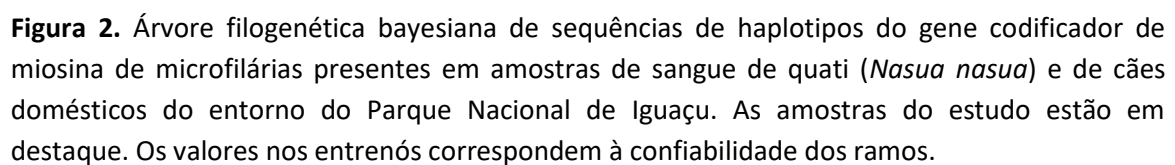


Figura 2. Árvore filogenética bayesiana de sequências de haplotipos do gene codificador de miosina de microfilárias presentes em amostras de sangue de quati (*Nasua nasua*) e de cães domésticos do entorno do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.

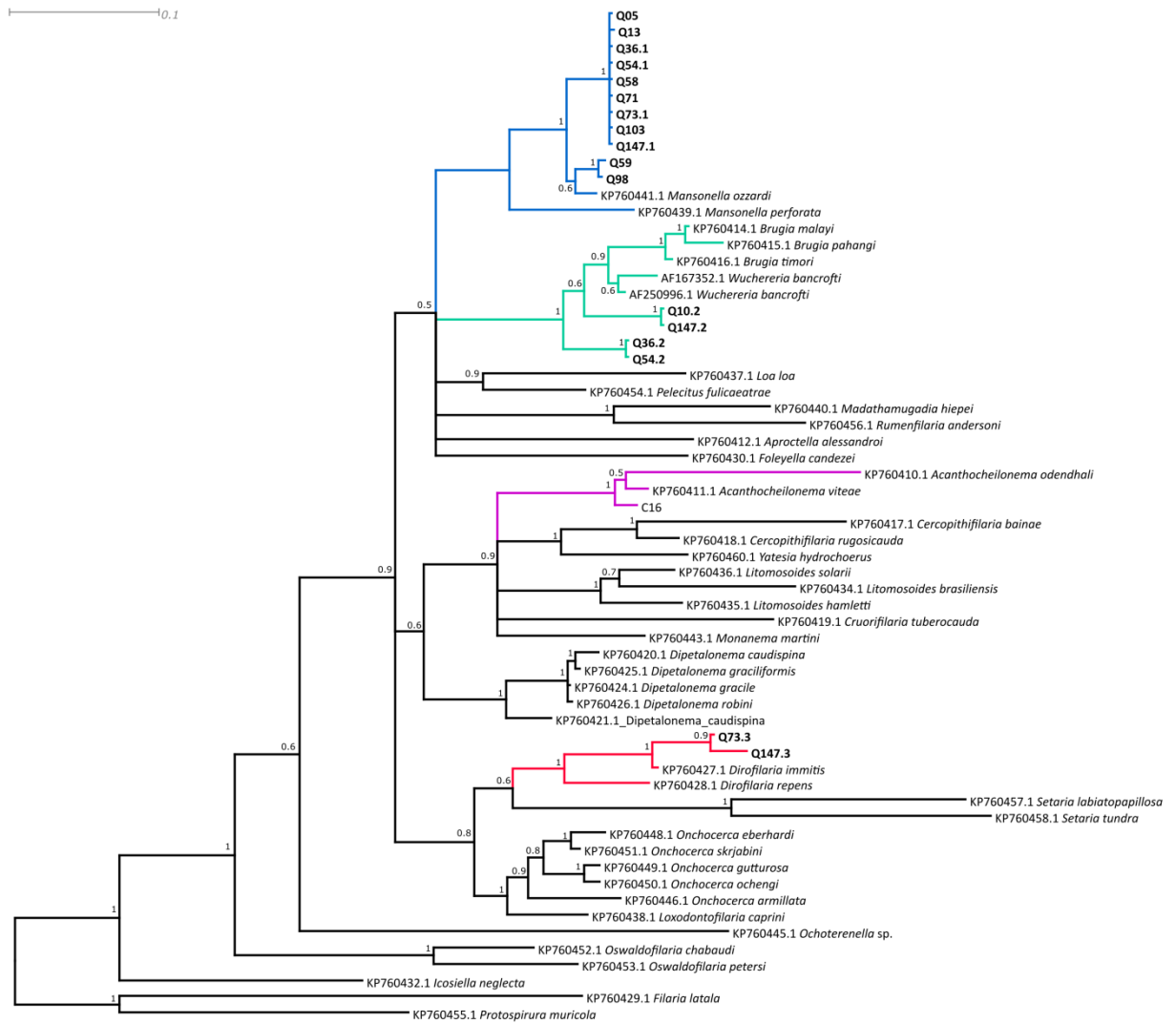


Figura 3. Árvore filogenética bayesiana de sequências de haplótipos do gene hsp70 de microfilárias presentes em amostras de sangue de quati (*Nasua nasua*) e de cães domésticos do entorno do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.

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

Haplótipos	pb	Espécies	Identidade	E-value*	Nº Acesso NCBI
Q10.1	534	<i>Mansonella ozzardi</i>	98,50%	0,0	KP760243.1
Q59	574	<i>Mansonella ozzardi</i>	98,26%	0,0	KP760243.1
Q98	523	<i>Mansonella ozzardi</i>	99,04%	0,0	KP760243.1
Q147.1	493	<i>Mansonella ozzardi</i>	98,58%	0,0	KP760243.1
Q10.2	579	<i>Brugia timori</i>	97,61%	0,0	KP760218.1
Q36.2	560	<i>Brugia timori</i>	98,74%	0,0	KP760218.1
Q147.3	522	<i>Dirofilaria immitis</i>	98,66%	0,0	KP760229.1
C16	512	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	99,02%	0,0	KP760213.1

*E-value é o valor do ruído referente à procura aleatória por sequências homólogas do banco de dados à sequência-alvo. Quanto mais próximo de zero este valor, maior é a significância do alinhamento entre as sequências.

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

Haplótipos	pb	Espécies	Identidade	E-value*	Nº Acesso NCBI
Q147.1	446	<i>Mansonella ozzardi</i>	92,61%	0,0	KP760441.1
Q59	383	<i>Mansonella ozzardi</i>	96,34%	3e-178	KP760441.1
Q98	386	<i>Mansonella ozzardi</i>	96,37%	6e-180	KP760441.1
Q147.2	490	<i>Brugia timori</i>	90,84%	0,0	KP760416.1
Q36.2	472	<i>Brugia pahangi</i>	92,00%	0,0	KP760415.1
Q147.3	351	<i>Dirofilaria immitis</i>	98,00%	1e-171	KP760427.1
C16	506	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	97,04%	0,0	KP760411.1

*E-value é o valor do ruído referente à procura aleatória por sequências homólogas do banco de dados à sequência-alvo. Quanto mais próximo de zero este valor, maior é a significância do alinhamento entre as sequências.

Os dados morfológicos das microfilárias são de grande importância para o diagnóstico das filarioses e foram associados aos resultados filogenéticos obtidos. Dessa forma, foi realizada a descrição morfológica (Figura 4) e morfométrica dos taxa identificados nesta pesquisa:

I. Mansonella sp. 1: microfilaria delgada e sem bainha. Corpo - o espaço cefálico possui dois anfídeos bem definidos nas laterais ou no centro do espaço cefálico. Gancho cefálico ausente. O corpo é totalmente preenchido por corpos celulares, com as estruturas anatômicas bem delimitadas, tendo o anel nervoso $27,1 \pm 4,6 \mu\text{m}$, poro excretor medindo $47 \pm 4,3 \mu\text{m}$ e poro anal $46,2 \pm 7,7 \mu\text{m}$. Cauda - a cauda afina

gradativamente em formato de gancho. Possui corpos celulares pequenos coalescidos que se dispõem em fileira única até a sua extremidade final. Comprimento total $233,4 \pm 27,2 \mu\text{m}$.

II. Mansonella sp. 2: microfilaria sem bainha. Corpo - espaço cefálico totalmente preenchido por corpos celulares. Gancho cefálico ausente. Corpos celulares coalescidos, porém com as estruturas anatômicas bem definidas, tendo o anel nervoso $55,3 \pm 16,3 \mu\text{m}$, poro excretor medindo $85,4 \pm 11,1 \mu\text{m}$ e poro anal $56,7 \pm 4,1 \mu\text{m}$. Cauda - afina abruptamente, não possui corpos celulares na sua extremidade. Comprimento total $276 \pm 13,1 \mu\text{m}$, largura de $5,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$.

III. Embainhada 1: Bainha - microfilaria embainhada em ambas as extremidades, a bainha anterior é mais curta e mede $13,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$, a bainha posterior termina de forma alongada e cônica e mede $28,7 \pm 4,1 \mu\text{m}$. Ausência de gancho cefálico. *Corpo:* é totalmente preenchido por pequenos corpos celulares coalescidos. O poro excretor mede $71,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$, o anel nervoso localiza-se no primeiro terço da porção anterior e mede $31,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Cauda - poro anal mede $38,9 \pm 1,9 \mu\text{m}$; possui oito corpos celulares no início da cauda, com um espaço anucleado e finalizando com um único corpo celular na sua extremidade; a cauda afina abruptamente na sua porção final. Comprimento total da microfilaria $208,8 \pm 12,8 \mu\text{m}$ e largura: $60,2 \pm 4,8 \mu\text{m}$.

IV. Embainhada 2: Bainha - microfilaria com bainha curta em ambas as extremidades, a bainha anterior mede $5,5 \pm 4,1 \mu\text{m}$ e a posterior $11,2 \pm 3,7 \mu\text{m}$. Corpo - o espaço cefálico possui um gancho e é desprovido de corpos celulares. O corpo é preenchido por inúmeros corpos celulares pequenos coalescidos. No terço inicial os corpos celulares estão dispostos em menor quantidade e espaçados, o que caracteriza um padrão de pintas a esta porção da microfilaria. O poro excretor mede $43,9 \pm 4,2 \mu\text{m}$, o anel nervoso não é visualizado. Cauda - possui oito corpos celulares enfileirados na cauda, com ausência de corpos celulares na extremidade final. O poro anal mede $38,1 \pm 2,8 \mu\text{m}$; a cauda afina suavemente na sua porção final. Comprimento total $216,4 \pm 6,5 \mu\text{m}$ e largura $60,8 \pm 5,5 \mu\text{m}$.

V. Acantocheilonema sp.: Bainha - microfilaria sem bainha. Corpo - o espaço cefálico é desprovido de corpos celulares. O corpo é preenchido por inúmeros corpos celulares pequenos coalescidos. O poro excretor mede $74,5 \pm 5,2 \mu\text{m}$, o anel

nervoso mede $25,5 \pm 3 \mu\text{m}$ é visualizado. Cauda - possui cinco corpos celulares enfileirados na cauda, com ausência de corpos celulares na extremidade final. O poro anal mede $52,2 \pm 12,6 \mu\text{m}$; a cauda afina em formato pontiagudo na sua porção final. Comprimento total $242,1 \pm 7,5 \mu\text{m}$ e largura $46,7 \pm 3,7 \mu\text{m}$.

Com relação à distribuição da infecção por filarídeos em quatis e cães domésticos do entorno do parque, os quatis que apresentaram infecção por *D. immitis* foram capturados na área de borda do Parque, enquanto as demais espécies identificadas apresentaram-se distribuídas igualmente tanto na borda quanto no interior do parque, principalmente na área turística aberta à visitação. Para os cães, foi observado que 88% dos casos de filariose foram diagnosticados na porção Norte do entorno do parque.

Nesta pesquisa não foi observada associação estatística entre a infecção por filarídeos e exames hematológicos e bioquímicos realizados nos animais.

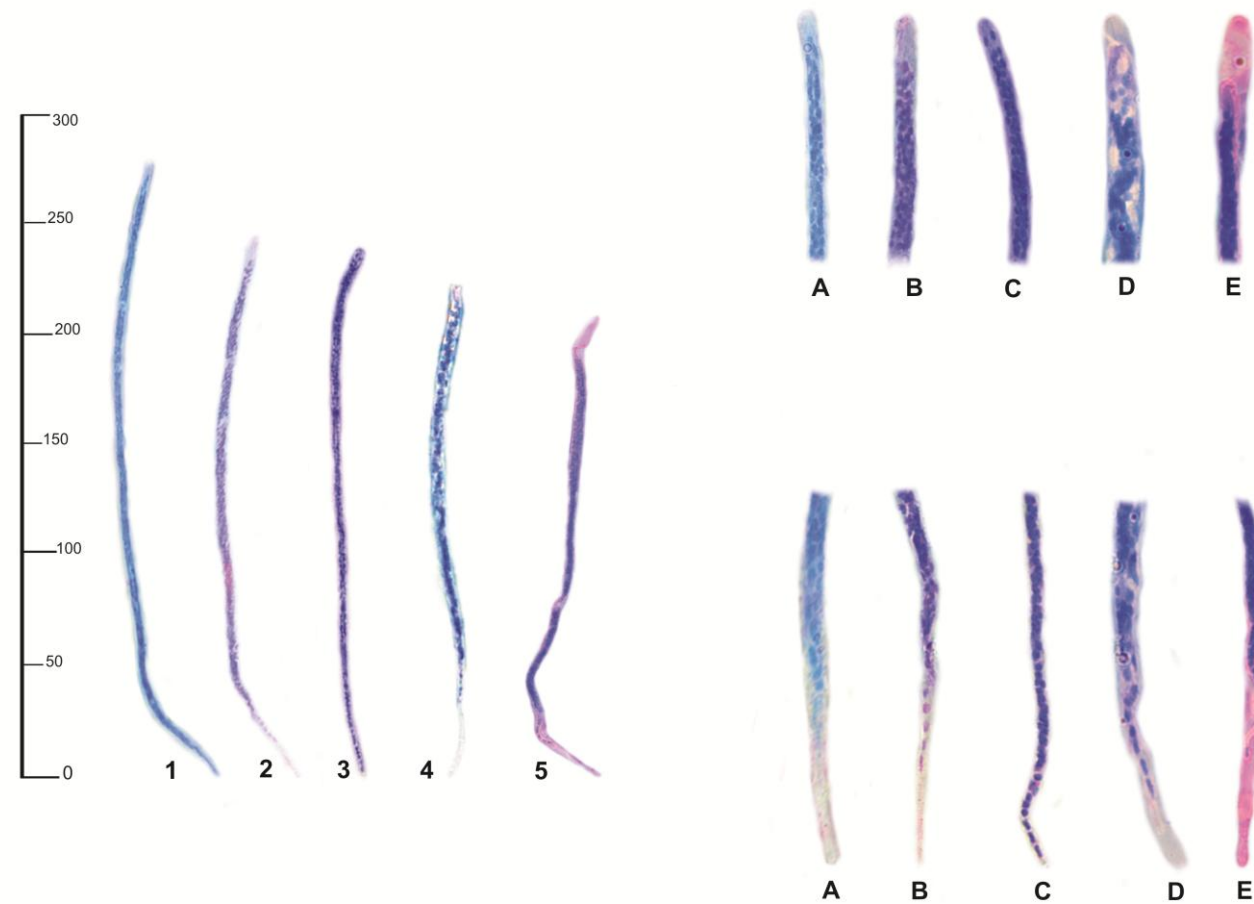


Figura 4. Morfologia das microfilárias detectadas no teste de Knott em amostras de sangue de quatis (*Nasua nasua*) e cães domésticos do entorno do PARNA Iguaçu e Iguazú. **1.** *Mansonella ozzardi*: A Anterior e posterior; **2.** *Acanthocheilonema* sp: B: Anterior e posterior; **3.** *Mansonella* sp – C: anterior e posterior; **4.** Gênero novo Embainhada 2 – D: Anterior e posterior ; **5.** Gênero novo Embainhada 1. – E: anterior e posterior. Microscopia de luz aumento 100x.

4. DISCUSSÃO

A análise de diversidade de espécies de filarídeos presentes nos quatis da Mata Atlântica do Parque Nacional do Iguaçu mostrou a ocorrência de cinco espécies de nematódeos filarídeos, enquanto cães domésticos apresentaram infecção por apenas uma espécie. Dos filarídeos diagnosticados, apenas *D. immitis* é descrita no Brasil, o que indica a ausência de dados e o pouco conhecimento sobre os Onchocercidae neotropicais. Nas regiões de clima temperado, grande parte dos filarídeos de carnívoros selvagens é conhecida e inclui *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *D. ursi*, *Dipetalonema arbuti*, *Onchocerca lupi*, *Acanthocheilonema reconditum* e *Acanthocheilonema dracunculoides* (MARCONCINI et al., 1996; OTRANTO; DEPLAZES, 2019).

Entretanto, para a região Neotropical, existem muitas lacunas de informação sobre a diversidade de espécies de oncocercídeos ante a grande possibilidade de hospedeiros disponíveis e variedade de Biomas que ocorrem em seu território. É sabido que, evolutivamente, o isolamento e as trocas de organismos entre os continentes ao longo do Período Terciário foram de grande importância para o estabelecimento desse grupo de nematódeos na América do Sul, uma vez que este continente passou a maior parte desse período geológico isolado dos demais continentes (KLEIN; RAJAN, 2002). Durante esse período ocorreu a principal diversificação dos Onchocercidae, devido ao aparecimento e radiação das aves e mamíferos, que se tornaram novos nichos de hospedeiros para esse grupo de parasitas (BAIN, 2002).

Na América do Sul, a linhagem *Dipetalonema* é a mais ancestral e sofreu estágios adaptativos sucessivos. Primeiramente, era representada apenas por espécies parasitas de marsupiais e xenartros. Posteriormente, alguns gêneros da linhagem foram se especializando e apresentaram altas afinidades com os roedores caviomorfos e os macacos platirríneos (BAIN; BAKER; CHABAUD, 1982). Outro fato importante em relação à diversidade de filarídeos Neotropicais foi a união das Américas após a formação do istmo do Panamá, que favoreceu um influxo de mamíferos do Neoártico para a região, trazendo consigo nova fauna filarial, como, por exemplo, os parasitas dos gêneros *Brugia*, *Litomosoides* e *Cercopithifilaria* (BAIN, 2002).

O entendimento do processo de diversificação dos Onchocercidae na região Neotropical é primordial para a compreensão da elevada riqueza de filarídeos observada neste estudo. Os nematódeos Onchocercidae podem ser divididos em cinco clados distintos. O Clado 1, composto por espécies basais parasitas de anfíbios e répteis; o Clado 2, composto por representantes da subfamília Setariinae; o Clado 3, formado por representantes ancestrais dos Dirofilarinae e Onchocercinae; o Clado 4, constituído pela linhagem *Dipetalonema*; e o Clado 5, composto por representantes mais derivados das subfamílias Dirofilarinae, Onchocercinae e Splendidofilarinae e agrupa os principais gêneros parasitas de humanos (LEFOULON et al., 2015). Nos quatis do PARNA Iguaçu foi possível observar que os filarídeos identificados pertencem aos Clados 3 e 5, enquanto a espécie diagnosticada nos cães domésticos pertence ao Clado 4. Das cinco espécies diagnosticadas nos quatis quatro pertencem ao clado 5, o que indica que os filarídeos que infectam os quatis, na região neotropical são constituídos primordialmente por espécies mais recentes e derivadas.

Para a população de quatis estudada, *Mansonella* sp. foi o gênero predominante, e pela proximidade filogenética e agrupamento junto a *M. ozzardi*, pode-se sugerir que as duas espécies identificadas nos quatis possam ser uma subespécie ou estar inserida num complexo da espécie *M. ozzardi*. O gênero *Mansonella* é diverso e possui como hospedeiros primatas, carnívoros, sciurídeos, tupaídeos e ungulados, além de seres humanos, principalmente na África e na América do Sul (ANDERSON, 2000). As espécies válidas de *Mansonella* são classificadas em sete subgêneros: *Filyamagutia*, *Pseudolitomosa*, *Tupainema*, *Cutifilaria*, *Mansonella*, *Tetrapetalonema* e *Esslingeria* (UNI; BAIN; TAKAOKA, 2004). *Mansonella* (*Tupainema*) é um subgênero monoespecífico e parasita apenas tupaídeos. O subgênero *Mansonella* é parasita de carnívoros da região holártica e de sciurídeos e humanos na América do Sul. *Mansonella* (*Tetrapetalonema*) é um subgênero exclusivo de macacos platirrinos da América do Sul. O subgênero *Mansonella* (*Esslingeria*) é encontrado em macacos antropóides e humanos na África, e roedores caviomorfos na América do Sul. *Mansonella* (*Cutifilaria*) é descrito em cervídeos na Europa e na Ásia, *Mansonella* (*Filyamagutia*) é um subgênero recente, com descrição de uma única espécie parasitando Ursidae no Japão, e, por

último, o subgênero *Mansonella* (*Pseudolitomosa*) parasitando sciurídeos também no Japão (BAIN et al., 2015).

A morfologia das microfilárias do gênero *Mansonella*, particularmente o arranjo dos corpos celulares na cauda, tem sido usada para delineamento desses subgêneros (EBERHARD; ORIHEL, 1984). Entretanto, pelas características morfológicas observadas nas microfilárias das espécies de *Mansonella* predominantes, não é possível inferir a qual subgênero ela pertence, uma vez que as microfilárias das espécies descritas parasitando carnívoros em outras regiões não possuem corpos celulares até a extremidade da cauda, e esta é uma das características marcantes da microfilária de *Mansonella* sp. encontrada nos quatis. A cauda com corpos celulares até a extremidade é descrita nos subgêneros *M. (Cutifilaria)*, *M. (Esslingeria)* e *M. (Tetrapetalonema)*, porém estes subgêneros nunca foram relacionados a hospedeiros da Ordem Carnivora. Com relação às características morfológicas da *Mansonella* sp. 2, é possível afirmar que ela pertence ao subgênero *Mansonella*.

As características morfológicas das microfilárias associadas ao diagnóstico molecular realizado neste estudo demonstraram também a existência de dois novos gêneros de filarídeos, cujas microfilárias apresentam bainha. A bainha ocorre em algumas espécies que possuem como característica derivada a retenção da membrana quitinosa do ovo, mesmo após a extrusão da microfilária no útero gravídico da fêmea adulta (MCLAREN, 1972). Nestas espécies é a bainha e não a cutícula da microfilária que faz a interface parasita-hospedeiro, e por isso sua presença está relacionada com a evasão da resposta imune do hospedeiro, pois a composição da bainha a torna impermeável a proteínas grandes, como os anticorpos (ZAHNER et al., 1995). O fenótipo das embainhadas 2 identificado molecularmente nos quatis possui um gancho cefálico. Essa estrutura é comum a algumas espécies do gênero *Brugia*, *Wuchereria* e *Loa* e é utilizada pela microfilária na penetração dos tecidos durante a migração e maturação no hospedeiro intermediário. Após ingestão da microfilaria pelo hospedeiro intermediário, o gancho movimenta-se ativamente durante o período de migração entre o estômago e o tórax (LAURENCE; SIMPSON, 1968). Essas estruturas cefálicas, quando evertidas, giram

em torno do eixo de cada lábio da microfilária e ao fazê-lo tornam possível que a microfilária corte qualquer tecido à sua frente (ESSLINGER, 1962).

Outra observação relevante quanto aos gêneros encontrados neste estudo, cujas microfilárias são embainhadas, é que estes estão agrupados filogeneticamente próximos a *Wuchereria bancrofti*, *Brugia timori*, *B. malayi* e *B. pahangi*, sendo estas espécies conhecidas por causarem as filariose linfáticas humanas. Este achado pode sugerir que estas novas espécies também tenham como hábitat o sistema linfático de seus hospedeiros e que, pelas características evolutivas do clado ao qual pertencem e proximidade genética com espécies parasitas de humanos, também possam ter potencial zoonótico. Os filarídeos zoonóticos evoluíram num contexto de 60 milhões de anos e são um grupo heterogêneo dentro da família Onchocercidae, que resultaram de dois processos evolutivos distintos: alguns parasitas de humanos evoluíram dos primatas e/ou os seres humanos foram infectados por filárias, que são fundamentalmente parasitas de um grupo hospedeiro zologicamente não relacionado (KLEIN; RAJAN, 2002).

A origem diversa das filariose humanas demonstra a plasticidade destes nematódeos. Seus hospedeiros animais são diversos: carnívoros para as dirofilariose (NOZAI; BAIN; GENTILINI, 1995); ungulados como bovinos, cavalos e javalis para as onchocercose (UNI et al., 2001; TAKAOKA et al., 2001); e macacos africanos para *Mansonella rodhaini* (cf (RICHARD-LENOBLE et al., 1988) e *Meningonema perruzzi* (cf (BOUSSINESQ et al., 1995)). Em áreas florestais, os reservatórios animais não são totalmente identificados e a ocorrência de outras espécies zoonóticas é imprevisível (BAIN, 2002). É importante ressaltar que, nos últimos 50 anos, muitas espécies de nematódeos filarídeos tornaram-se conhecidas mundialmente como patógenos emergentes de humanos (PAMPIGLIONE et al., 1995, 2001; MCCALL et al., 2008; SIMON, 2012), com um aumento do número de casos ocorrendo em áreas não-endêmicas (OTRANTO et al., 2012; GENCHI et al., 2011).

Em relação a *D. immitis* diagnosticada nos quatis, além de ser uma zoonose emergente com distribuição mundial (OTRANTO et al., 2017), reflete outro aspecto importante em relação aos nematódeos filarídeos, que é o intercâmbio de *D. immitis* entre cães domésticos e populações de carnívoros selvagens. *Dirofilaria immitis* é

um parasita comum de canídeos, mas ocasionalmente tem sido isolado de outros hospedeiros (ORIHIEL; EBERHARD, 1998). Os carnívoros selvagens são suscetíveis, e geralmente as infecções ocorrem mais frequentemente como um reflexo da infecção de cães domésticos, particularmente em territórios sobrepostos (OTRANTO et al., 2015). Entretanto, carnívoros microfilarêmicos infectados também podem, na presença de espécies vetoras competentes, atuar como hospedeiros reservatórios (IONICA et al., 2017). Nesta pesquisa, nenhum cão avaliado foi diagnosticado com *D. immitis*, porém a circulação desta espécie na população de carnívoros selvagens do PARNA Iguaçu pode ser reflexo do intercâmbio de parasitas ocorrido, em épocas passadas, entre esses dois hospedeiros, como já foi demonstrado para outros helmintos nesta mesma população (MORAES et al., 2017).

A distribuição da infecção por filarídeos nos cães domésticos no entorno do PARNA Iguaçu concentrou-se na região norte do Parque. Nesta porção, a alteração da paisagem de Floresta Ombrófila Mista para Floresta Estacional Semidecídua é visível, com altitude média de 750 m (SOUZA et al., 2017). Esta porção norte corresponde à área de maior altitude e interiorização do PARNA Iguaçu no continente (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000) e há predomínio de *Araucaria angustifolia* nos vales dos maiores rios desta região, mantendo menores temperaturas e maior umidade ambiental por um maior período ao longo do dia (FERREIRA, 1999). A paisagem do entorno desta área é constituída em sua maioria por agropecuária, pois a declividade do solo nesta área não favorece a manutenção de grandes monoculturas de grãos. A topografia irregular, distúrbios antrópicos e a alteração da vegetação são incriminados como fatores que podem favorecer a manutenção de espécies vetoras e conseqüentemente o ciclo de enfermidades que são transmitidas por vetores. Para enfermidades como as filarioses que tem dípteros como vetores, é esperado que as prevalências sejam mais elevadas em altitudes mais baixas, onde as temperaturas mais quentes favorecem tanto a sobrevivência do mosquito quanto o desenvolvimento do parasita no seu vetor (BENDAS et al., 2017), fato não observado nos resultados desta pesquisa.

Entretanto, a espécie de filarídeo identificada nos cães do entorno do PARNA Iguaçu pertence ao gênero *Acanthocheilonema*, que tem como hospedeiros intermediários carrapatos, pulgas e piolhos (OTRANTO et al., 2013). No PARNA

Iguaçu, em vida livre foram identificadas seis espécies de carrapatos em ambas as porções do parque (Norte e Sudoeste), *Amblyomma brasiliense*, *A. coelebs*, *A. incisum*, *A. ovale*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes aragaoi*. Nesta comunidade de carrapatos foi observado um padrão temporal, com possível ciclo de vida anual para a maioria espécies identificadas, o que significa constância de prevalência de carrapatos, independentemente da estação do ano, na área estudada (SUZIN, 2018). Este fato pode sugerir que o comportamento dos carrapatos no PARNA Iguaçu favoreça a manutenção de uma população abundante de vetores para esse parasita no entorno do parque e assim, apesar de os fatores ambientais e climáticos não serem tão favoráveis, é possível manter a prevalência da infecção por filarídeos nos cães domésticos.

5. CONCLUSÃO

O sequenciamento parcial dos genes codificadores das proteínas miosina e hsp70 foi eficiente na identificação de gêneros e espécies de filarídeos presentes na população de carnívoros estudada. Por meio dessas análises, cinco espécies de filarídeos foram identificadas em quatis presentes no PARNA Iguaçu e sugere-se que algumas destas espécies diagnosticadas possam ter potencial zoonótico e, portanto, torna-se necessária a realização continuada de inquéritos epidemiológicos em animais selvagens, domésticos e seres humanos na região estudada.

Esta é a primeira pesquisa realizada visando o estudo filogenético de filarídeos de carnívoros selvagens brasileiros. Todas as espécies identificadas nesta pesquisa são novos registros nos hospedeiros estudados e na localização geográfica, sendo, portanto, este trabalho um marco inicial para a ampliação dos estudos moleculares de filarídeos de ocorrência na Região Neotropical.

6. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R.C. Family Onchocercidae. In: **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission**. 2nd Edition. CABI Publishing: Wallingford, England. 2000. pp. 472-532.
- BAG, S.; SAHA, B.; MEHTA, O.; ANBUMANI, D.; KUMAR, N.; DAYAL, M. et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**, v. 6, 26775, 2016.
- BAIN, O.; BAKER, M.; CHABAUD, A.G. Nouvelles donnees sur la lignee *Dipetalonema*(Filarioidea, Nematoda). **Annales de Parasitologie**. t. 57, n° 6, pp. 593-620, 1982.
- BAIN, O. Evolutionary relationships among filarial nematodes. In: KLEIN, T.R.; RAJAN, T.V. **World Class Parasites: Volume 5, The Filaria**. Kluwer 17 Academic Publishers. 182 p., 2002.
- BAIN, O.; MUTAFCHIEV, Y.; JUNKER, K.; GUERRERO, R.; MARTIN, C. Review of the genus *Mansonella* Faust, 1929 sensu lato (Nematoda: Onchocercidae), with descriptions of a new subgenus and a new subspecies. **Zootaxa**, 3918: 151–193, 2015.
- BAIN, O.; MOISSON, P.; HUERRE, M.; LANDSOD-SOUKATE, J.; TUTIN, C.; TCHÉPRAKOFF, R. Filariae from a wild gorilla in Gabon with description of a new species of *Mansonella*. **Parasite**, 2(3), 315–322, 1995. Disponível em: <doi:10.1051/parasite/1995023315>
- BENDAS, A. J. R.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; GUERRERO, J.; LABARTHE, N. Update on *Dirofilaria immitis* epidemiology in South America and Mexico: literature review. Brazilian **Journal of Veterinay and Research and Animal Science**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 319-329, 2017.
- BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172– 4177, 2003.

BOUSSINESQ, M.; BAIN, O.; CHABAUD, A. G.; GARDON-WENDAL, N.; KAMGNO, J.; CHIPPAUX, J. P. A new filariid zoonosis of the cerebrospinal fluid of a man probably caused by *Meningonema peruzzi*, a parasite of the central nervous system of Cercopithecidae. **Parasite**, 2, 173–176, 1995.

CASIRAGHI ; M., BAIN, O., GUERRERO, R., MARTIN, C., POCACQUA, V. Mapping the presence of Wolbachia pipientis on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. **International Journal of Parasitology**, 34: 191–203, 2004.

CONGA, D.F.; MAYOR, P.; FURTADO, A.P.; GIESE, E.G.; SANTOS, J.N. Co-infection with filarial nematodes in *Sapajus macrocephalus* and *Cebus albifrons* (Primates: Cebidae) from the Peruvian Amazon. **Journal of Helminthology**, 1–4.2018, 2018.

EBERHARD, M.L.; ORIHEL, T.C. The genus *Mansonella* (Syn. *Tetrapetalonema*). A new classification. **Annals of Parasitology Human Comparator**, 59: 483–496, 1984.

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

ESSLINGER, J. H. Behaviour of microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 11, 749–758, 1962.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-94, 1998.

FERREIRA, L. M. **Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu: Encarte 5, com Vistas à Revisão do Plano de Manejo**. Brasília: IBAMA; FUPEF, 1999.

GENCHI, C.; KRAMER, L.H.; RIVASI, F. *Dirofilaria* infections in Europe Vector Borne. **Zoonotic Diseases**, 11, p. 1307-1317, 2011.

GORDON, C. A.; MCMANUS, D. P.; JONES, M. K.; GRAY, D. J.; GOBERT, G. N. The increase of exotic zoonotic helminth infections: the impact of urbanization, climate change and globalization. **Advances in Parasitology**, 91, 311–397, 2016.

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

GREEN P. PHRAD documentation; 1996. Disponível em: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>.RADocumentation.

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

IONICA, I.A.; MATEI, G.; D'AMICO, L.V.; BEL, M.O.; DUMITRACHE, D.;MODRY, A. D.; MIHALCA. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. **Parasites & Vectors**, 10, p. 116, 2017.

KLEIN, T.R.; RAJAN, T.V. **World Class Parasites**: Volume 5, The Filaria. Kluwer 17 Academic Publishers. 182 p. 2002.

KROPF, M. S.; BRITO, V.C. **Diagnóstico Socioeconômico do Parque Nacional do Iguaçu** (PNI) –Brasil. 2017. 199 p.

LAURENCE, B. R.; SIMPSON, M. G. Cephalic and pharyngeal structures in microfilariae revealed by staining. **Journal of Helminthology**, 42, 309–30. 1968.

LEFOULON, E.; BAIN, O.; BOURRET, J.; JUNKER, K.; GUERRERO, R.; CAÑIZALES I.; KUZMIN, Y.; SATOTO, T.B.; CARDENAS-CALLIRGOS, J.M.; DE SOUZA LIMA, S.; RACCURT, C.; MUTAFCHIEV, Y.; GAVOTTE, L.; MARTIN, C. Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. **PLoS Neglected**, 9(11), 2015.

MARCONCINI, A.; MAGI, M.; MACCHIONI, G.; SASSETTI, M. Filariasis in foxes in Italy. **Veterinary Research Communications**; 20:316–319, 1996.

MAGNIS, J.; LORENTZ, S.; GUARDONE, L.; GRIMM, F.; MAGI, M.; NAUCKE, T.J.; DEPLAZES, P. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 48, 2013.

MCCALL, J.W.; GENCHI, C.; KRAMER, L.H.; GUERRERO, J.; VENCO, L. Heartworm disease in animals and humans. **Advances in Parasitology**, 66, 193–285. 2008.

MCLAREN D.J. Ultrastructural studies on microfilariae (Nematoda: Filariodea). **Parasitology**. 1972.

MORAES, M. F. D.; DA SILVA, M. X.; MAGALHÃES-MATOS, P. C.; DE ALBUQUERQUE, A. C. A.; TEBALDI, J. H.; MATHIAS, L. A.; LUX HOPPE, E. G. . Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguaçu National Park, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 1-9, 2017.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a Dog Filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **Journal of Parasitology**, 42:246-256, 1956.

NOZAIS J. P.; BAIN O.; GENTILINI M. Un cas de Dirofilariose sous-cutanée à *Dirofilaria (Noctiella) repens* avec microfilarémie en provenance de Corse. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, 87, 183–185, 1995.

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

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forest in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, Zurich, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.

ORIHIEL, T.C.; EBERHARD, M.L. Zoonotic filariasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 366–381, 1998.

OTRANTO, D.; CANTACESSI, C.; PFEFFER, M.; DANTAS-TORRES, F.; BRIANTI, E.; DEPLAZES, P.; GENCHI, C.; GUBERTI, V.; CAPELLI, G. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: helminths and arthropods. **Veterinary Parasitology**, 213, 24-37, 2015.

OTRANTO, D.; DEPLAZES, P. Zoonotic nematodes of wild carnivores. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, volume 9, 370 – 383, 2019.

OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, PAPADOPOULOS E, PETRIĆ D, ČUPINA AI, BAIN O: Tracking the vector of *Onchocerca lupi* in a rural area of Greece. **Emerging Infectious Diseases**, 18: 1196-1200, 2012.

OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., MIHALCA, A., TRAUB, R.J., LAPPIN, M., BANETH, G. Zoonotic parasites of sheltered and stray dogs in the era of the global crisis. **Trends on Parasitology**, 33, 813–825, 2017.

OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., BRIANTI, E., TRAVERSA, D., PETRIĆ, D., GENCHI, C., CAPELLI, G. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. **Parasites & Vectors**, 6, 16, 2013.

PAMPIGLIONE, S.; CANESTRI, T.G.; RIVASI, F. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria immitis* (Nochtiella) repens: a review of world literature. **Parasitologia**. 37:149–93, 1995.

PAMPIGLIONE, S. RIVASI, F.; ANGELI, G.; BOLDORINI, R.; INCENSATI, R. M.; 16 PASTORMERLO, M.; PAVESI, M.; RAMPONI, A. *Dirofilaria immitis* 17 in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. **Histopathology**, v.38, p.344-354. 18, 2001.

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

RAMZY, R.M. Recent advances in molecular diagnostic techniques for human lymphatic filariasis and their use in epidemiological research. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96 (Suppl. 1): 225-229. 2002.

RICHARD-LENOBLE, D.; KOMBILA, M.; BAIN, O.; CHANDENIER, J.; MARIOTTE, O. Filariasis in Gabon: human infections with *Microfilaria rodhaini*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 39, 91–92. 1988.

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

ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS SE, SÁNCHEZ-GRACIA A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular, Biology and Evolution**, 1;34(12): 3299-3302, 2017.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3 ed. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2010. 264 p.

SILVA, M.X.; PAVIOLO, A.; TAMBOSI, L.R. & PARDINI, R. Effectiveness of protected areas for biodiversity conservation: mammal occupancy patterns in the Iguaçu National Park, Brazil. **Journal for Nature Conservation**, 41: 51-62, 2018.

SIMON, F. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 507–544, 2012.

SIQUEIRA, A.L.; TIBÚRCIO, J.D. **Estatística na área da saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional**. Coopmed, 2011. 520 p

SOUZA, R. F. de; MACHADO, S. A.; GALVAO, F.; FIGUEIREDO FILHO, A. FITOSSOCIOLOGIA DA VEGETAÇÃO ARBÓREA DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU. **Ciência Florestal** [online], vol.27, n.3, pp.853-869, 2017.

SUZIN, A. **Aspectos ecológicos de carrapatos (Acari: Ixodidae) no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2018.

SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**, Version 4.0 Beta 10. Sinauer Associates, Sunderland. 2002.

TAKAOKA H., BAIN O., UNI S., KORENAGA M., TADA K., ICHIKAWA H., OTSUKA Y., ESHITA Y. Human infection with an *Onchocerca dewittei japonica*, a parasite from wild boar in Oita, Japan. **Parasite**, 8, 261–263, 2001.

UNI. S.; BAIN, O.; TAKAOKA, H. Affinities between *Cutifilaria* (Nematoda: Filarioidea), parasites of deer, and *Mansonella* as seen in a new onchocercid, *M. (C.) perforata* n. sp., from Japan. **Parasite**, 11, 131–140, 2004.

UNI, S.; BAIN, O.; TAKAOKA, H.; MIYASHITA, M.; SUZUKI, Y. *Onchocerca dewittei japonica* n. subsp., a common parasite from wild boar in Kyushu Island, Japan. **parasite**, 8, 215–222, 2001.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematódeos do 27 Brasil. Parte V: Nematóides de Mamíferos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.14, n.1, p.1-152, 1997.

VIEIRA, F.M.; LUQUE, J.L.; MUNIZ-PEREIRA, L.C. Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. **Zootaxa**, v. 1721, p. 1–23, 2008.

XIE, H.; BAIN, O.; WILLIAMS, S. A. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. **Parasite**, v. 1, p. 141-151, 1994.

ZAHNER, H.; HOBOM, G.; STIRM, S. The microfilarial sheath and its proteins, **Parasitology Today**, 11, 3 (116), 1995.

CAPÍTULO III *Leishmania infantum* E *Trypanosoma cruzi* NA MATA ATLÂNTICA: RESERVATÓRIOS SELVAGENS E DOMÉSTICOS NA TRÍPLICE FRONTEIRA BRASIL-ARGENTINA-PARAGUAI

1. INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastida) inclui um grupo de protozoários de grande importância em saúde animal e saúde humana (STEVENS et al., 2001). Dos oito gêneros conhecidos dessa família, os de maior relevância são *Leishmania*, responsável pelas diversas formas clínicas da leishmaniose tegumentar e visceral, e o gênero *Trypanosoma*, que tem *Trypanosoma cruzi* como principal espécie de interesse em saúde humana, como agente etiológico da doença de Chagas, e *T. evansi* e *T. vivax* como parasitas de importância para a Medicina Veterinária na América (SILVA et al., 2002).

A leishmaniose visceral encontra-se distribuída mundialmente, principalmente nos Países Mediterrâneos, na Américas Central e do Sul, na África Oriental e em algumas regiões Asiáticas. Já é endêmica em 89 países, tendo 350 milhões de pessoas em risco, 12 milhões de pacientes em tratamento e 400 mil novos casos por ano (ALVAR et al., 2012). É uma enfermidade que representa preocupação sanitária tanto pela sua expansão geográfica como pela tendência de urbanização. No Brasil a doença avança e encontra-se disseminada na periferia das grandes cidades do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (SOUZA et al., 2010). São descritas aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* dentro dos cinco subgêneros e complexos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *Complexo enrietti* e *Paraleishmania*, sem considerar as sinonímias. Destas espécies, 31 são descritas parasitando mamíferos e 20 como patogênicas para seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016). Sua transmissão ocorre por meio de dípteros do gênero *Lutzomyia* no Novo mundo e pelo *Phlebotomus* no velho continente (MAROLI et al., 2013).

No Estado do Paraná, o vetor da leishmaniose visceral foi descrito pela primeira vez em 2012, em Foz do Iguaçu (SANTOS et al., 2012). Os casos caninos autóctones já demonstravam a expansão rápida do agente (BISETTO-JUNIOR et al.,

2014). O primeiro caso humano no estado do Paraná foi relatado em 2015. Apesar dos esforços do governo municipal e de agências estaduais de saúde, não foi possível conter a propagação do vetor e a dispersão do agente entre cães e humanos, levando a duas mortes em apenas dois anos na cidade de Foz do Iguaçu (SESA, 2016)

Outro parasita de importância dentro da família Trypanosomatidae é *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelo contato com fezes de triatomíneos infectados na pele e/ou membranas mucosas em solução de continuidade (RASSI et al., 2010) ou por via alimentar, pela ingestão acidental de triatomíneos junto com alimentos como açaí e caldo de cana (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; MAGALHÃES-SANTOS, 2014) e carne de caça (DIAS, 2006; COURA, 2015), enquanto a transmissão de *T. evansi* e *T. vivax* ocorre por meio da picada de vetores das famílias Tabanidae e Stomoxyidae (SILVA et al., 2002), além de fômites.

Atualmente, *T. cruzi* é encontrado circulando na natureza entre mais de uma centena de espécies de hospedeiros mamíferos representando sete diferentes ordens e entre dezenas de espécies de vetores (NOIREAU et al., 2009). Para *T. evansi* e *T. vivax*, os principais hospedeiros domésticos são bovinos, equinos e cães, enquanto os reservatórios silvestres variam de acordo com a espécie de *Trypanosoma*, sendo para *T. evansi* os carnívoros selvagens, capivaras e morcegos hematófagos, e os cervídeos para *T. vivax* (SILVA et al., 2002).

Dessa forma, devido à importância para o cenário da saúde pública atual, esta pesquisa visou o estudo de parasitas zoonóticos da família Trypanosomatidae em mamíferos selvagens e cães domésticos no PARNA Iguaçu, que é uma área-chave para a conservação da Mata Atlântica do sul brasileiro e que está inserido no município onde foi identificado o primeiro relato autóctone de leishmaniose visceral americana em cães e humanos no estado do Paraná.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

A região de estudo localiza-se no Parque Nacional do Iguaçu, que é o único fragmento de mata atlântica de interior brasileira (Floresta Ombrófila Mista) com

mais de 185 mil ha, que mantêm seus processos ecológicos, e sua diversidade de espécies proporcionada pela existência de um mosaico de ambientes (SOUZA, 2017). O Parque Nacional do Iguaçu localiza-se na região Sul do País, no oeste do Estado do Paraná, e possui área total de 185.265 ha, com 420 km de perímetro (IBAMA, 2000) (Figura 1)

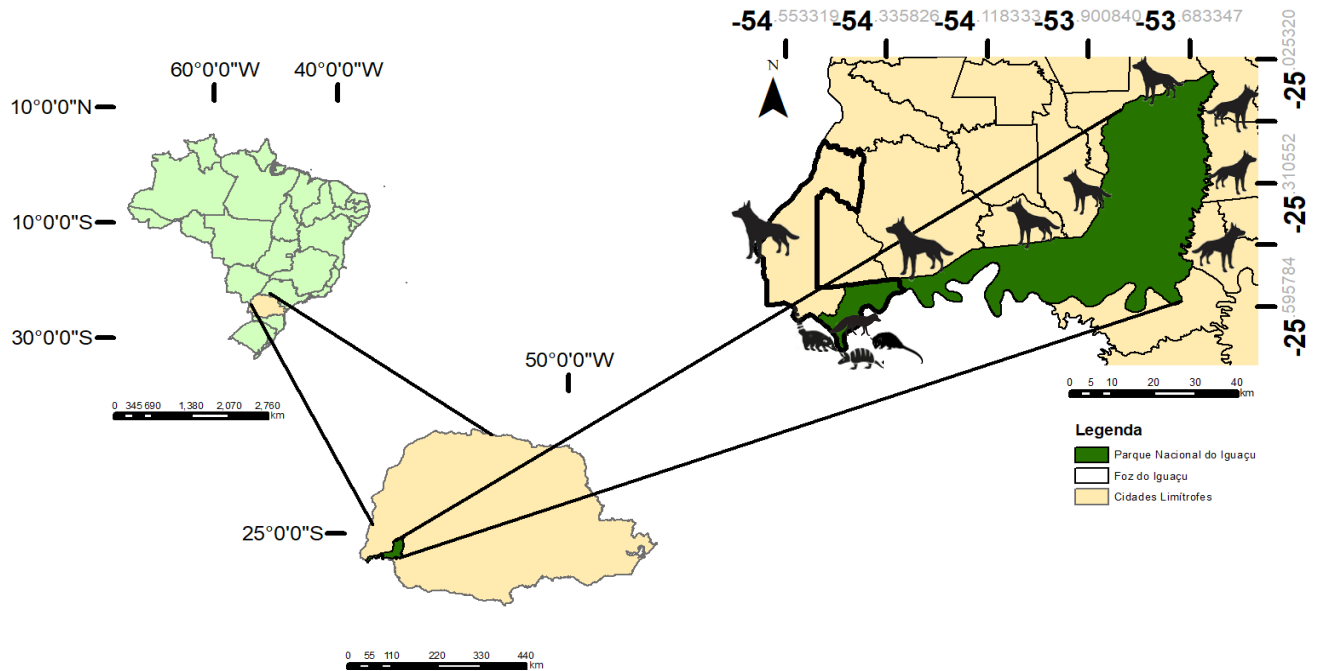


Figura 1. Localização geográfica do PARNA Iguaçu. Os ícones representam os locais de coleta de cães domésticos e de mamíferos selvagens.

2.2. Captura dos animais

Foram capturados 251 mamíferos por meio de 17 armadilhas Tomahawk, 05 armadilhas Sherman e puçás, no período entre 2014 e 2019. Os animais foram sedados com a associação comercial de zolazepam e tiletamina 5 mg/kg, intramuscular, para avaliação física, biometria e coleta de amostras. Cada animal foi identificado com um brinco numerado, para evitar recapturas. Foram colhidos 10 ml de sangue após venopunção da jugular em tubos com e sem EDTA. A idade dos animais foi estimada de acordo com Olifiers et al. (2010). A identificação de roedores

foi realizada no Museu Nacional/UFRJ. Além disso, foram coletadas amostras de baço e fígado de 33 mamíferos oriundos de atropelamento na BR 469, no interior do PARNA Iguaçu (Tabela 1).

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

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA	Capturas	Cadáveres	TIPO DE AMOSTRA
Carnívora			
<i>Cerdocyon thous</i>	--	04	Baço e fígado
<i>Nasua nasua</i>	157	17	Sangue total/baço e figado
<i>Leopardus pardalis</i>	01	--	Sangue total
<i>Leopardus guttulus</i>	01	02	Sangue total/baço e figado
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	01	--	Sangue total
<i>Panthera onca</i>	01	--	Sangue total
<i>Puma concolor</i>	01	--	Sangue total
Total	162	23	
Rodentia			
<i>Dasyprocta azarae</i>	03	03	Sangue total/baço e figado
<i>Myocastor coypus</i>	--	01	Baço e fígado
<i>Akodon sp.</i>	15	--	Sangue total
<i>Euryzomys</i>	04	--	Sangue total
Total	22	04	
Didelphimorfia			
<i>Didelphis aurita</i>	38	03	Sangue total/baço e figado
<i>D. albiventris</i>	15	--	Sangue total
<i>Caluromys lanatus</i>	01	--	Sangue total
<i>Philander frenatus</i>	06	--	Sangue total
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	07	--	Sangue total
Total	67	03	
Cingulata			
<i>Dasyus novemcinctus</i>	--	02	Baço e fígado
Total		02	
Pilosa			
<i>Tamandua tetradactyla</i>	--	01	Baço e fígado
Total	--	01	

A amostragem de cães domésticos foi dividida nas áreas rural e urbana. A área rural do entorno do Parque foi estabelecida em um raio de até 1 km de distância entre as propriedades rurais e o limite do PARNA Iguaçu; além disso, capturas ocasionais de cães domésticos também ocorreram no interior do parque. Foram visitadas 64 propriedades rurais em oito municípios limítrofes ao Parque: Foz

do Iguaçu, Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu, Matelândia, Céu Azul, Santa Tereza do Oeste, Lindoeste e Capitão Leônidas Marques, o que resultou na amostragem de 141 cães na área rural, além de quatro cães capturados no interior do parque. A amostragem de cães da área urbana foi realizada em um abrigo particular no município de Foz do Iguaçu. Após autorização dos proprietários, os cães foram contidos fisicamente para exames físicos e coleta de amostras sanguíneas por punção da veia cefálica. No abrigo de cães, foram avaliados 81 animais, totalizando a amostragem da pesquisa em 226 cães domésticos.

2.3. Captura de triatomíneos

Foram realizadas quatro campanhas de captura utilizando armadilhas do tipo luminosa (BERENGER et al., 2009). Em cada local escolhido foram instaladas duas armadilhas, dependendo do tamanho do ecótopo, por o período de uma noite.

Foram coletados seis insetos pertencentes à família Reduviidae, sendo dois *Brontostoma colossus*, um *Harpactor sp.*, dois *Stenopoda sp.* e um *Apiomerus sp.* As espécimes de reduviidae coletadas foram mantidas em tubo falcon de 50 mL contendo álcool etílico absoluto e foram encaminhados para o Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, em Araraquara, SP, Brasil, onde foram identificados em nível de gênero por meio de chaves taxonômicas propostas por Lent & Wygodzinsky (1979) e Galvão (2014) e estão em fase de análises moleculares para identificação de espécie.

2.4. Diagnósticos de Tripanosomatidae

2.4.1 Diagnóstico sorológico de Leishmania spp.

O diagnóstico sorológico foi realizado comparando-se dois testes. O teste comercial DPP®, produzido pela Biomanguinhos/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil), e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que é um dos métodos sorológicos indicados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de leishmaniose em cães domésticos.

O DPP foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A RIFI foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP. Foram utilizadas lâminas comerciais Imunoteste *Leishmania*®, do laboratório Immunodot (Jaboticabal, Brasil) e soro IgG anti-cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) diluído a 1:64 em PBS contendo 1 mg% de Evan's Blue. Foram consideradas amostras positivas as que titularam a partir da diluição 1:40. Todas as amostras positivas foram tituladas até tornarem-se negativas.

2.4.2. Diagnóstico molecular e sequenciamento

A extração do DNA das amostras de sangue e tecidos foi realizada utilizando-se o protocolo otimizado pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular (FCAV/UNESP) de acordo com o proposto por Bag et al. (2016). Para triagem das amostras que apresentavam parasitas da família Trypanosomatidae foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores da região mitocondrial do Citocromo B CytB F1/R2 (LOPES et al., 2016) para amplificação de uma banda de 377 pb. As reações foram compostas por tampão 1X (KCl 50 mM, TRIS-HCl 200 mM, pH 8,4); 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 pmol de cada primer; BSA 0,001 mg, 100 ng de DNA genômico total e água pura estéril para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, e 72°C por 40 segundos; e um ciclo final a 72°C por 10 minutos.

As amostras positivas para o citocromo B foram também amplificadas para a região 18S rDNA de Trypanosomatidae utilizando-se os primers 18S-561 F/R (NOYES et al., 1999). Ambas as regiões foram submetidas à PCR de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado por eletroforese de capilar em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GREEN, 1996; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) para verificação da qualidade de bases e corte das extremidades das sequências, levando-se em consideração bases com qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências

qualificadas deste estudo e as do banco de dados do NCBI foram alinhadas utilizando-se a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004). Para as análises filogenéticas, o melhor modelo evolutivo foi selecionado de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC) utilizando-se a ferramenta ModelTest 3.7 (POSADA; BUCKLEY, 2004).

As árvores filogenéticas foram obtidas pela análise bayesiana utilizando-se o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). O modelo evolutivo utilizado foi correspondente ao tipo de substituição 6 e distribuição gamma. As análises foram realizadas em quatro cadeias com 10.000.000 de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. Os filogramas obtidos foram editados graficamente pelo software Dendroscope 3 (HUSON; SCORNAVACCA, 2012). A árvore bayesiana de DTU's de *Trypanosoma cruzi* foi editada utilizando-se o software SplitsTree (HUSON; BRYANT, 2006).

Foram utilizados como grupos externos, para enraizamento das árvores, *Leptomonas mirabilis* (JQ359729.1) para a região 18s rDNA e *Endotrypanum monterogeii* (AB434688.1) e *Leptomonas pyrrhocoris* (MF409189.1) para o Citocromo B. Como grupo externo para enraizamento da árvore de DTU's de *T. cruzi*, foram utilizados três isolados de *T. cruzi marinkellei* de acordo com Ribeiro et al. (2018).

2.5. Análise de dados

Os animais avaliados foram categorizados em razão da presença de infecção parasitária. Para verificação da interferência da parasitose nos exames hematológicos e bioquímicos, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados, por meio do teste de Anderson-Darling. Quando houve normalidade dos dados, foi aplicado o teste F para comparação de variâncias. Em caso de igualdade de variâncias foi utilizado o teste t para comparação de duas amostras, e quando não houve igualdade das variâncias foi aplicado o teste t de Welch. Os cálculos foram realizados utilizando o software R.

Com a finalidade de verificar a concordância entre os testes sorológicos utilizados na pesquisa foi calculado o indicador Kappa, e calculados os fatores que influem na magnitude do Kappa (SIM; WRIGHT, 2005). Para isso foi utilizado o pacote EpiR do software R (STEVENSON, 2012).

2.6 Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no uso dos Animais (protocolos 07553/14; 11.510/16 e 006106/19) e seguiram os padrões internacionais. As capturas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO protocolo 55594-6).

3. RESULTADOS

Dentre as 510 amostras de carnívoros selvagens e cães domésticos analisadas, apenas três amostras de cães domésticos, oriundos do abrigo na cidade de Foz do Iguaçu, e uma de quati amplificaram as regiões de citocromo B e 18S de Trypanosomatidae, totalizando 1,3% (0,45%-3,8%) de prevalência nos cães da região e 0,35% (0,06%-1,97%) nos mamíferos selvagens. A espécie de Trypanosomatidae identificada nestes cães por meio do sequenciamento faz parte do complexo *Donovani* e é classificada como *Leishmania infantum* (Figura 2). Nenhum dos 284 mamíferos selvagens avaliados foi positivo na PCR para *Leishmania* spp., apesar de poderem atuar como reservatórios selvagens para os agentes etiológicos das leishmanioses tegumentar e visceral, sugerindo assim a importância do cão doméstico como principal reservatório para Leishmaniose Visceral na região estudada.

Com relação à prevalência sorológica nos cães domésticos avaliados, observou-se 13,27% (9,46%-18,32%) de cães positivos no teste imunocromatográfico comercial DPP para *Leishmania* spp. e 28,76% (23,25%-34,98%) na reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Destes cães positivos na RIFI, 8,4% (5,45%-12,76%) estão distribuídos na área rural do entorno do parque,

em quatro dos 14 municípios do oeste paranaense que fazem divisa com o PARNA Iguaçu. O restante dos animais positivos encontrava-se no abrigo de cães particular, na área urbana do município de Foz do Iguaçu.

Na RIFI, as amostras foram tituladas nas diluições entre 1:40 e 1:1.280. Foi observado que 43,1% das amostras positivas titularam apenas na diluição 1:40; 38,4% titularam nas diluições entre 1:80 e 1:160 e 18,4% das amostras titularam nas diluições entre 1:320 e 1:640. Nenhuma amostra tituló acima de 1:640. O teste de concordância de Kappa, comparando os resultados sorológicos obtidos nos testes DPP e na RIFI, demonstrou que a concordância entre os testes é de 0,55. Além disso, utilizando a RIFI como teste-ouro, foram calculadas a sensibilidade e especificidade do teste DPP nesta pesquisa. Pode-se observar que o teste DPP não foi muito sensível (46,1%) quando comparado com a RIFI, e apresentou especificidade de 100% e acurácia de 84,5%.

A distribuição de reagentes no entorno do parque ocorreu em maior intensidade nos cães da região Norte do Parque, nos municípios de Céu Azul, Santa Tereza do Oeste, Capitão Leônidas Marques e Lindoeste. Com relação ao efeito do parasitismo sobre os animais positivos na PCR e sorologia, não foi observada associação entre os exames hematológicos, função renal e hepática e a presença da infecção por *L. infantum* nos animais estudados.

Apesar de não ser identificada a infecção por parasitas do gênero *Leishmania* em nenhum mamífero selvagem estudado, um achado de grande importância desta pesquisa foi a identificação molecular de *Trypanosoma cruzi* em um quati da região turística do PARNA Iguaçu, o que configura um dado inédito na região em estudo. De acordo com as análises filogenéticas realizadas com as sequências da região 18S rDNA foi possível tipificar este *T. cruzi* como TcIV (Figura 3), conforme a classificação de tipagem atual em Unidades Discretas de Tipagem - DTU's.

Após a identificação do *T. cruzi* em quati foram estabelecidas campanhas de captura de triatomíneos, visando a descrição dos vetores de doença de Chagas na região do PARNA Iguaçu, porém nenhum inseto Reduviidae coletado pertencia à subfamília Triatominae, não tendo, desta forma, participação no ciclo de transmissão de *T. cruzi*.

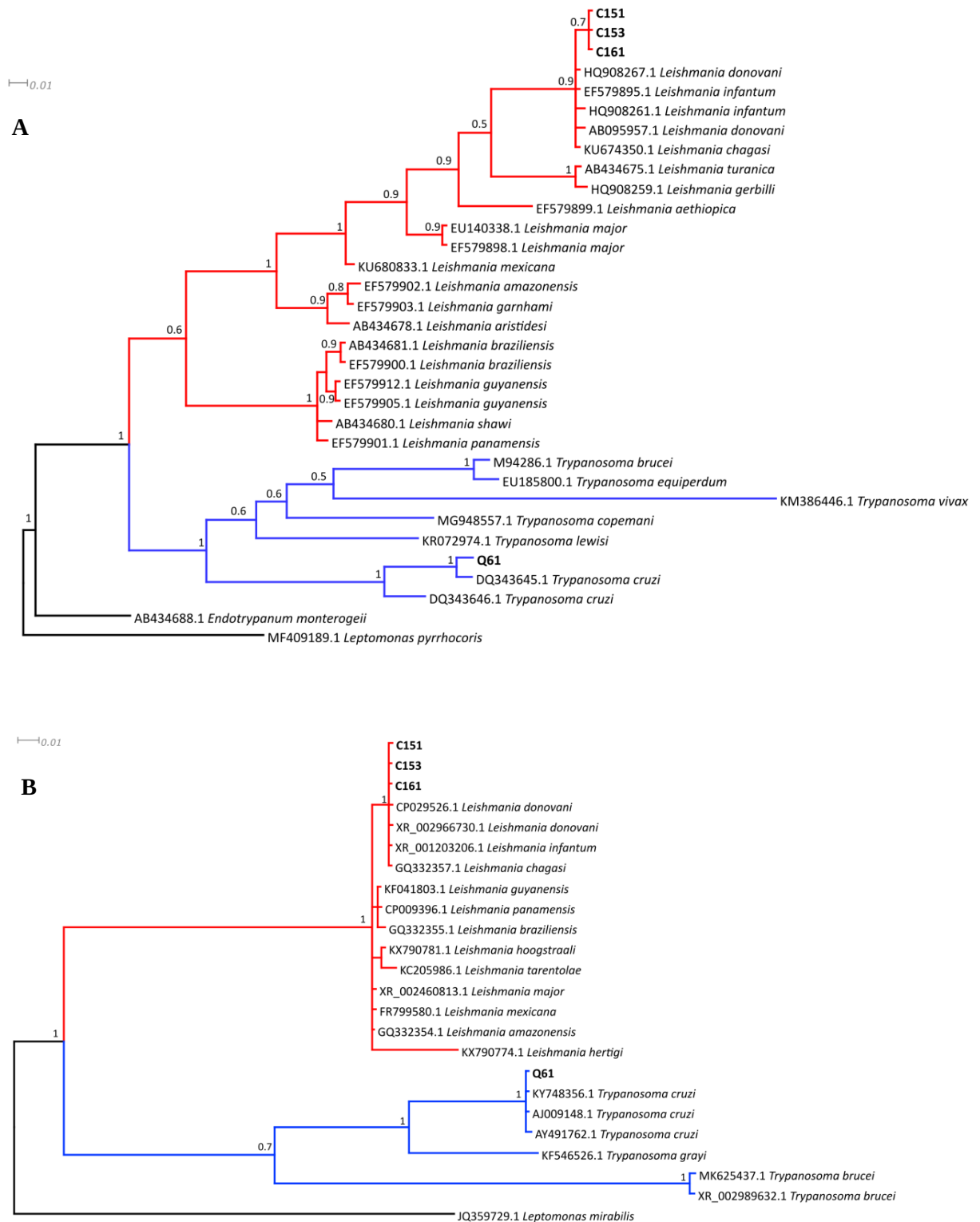


Figura 2. Árvores filogenéticas bayesianas (A) das sequências de citocromo B e (B) das sequências da região 18S rDNA, presentes em amostras de sangue de cães domésticos e quati (*Nasua nasua*) do Parque Nacional de Iguaçu. As amostras do estudo estão em destaque. Os valores nos entrenós correspondem à confiabilidade dos ramos.

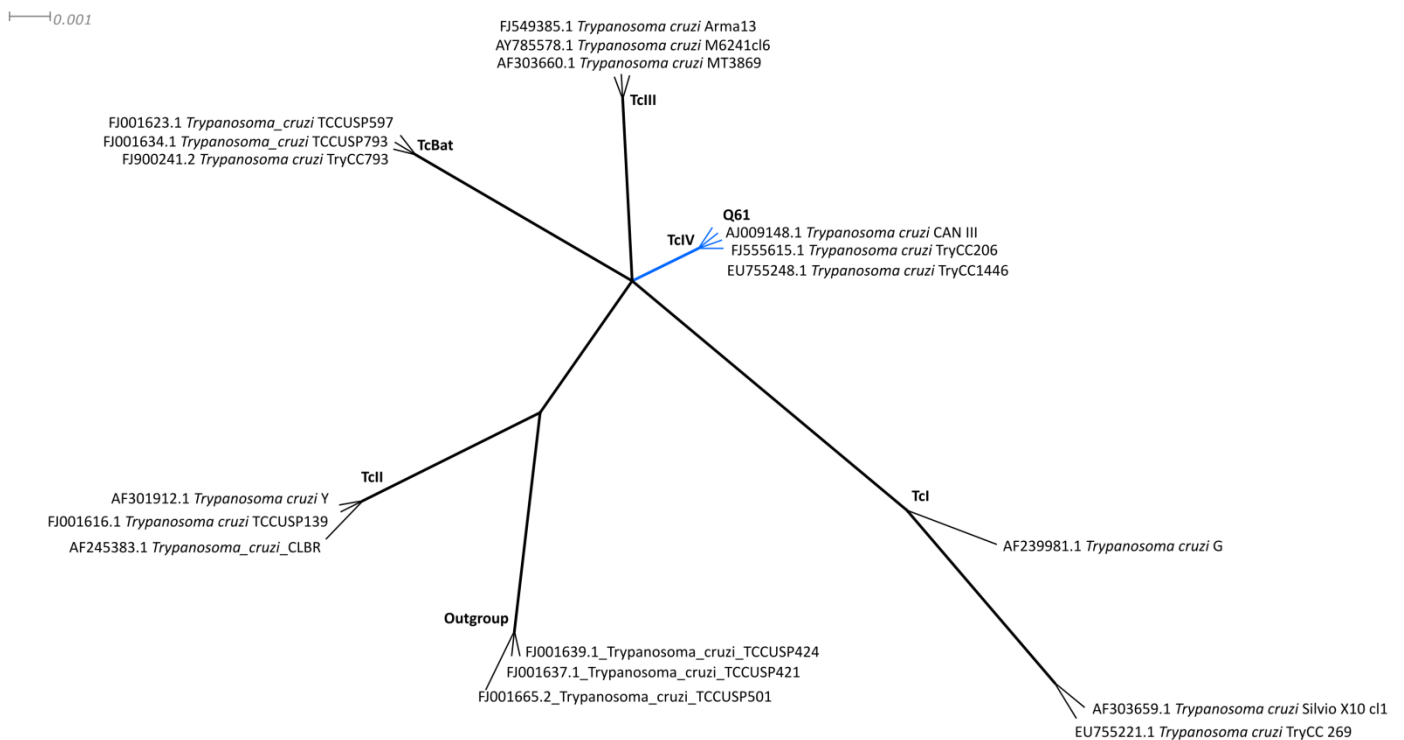


Figura 3. Árvore filogenética bayesiana ‘split’ de sequências da região 18S rDNA de DTU’s de *Trypanosoma cruzi* do banco de dados e de um quati (*N. nasua*) do Parque Nacional do Iguaçu.

4. DISCUSSÃO

O resultado obtido no sequenciamento das regiões 18S rDNA e Citocromo B nas amostras demonstrou que *L. infatum* circula na população canina da cidade de Foz do Iguaçu, e apesar de nenhuma amostra de cão doméstico da área rural ter sido positiva nas análises moleculares, foi obtida uma prevalência sorológica importante na região rural de outros municípios que fazem divisa com o PARNA Iguaçu. A leishmaniose visceral americana é uma doença tipicamente rural (ASSIMINA et al., 2008) sendo o ser humano e o cão doméstico as espécies mais comumente afetadas, embora outras espécies do gênero *Leishmania* também possam ser encontradas parasitando esses hospedeiros (ASHFORD, 2000). Dentre os animais domésticos, o cão é a espécie mais importante na epidemiologia da leishmaniose visceral americana (SILVA et al., 2005).

A partir dos filogramas obtidos nesta pesquisa foi possível observar que as amostras caninas agruparam-se num clado formado pelas espécies do complexo *Donovani*. A taxonomia do gênero *Leishmania* é complexa, uma vez que a identificação das espécies não se baseia apenas no diagnóstico molecular, mas também na diversidade clínica e geográfica observada nas espécies deste gênero (MAURÍCIO, 2018). Desse modo, taxonomistas classificaram as espécies de *Leishmania* que causam a leishmaniose visceral em humanos e cães domésticos, dentro do Complexo *Donovani* (FRAGA et al., 2010). Dentro do complexo *Donovani*, estão descritas quatro espécies: *L. donovani* (frequentemente dividida em *sensu stricto*, na Índia, e *sensu lato*, na África Oriental), *L. infantum*, *L. archibaldi* e *L. chagasi*. Na América do Sul, *L. chagasi* foi a nomenclatura adotada para a espécie responsável por causar a leishmaniose visceral na região, entretanto, alguns estudos, que incluíram várias linhagens de uma ampla faixa geográfica, acabaram por suportar a ideia de que *L. infantum* e *L. chagasi* sejam sinonímia. Estes estudos consideraram também que a epidemiologia nas regiões estudadas é muito semelhante, e, portanto, não haveria razões moleculares, clínicas ou epidemiológicas que justificassem a separação em duas espécies (KUHL et al., 2007; ZEMANOVA et al., 2007; MAURICIO et al., 2006).

A circulação de *Leishmania infantum* em cães domésticos no município de Foz do Iguaçu foi verificada a partir de 2012, sendo observada uma prevalência de 2,5% nos animais avaliados na fronteira com a Argentina e de 5,1% nos cães da região da fronteira com o Paraguai (DIAS et al., 2018). Como uma das principais rotas de dispersão de *L. infantum* no centro-sul do Brasil, a rota Paraguai-Brasil é suportada por análises de genotipagem molecular baseadas em marcadores microssatélites, onde verificou-se que as populações paraguaias de *L. infantum* estão presentes nas infecções caninas nos municípios de Foz do Iguaçu e também em municípios do Rio Grande do Sul (PASQUALI et al., 2019). Esses achados apoiam a hipótese de que o parasita está presente em Foz do Iguaçu há mais tempo do que se acreditava, uma vez que, a doença só foi reconhecida recentemente no município (THOMAZ-SOCCOL et al., 2017). Apesar destes trabalhos recentes, nenhuma pesquisa havia sido realizada com hospedeiros selvagens visando à identificação molecular de tripanossomatídeos na mata atlântica do PARNA Iguaçu.

Na presente pesquisa, apesar da prevalência nos cães domésticos, nenhum dos mamíferos selvagens avaliados foi positivo para *L. infantum* nas análises moleculares, podendo-se sugerir que na região de abrangência do PARNA Iguaçu os cães domésticos mantêm o ciclo epidemiológico desta zoonose, e são seus reservatórios na área estudada (QUINNELL; COURTENAY, 2009). A infecção por *L. infantum* tem sido detectada em algumas espécies selvagens no Brasil, incluindo canídeos (FIGUEIREDO et al., 2008; LUPPI et al., 2008; SOUZA et al., 2010), primatas (MALTA et al., 2010) e felídeos (DAHROUG et al., 2010), porém até o momento não se sabe o papel destas espécies no ciclo epidemiológico desta enfermidade (LUPPI et al., 2008; MALTA et al., 2010). Entretanto roedores (OLIVEIRA et al., 2005) e marsupiais (SCHALLIG et al., 2007; SANTIAGO et al., 2007), por possuírem hábitos sinantrópicos são citados como potenciais reservatórios e mantenedores do ciclo na área rural e periurbana (SOUZA et al., 2014). Nesta pesquisa, não foi detectada a presença de *Leishmania* spp. em nenhum roedor e marsupial, sugerindo que as ações de controle da leishmaniose visceral em Foz do Iguaçu, importante cidade na Tríplice Fronteira do sul brasileiro, devem ser dirigidas para seu principal reservatório, o cão doméstico, e seus vetores na área urbana e periurbana.

O vetor de *L. infantum*, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, tem sido relatado na Argentina, Uruguai e Paraguai, em áreas que coincidem com a ocorrência de leishmaniose visceral nesses países (COUSIÑO, 2006). Em Misiones, na Argentina, *Lu. longipalpis* foi encontrada na área urbana de Puerto Iguazú, que faz fronteira com a cidade de Foz do Iguaçu, Paraná (SALOMÓN et al., 2010). Em 2012, *Lu. longipalpis* foi registrada na cidade de Foz do Iguaçu, sendo sugerido que esta espécie esteja dispersa em toda a área urbana de Foz do Iguaçu favorecendo o ciclo de transmissão da leishmaniose visceral entre cães domésticos e humanos (SANTOS et al., 2012).

Com relação à identificação de *Trypanosoma cruzi* em um quati da região turística do PARNA Iguaçu, este é o primeiro relato de diagnóstico molecular da infecção em quatis na Mata Atlântica do Sul do Brasil, pois estudos sobre a infecção por Trypanosomatidae em quatis foram realizados apenas no Pantanal, no Cerrado e na Amazônia (HERRERA et al., 2008; ROCHA et al., 2013; PORFÍRIO et al.,

2018). Mamíferos selvagens das ordens Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Pilosa, Primata e Rodentia são hospedeiros conhecidos de *T. cruzi* (NOIREAU et al. 2009; JANSEN & ROQUE, 2010). Este parasita é o agente etiológico da doença de Chagas, uma das mais importantes infecções parasitárias na América latina (HOTEZ et al., 2008) e que enfrenta, na atualidade, desafios no cenário epidemiológico principalmente pela possibilidade de transmissão via oral, uma vez que medidas de controle previamente empregadas não são eficazes contra este cenário. Além disso, a compreensão do ciclo silvestre ainda está em andamento, pois apesar de *T. cruzi* ter sido descrito há mais de um século (CHAGAS, 1909), existem muitas questões abertas sobre sua ecologia e transmissão em ambientes selvagens (ROCHA et al., 2013).

Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de ferramentas moleculares foram identificados diferentes subtipos genéticos de *T. cruzi*. Esses subtipos são denominados Unidades Discretas de Tipagem (DTU) e servem para propor relações genéticas entre os diferentes isolados de *T. cruzi*, que foram classificados como TcI ao TcVI e TcBat. No Brasil, já foram descritas as sete DTUs (ZINGALES et al., 2012). O subtipo genético identificado parasitando *N. nasua* do PARNA Iguaçu é do tipo TcIV, que tem sua origem na hibridização de TcI e TcII (WESTENBERGER et al., 2005; LEWIS et al., 2011) e já foi descrito na Mata Atlântica do sudeste brasileiro (DARIO, 2013). É proposto que o tipo TcIV esteja associado ao ciclo de transmissão silvestre arbórea, a primatas e a triatomíneos do gênero *Rhodnius* (YEO et al., 2005; MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2012), porém, por ser menos frequente que a ocorrência de TcI e TcII, a rota de transmissão desta DTU não está totalmente esclarecida. Entretanto, recentemente foram observados surtos de doença de Chagas por via oral, causados pelos DTU's TcIII e TcIV, além de serem observados também em 50% dos triatomíneos coletados nas proximidades das casas e aldeias durante surtos na região amazônica (JANSEN et al., 2015).

No estado do Paraná, apenas um único trabalho relata a ocorrência de infecção por *T. cruzi* em triatomíneos e reservatórios na região Noroeste (TOLEDO et al., 1997). Apesar de o vetor de *T. cruzi* não ter sido capturado durante esta pesquisa, um espécime de *Panstrongylus megistus* (Reduviidae:Triatominae) foi coletado em 2016 no PARNA Iguaçu, durante outra pesquisa de campo (FONSECA;

BARROS, dados não publicados), e foi depositado no acervo da Coleção Entomológica Dr. José Maria Soares Barata de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, em Araraquara, SP, indicando a presença deste triatomíneo na região estudada.

Panstrongylus megistus é um dos principais vetores da doença de Chagas no Brasil devido a sua ampla distribuição geográfica (RÊBELO, 1999) e sua capacidade de domiciliação nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (DIAS, 1987). Na região Sul, a ocorrência de *P. megistus* é mais comum no ambiente silvestre úmido, apesar de também já ter sido relatado em domicílios (JURBERG et al., 2004). Possui hábito alimentar eclético, podendo realizar sua alimentação em aves, humanos, cães, gatos, marsupiais, roedores, ruminantes domésticos, suínos, entre outros (CARCAVALLO et al., 1997; VILLELLA et al., 2010). Desta forma, os dados levantados aqui nesta pesquisa são de suma importância, uma vez que na mesma área estão presentes hospedeiros infectados e vetores competentes para a transmissão da enfermidade na região de abrangência do PARNA Iguaçu, sendo um alerta para os órgãos de vigilância em saúde.

Há indícios epidemiológicos de que os carnívoros Neotropicais estejam envolvidos nas redes de transmissão de *T. cruzi*, embora esse potencial de amplificação e dispersão das populações do parasita seja variável, pois depende das características ecológicas das espécies hospedeiras e peculiaridades ambientais regionais (ALVES et al., 2011). Os procionídeos, como os quatis, são onívoros (NOWAK, 2005) e se alimentam de invertebrados e mamíferos e, portanto, pode-se sugerir que tenham um lugar no topo da cadeia de transmissão do *T. cruzi* (ALVES et al., 2011). Dessa forma, o achado da infecção por *T. cruzi* em quatis no PARNA Iguaçu pode ser decorrente também da dieta generalista deste carnívoro, composta principalmente por invertebrados, frutos e pequenos vertebrados (ALVES-COSTA; FONSECA; CHRISTOFARO, 2004). Outro ponto importante a ressaltar é que, devido a esta plasticidade alimentar da espécie, muitas vezes alguns grupos de quatis se aproximam de áreas rurais e periurbanas permitindo que indivíduos se aproximem de habitações humanas, podendo então serem importantes reservatórios e manterem um ciclo silvático-rural da doença de Chagas na região estudada.

5. CONCLUSÃO

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

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

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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