



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO- UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* DE MORCEGOS DO ESTADO DO
MARANHÃO**

São Luís- MA

Janeiro/2019

LUIS GUSTAVO SIQUEIRA MATIAS RAMOS

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* DE MORCEGOS DO ESTADO
DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Mestrado em Ciência Animal da
Universidade Estadual do Maranhão para
obtenção do Título de Mestre em Ciência
Animal

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Pereira da Costa

São Luís- MA

Janeiro/2019

LUIS GUSTAVO SIQUEIRA MATIAS RAMOS

**DIVERSIDADE, ISOLAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* DE MORCEGOS DO ESTADO DO
MARANHÃO**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Andréa Pereira da Costa (Orientadora)

Doutora em Ciências
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^a. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira

Doutora em Biologia Parasitária
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^a. Dra. Aline Diniz Cabral

Doutora em Ciências
Universidade Federal do ABC, UFABC, Brasil.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Deus que me sustentou até aqui”

AGRADECIMENTOS

A Deus, que toda honra gloria, louvor e adoração sejam destinadas a ELE.

A Prof^a. Dra. Andréa Pereira da Costa pela orientação, que mesmo sabendo que eu não tinha experiência na área do trabalho e ser tão atarefada, teve toda paciência e disponibilidade para ensinar, ajudar, aconselhar, direcionar, uma das poucas pessoas que realmente tem o dom de ser “PROFESSOR”, fazendo tudo com muito amor e dedicação!

A Prof^a. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira pela orientação de todo o trabalho, sendo a senhora o maior pilar dele, dando sustentação e continuidade que com toda sua experiência nos direcionou a aconselhou nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Francisco Borges Costa pela ajuda na coleta dos morcegos e pelos conselhos.

A minha turma de mestrado que tornou essa jornada árdua mais leve, em especial a Carolina Silva, Isabel Oliveira, Breno Glaessner, Beatriz.

A minha noiva Raiany Macau que em todos os momentos esteve ao meu lado, suportando minhas chatices e estresses, obrigado por todo amor, paciência, compreensão, carinho e orações, Te Amo muito.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia-UEMA pela ajuda, parceria, alegrias, conhecimentos trocados, e principalmente a Claubeth e Valéria, por tudo isto e ainda mais pela ajuda direta na etapa do trabalho realizado no laboratório e em campo.

Ao laboratório de Biologia Molecular do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pela disponibilização dos equipamentos e paciência para ensinar.

A amiga, Nayara Louzeiro, pela disposição, paciência, incentivos de todo o trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA pelo financiamento do projeto

A CAPES pela bolsa concedida

RESUMO

As espécies do gênero *Trypanosoma* são protozoários da família Trypanosomatidae, cujo ciclo biológico se desenvolve alternadamente em mamíferos e insetos reduvídeos. Pouco se sabe sobre quais desses parasitos estão presentes nos morcegos do Maranhão e qual o papel destes na manutenção dos tripanossomatídeos em ciclos silvestres e peridomiciliares. Objetivou-se verificar a presença de parasitas do gênero *Trypanosoma* que circulam em morcegos dos municípios maranhenses de Turiaçu, Godofredo Viana, Cândido Mendes e Carutapera. A captura dos animais foi realizada em duas campanhas, a primeira em abril/2017 e a segunda em março/2018, com 07 dias de duração cada. Para as coletas foram utilizadas oito redes de neblina que foram armadas das 18:00 às 00:00h e vistoriadas em intervalos de 30 minutos, já o isolamento das espécies de tripanossomas, as amostras de sangue coletadas foram semeadas em tubos contendo um meio de cultura bifásico. O sangue obtido foi utilizado para a confecção de três lâminas de esfregaços sanguíneos, por amostra, que foram corados com Giemsa e analisados no microscópio óptico. Para análises moleculares amostras de sangue, baço e fígado dos animais eutanasiados foram coletadas. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit GeneJet Genomic DNA Purification e amplificação foi realizada usando os marcadores moleculares V7V8 e o gGAPDH. Um total de 82 morcegos foram capturados. Não foram identificados parasitos nos esfregaços sanguíneos, porém houve 4 culturas positivas para *Trypanosoma*, entretanto elas não se estabeleceram. 57 amostras de tecido (sangue, baço e fígado) dos municípios de Turiaçu e Cândido Mendes foram analisadas e destas 25 apresentaram-se positivas para o DNA barcoding para tripanossomatídeo (V7V8) dos genes SSU rDNA. Posteriormente estas 25 amostras foram testadas para o gene gGAPDH e 11 amostras foram positivas. A diversidade de espécies, a presença constante de morcegos nas áreas estudadas e o encontro de animais positivos evidencia a importância ecológica dos quirópteros e o fato de que estes não devem ser excluídos como potenciais reservatórios para tripanossomatídeos de interesse médico

Palavras-chaves: Amazonia, quirópteros, tripanossomatídeos

ABSTRACT

The species of the genus *Trypanosoma* are protozoa of the family Trypanosomatidae, whose biological cycle develops alternately in mammals and reduvídeos insects. Little is known about which of these parasites are present in the bats of Maranhão and what their role in the maintenance of trypanosomatids in wild and peridomiciliary cycles. The objective was to verify the presence of *Trypanosoma* parasites that circulate in bats from the municipalities of. The animals were captured in two campaigns, the first in April / 2017 and the second in March / 2018, each of 07 days. For the collections, eight mist networks were used, which were set up from 6:00 p.m. to 6:00 p.m. and inspected at 30 minute intervals, after isolation of trypanosome species. Blood samples collected were seeded in tubes containing a culture medium biphasic. The obtained blood was used to make three blood smear blades per sample, which were stained with Giemsa and analyzed under the light microscope. For molecular analyzes blood, spleen and liver samples from euthanized animals were collected. DNA extraction was performed according to the protocol established by the GeneJet Genomic DNA Purification Kit and amplification was performed using the molecular markers V7V8 and gGAPDH. A total of 82 bats were captured. No parasites were identified in the blood smears, but there were 4 positive cultures for *Trypanosoma*, although they did not establish themselves. 57 tissue samples (blood, spleen and liver) from the municipalities of Turiaçu and Candido Mendes were analyzed and of these 25 were positive for the trypanosome DNA barcoding (V7V8) of SSU rDNA genes. Subsequently these 25 samples were tested for the gGAPDH gene and 11 samples were positive. The diversity of species, the constant presence of bats in the studied areas and the meeting of positive animals shows the ecological importance of the bats and the fact that they should not be excluded as potential reservoirs for trypanosomatids of medical interest

Keywords: Amazon,bats,trypanosomatids

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2.1 Características gerais dos Morcegos	14
2.2 <i>Trypanosoma</i>	15
2.3 Clados de <i>Trypanosoma</i>	18
2.4 <i>Trypanosoma</i> em morcegos	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Comitê de Ética	23
4.2 Áreas amostradas.....	23
4.3 Captura e identificação dos animais	24
4.4 Isolamento de <i>Trypanosoma</i>	24
4.5 Esfregaço Sanguíneo	25
4.6 Extração de DNA e Reações de amplificação	25
4.7 Purificação e sequenciamento	25
4.8 Análises das sequências.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Amostra	27
5.2 Hemoculturas e Esfregaços sanguíneos.....	28
5.3 Detecção molecular de tripanossomatídeos em diferentes amostras.....	31
biológicas de morcegos	31
6. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de localização das áreas de coleta	23
Figura 2 - Formas amastigotas em esfregaços sanguíneos	30

LISTA DE TABELAS

Figura 1 - Relação de famílias de morcegos encontradas em quatro municípios do maranhão entre março de 2017 e abril de 2018.....	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTUs	Unidades discretas de digitação
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
gGAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LIT	”Liver infusion tryptose”
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer solution (solução salina tamponada)
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (“polymerase chain reaction”)
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SSU rDNA	Subunidade menor do gene ribossômico
Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
μM	Micromolar
μL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os cinetoplastídeos são organismos eucariotos e são assim nomeados por possuírem uma mitocôndria única, rica em DNA (kDNA), denominada cinetoplasto. Dentro dos cinetoplastídeos, os membros da família Trypanosomatidae possuem um flagelo único, são parasitas de vertebrados, invertebrados ou plantas.

O gênero *Trypanosoma* é classificado em duas seções de acordo com o desenvolvimento no inseto vetor: Stercoraria, onde o desenvolvimento ocorre no trato digestório posterior do inseto e a transmissão é contaminativa, através das fezes do vetor contendo, formas tripomastigostas metacíclicas e Salivaria que inclui espécies de origem africana em que o desenvolvimento ocorre no tubo digestivo anterior do inseto vetor e nas glândulas salivares. A transmissão das formas tripomastigostas metacíclicas ocorre de forma mecânica ou inoculativa (HOARE, 1972).

Os morcegos atuam como importantes predadores de grande número de insetos, no processo de polinização, na dispersão e distribuição de sementes ou mesmo, atuando como transmissores de doenças (THOISY et al., 2016). Nessa perspectiva são comumente encontrados infectados por diversos tripanosomatídeos, dentre os quais a espécie *Trypanosoma cruzi* agente etiológico da doença de Chagas, onde estes mamíferos têm sido elencados como importantes reservatórios do parasito, visto que em determinadas áreas são abundantes, adaptam-se bem ao domicílio humano e podem apresentar elevadas prevalências de infecção representando um potencial para a disseminação no ambiente doméstico e peri- doméstico (ESBÉARD et al., 2014).

No Brasil, atualmente são conhecidas nove famílias de morcegos, com 64 gêneros e 167 espécies. A família Phyllostomidae é a mais prevalente no Brasil, representando 57% das espécies de morcegos e alta prevalência de infecção em espécies desta família aponta para a importância destes mamíferos na dispersão do parasito na natureza. (PAGLIA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014).

Poucos estudos foram realizados no Estado do Maranhão. Nesse sentido, Costa et al. (2015) trabalhando com animais silvestres em seis municípios, obtiveram, a partir de mamíferos das ordens Didelphimorphia e Chiroptera, *Trypanosoma cruzi marinkellei* e *T. cruzi*. Entretanto, apesar desse trabalho, os estudos sobre *Trypanosoma* em animais silvestres na região são ainda incipientes, não se dispondo ainda de um quadro claro e completo dessas infecções e de seu significado.

Considerando que o Maranhão compreende um sistema bastante rico, onde as condições ambientais favorecem o estabelecimento de uma grande variedade de fauna e flora, o estudo das interações entre os organismos é fundamental para o entendimento dos fenômenos que contribuem para a manutenção desta diversidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais dos Morcegos

Os morcegos são mamíferos placentários pertencentes à classe Mammalia, ordem Chiroptera sendo a ordem com maior diversidade do mundo contado com 18 famílias, 202 gêneros e 1120 espécies, a qual se dividiam em duas subordens: os morcegos propriamente ditos (subordem *Microchiroptera*) e as raposas voadoras, por se assemelharem a face a coloração de seus pelos marrom-avermelhado das raposas (subordem *Megachiroptera*) (SIMMONS, 2005). Recentemente, uma visão alternativa da classificação dos quirópteros com base em evidências morfológicas, moleculares e fósseis dividiu o grupo em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (MING LEI; DONG DONG, 2016).

O bioma Amazônico possui apenas 25% de sua área com registros de quirópteras disponíveis, sendo considerado por alguns autores como o bioma mais crítico devido à escassez de estudos (BERNARD et al. 2011). A região tropical abriga a maior diversidade de morcegos e no Brasil, até o momento, são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies, correspondendo a 24,8% das espécies de mamíferos brasileiros (PAGLIA et al., 2012).

São superados em diversidade de espécies apenas pela Ordem Rodentia apresentando 235 espécies. A família Phyllostomidae apresenta a maior diversidade de espécies com 90 exemplares, seguida por Molossidae (26 espécies), Vespertilionidae (24 espécies), Emballonuridae (15 espécies), Mormoopidae, Thyropteridae e Natalidae (4 espécies cada), Noctilionidae (2 espécies) e Furipteridae (1 espécie). Os morcegos habitam todo o território nacional sendo encontrados na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, semi-árido nordeste e até nos ambientes urbanos, ocupando estruturas humanas como sótãos, caves, espaços apertados entre telhas ou edifícios antigos e abandonados, além de sua grande capacidade de deslocamento, o que fazem deles espécies ideais para o estudo de respostas evolutivas e adaptativas (REIS et al., 2011).

Como grupo, os morcegos possuem uma grande diversidade de hábitos alimentares. Sua dieta inclui insetos e outros pequenos artrópodes (insetívoros), sangue de outros vertebrados (hematófagos) de ocorrência restrita no continente americano, carne de roedores, pássaros, anfíbios, répteis e outros morcegos, embora não sejam canibais, pois capturam espécies diferentes da sua (carnívoros) peixes (piscívoros), frutas e/ou flores (frugívoros), pólen e/ou néctar (nectarívoros), havendo ainda os que se alimentam

de diversos produtos de origem animal e vegetal (omnívoros) (HILL; SMITH 1984; FABIAN et al., 2008; SATO et. al., 2008; NOVAES et al., 2010).

Apenas três espécies são hematófagas: *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* que preferencialmente se alimenta de aves e *Desmodus rotundus* conhecido popularmente como “vampiro” que é o mais estudado, por constituir um papel importante na transmissão de raiva em humanos e animais de produção, acarretando grandes prejuízos na pecuária (REIS et. al., 2011).

Os morcegos albergam inúmeros parasitos, sendo observadas populações numerosas de pequenas moscas, carrapatos e ácaros, além de grande diversidade de endoparasitos em exemplares coletados em campo. No que diz respeito a tripanossomas, constituem um grupo de grande importância, já que muitas espécies foram descritas neste hospedeiro, nas quais os vetores provavelmente são triatomíneos que vivem em buracos de árvores e cavernas, telhados de folhas de palmeiras, tocas de animais silvestres, forros de residências e outros abrigos (DIAS., 1936; DIAS; DEANE , 1967; MARCILI et al., 2009; MARCILI et al., 2009a; CAVAZZANA et al., 2010; BERNARD et al., 2011; LIMA et al., 2012; HAMILTON et al., 2012; LIMA et al., 2013).

Do ponto de vista parasitológico, os morcegos são espécies importantes a serem estudadas, uma vez que possuem hábitos que facilitam a transmissão e disseminação de parasitas e reservatório de doenças zoonóticas, como a capacidade de voo que permite uma grande mobilidade, a habilidade de habitar diversos tipos de abrigo, além do comportamento social, no qual diversas espécies vivem em um mesmo local interagindo entre si (ROQUE; JANSEN, 2014).

2.2 *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* pertence ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida por possuir como principal característica a presença do cinetoplasto, constituída de DNA extranuclear condensado localizadas na base do flagelo, onde encontra-se o DNA mitocondrial (kDNA) (CAVALIER-SMITH, 1981; MOREIRA et al., 2001; BUSSE; PREISFELD, 2003; BREGLIA et al., 2007).

Os cinetoplastídeos foram classificados em duas subordens segundo os parâmetros taxonômicos tradicionais: Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae e Bodonina, que contempla parasitas de vida livre, apresentam dois

flagelos localizados em lados opostos e vida parasitária (ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos) (HOARE, 1972; MOREIRA et al., 2004; SIMPSON et al., 2006).

Na família Trypanosomatidae estão agrupados 19 gêneros, diferenciados de acordo com parâmetros clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e de relações filogenéticas. Esta família compreende gêneros que podem parasitar insetos (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Zelonina*, *Sergeia*, *Kentomonas*, *Blechnomonas*, *Lotmaria*, *Novymonas*, *Paratrypanosoma*); plantas (*Phytomonas*), répteis (*Sauroleishmania*) e mamíferos (*Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania*) (VICKERMAN, 1976; PODLIPAEV, 1990; CAMARGO, 1998; SVOBODOVÁ et al., 2007; LEONARD et al., 2011; VOTÝPKA et al., 2013; MASLOV et al., 2013; LUKES et al., 2014; PORCEL et al., 2014; KAUFER et al., 2017).

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, apresentando a segunda maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica depois dos nematodeos (STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006; MASLOV et al., 2013; LUKES et al., 2014). Durante o ciclo de vida, as espécies de tripanossomas podem apresentar as formas amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e promastigotas. Estas diferenças formas variam de acordo com a presença ou ausência de flagelo livre, membrana ondulante, e a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994).

As espécies do gênero *Trypanosoma* infectam além de peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos os invertebrados como anelídeos (sanguessugas) e artrópodes hematófagos das ordens *Diptera* (moscas e mosquitos), *Hemiptera* (triatomíneos), *Siphonaptera* (pulgas) e *Parasitiforme* (carrapatos) com ciclos de vida alternando entre vertebrados e invertebrados, que atuam respectivamente como reservatórios e vetores. Tal diversidade de hospedeiros reflete a ampla distribuição geográfica, a variedade de ecossistemas e nichos ecológicos e os mecanismos de transmissão descritos para as diversas espécies de tripanossomas (HOARE 1972; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007).

Estudos buscam compreender eventos evolutivos importantes da história dos tripanossomatídeos através de marcadores moleculares, como a origem do parasitismo e do modo de vida. Esses trabalhos têm sugerido a hipótese de um bodonídeo ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao ambiente intestinal, dando origem aos

tripanosomatídeos monoxênicos de insetos. Com o surgimento da hematofagia nos insetos, esses parasitas podem ter sido inoculados em vertebrados e aqueles que se adaptaram ao parasitismo no sangue passaram a circular entre insetos hematófagos e vertebrados (HAMILTON et al., 2007).

Os critérios tradicionais utilizados na classificação de tripanossomas segundo Hoare (1972), são em duas secções: Salivaria e Stercoraria, de acordo com as vias de eliminação das formas infectantes pelo vetor e o desenvolvimento no invertebrado.

A secção Salivaria compreende os tripanossomas de origem africana os quais geralmente são patogênicos para seus hospedeiros. Nessa secção estão os subgêneros *Duttonella* (*Trypanosoma vivax*), *Trypanozoon* (*Trypanosoma brucei*), *Pycnomonas* (*Trypanosoma suis*) e *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*) com desenvolvimento cíclico em moscas tsé-tsé (*Glossina*), com transmissão por inoculação da forma metacíclica (tripomastigota) junto com a saliva, durante o repasto sanguíneo do inseto vetor. Apenas as espécies do subgênero *Trypanozoon* completam seu desenvolvimento nas glândulas salivares. Exceções conhecidas são *Trypanossoma evansi*, *Trypanossoma vivax* e *Trypanossoma equiperdum* que são mecanicamente transmitidos devido à perda da habilidade de se desenvolver ciclicamente, através da hematofagia de insetos e pelo coito respectivamente, devido a esta adaptação são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano (HOARE, 1972; STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2007; STEVENS, 2008; LUN et al., 2010).

Na secção Stercoraria estão os tripanossomas cujo desenvolvimento ocorre no intestino posterior do invertebrado, e a eliminação das formas metacíclicas com as fezes do inseto vetor (transmissão contaminativa). Na secção Stercoraria encontram-se os subgêneros *Schizotrypanum*, *Herpetosoma* e *Megatrypanum*, cujas espécies-tipo são, respectivamente, *T. cruzi*, *Trypanosoma lewisi* e *Trypanosoma theileri* respectivamente (HOARE, 1972).

A maioria das espécies dessa secção não é patogênica para o ser humano nem para outros hospedeiros vertebrados, apresentam grande distribuição geográfica e ampla gama de hospedeiros, com exceção do *T. cruzi* que é patogênico e também de poucos casos relatados de infecção humana por *T. lewisi* e *Trypanossoma rangeli* (HOARE, 1972; SARATAPHAN et al., 2007; TRUC et al., 2012).

Com o auxílio do avanço de métodos moleculares e análises filogenéticas de espécies dos diferentes grupos de tripanossomatídeos baseados em sequências dos genes de SSU rRNA apontaram a polifilia do gênero *Trypanosoma* (MASLOV et al., 1996).

Contudo, inferências filogenéticas incluindo um maior número de espécies e baseadas em sequências independentes e combinadas dos genes SSU rRNA e gGAPDH comprovam que todas as espécies de tripanossomas que se tem conhecimento compartilham um ancestral comum, desta forma, observou-se que os tripanossomas são monofiléticos (STEVENS et al., 1998, 1999b; LUKES et al., 2005, 2014).

Estudos reforçam a hipótese de uma origem comum a todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, e apoiam a existência de clados, que inicialmente eram três: o clado *T. cruzi*, *T. brucei* e o clado aquático (HAMILTON et al., 2004, 2007; STEVENS et al., 1998, 1999a, 2001). Com o surgimento de novos estudos e com o auxílio de análises filogenéticas e biologia molecular foram descritos 11 clados: 1) clado aquático com tripanossomas de peixes e anuros; 2) clado *Trypanosoma grayi* de tripanossomas de crocodilianos; 3) clado *Trypanosoma theileri* associado com ruminantes; 4) clado de tripanossomas de lagartos e cobras; 5) clado *T. brucei*, tripanossomas de mamíferos de origem africana transmitidos por tsé-tsé; 6) clado de tripanossomas de aves; 7) clado *T. lewisi* de tripanossomas, principalmente, de roedores; 8) clado *T. rangeli*; 9) clado Schizotrypanum (*T. cruzi* e *T. cruzi*-like) 10) clado *Trypanosoma cyclops* que compreende os tripanossomas de macaco da Malásia, de um marsupial Australiano, anuros e sanguessugas terrestres da família Haemadipsidae, também da Austrália 11) Clado *Trypanosoma terrestris* que contém isolados de *Tapirus terrestris*. (HAMILTON et al., 2005, 2007; RODRIGUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009 a,b; ACOSTA et al., 2013).

2.3 Clados de *Trypanosoma*

O clado *T. brucei* está constituído por espécies dos subgêneros Trypanozoon (*T. brucei*, *T. evansi*), Duttonella (*T. vivax*), Pycnomonas (*Trypanosoma suis*) e Nannomonas (*Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma simiae*), todas de origem africana e pertencentes à secção Salivaria (ADAMS et al., 2010 a, b; HOARE, 1972). São consideradas patogênicas e podem infectar humanos e mamíferos domésticos de interesse econômico, sendo seus vetores naturais, as moscas tse-tsé, formando um grupo separado por alto grau de diferenças das demais espécies de tripanossomas, o que sugere uma história evolutiva única, provavelmente confinada ao continente Africano (HAMILTON et al., 2007; STEVENS et al., 2001 PEACOCK et al., 2012).

No clado *T. cruzi* estão todas as espécies do subgênero Schizotrypanum como: *T.*

cruzi (espécie-tipo) e outras espécies conhecidas, porém restritas a hospedeiros da ordem Chiroptera, como *T. cruzi marinkellei*, *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma erneyi*. Dessas espécies, apenas *T. cruzi* tem a capacidade de infectar tanto morcegos quanto outros mamíferos (HOARE, 1972; MARINKELLE, 1982a; STEVENS et al., 2001; CAVAZANNA et al., 2010; HAMILTON et al., 2012a, b; LIMA et al., 2012a, 2013).

Existe a hipótese de que o clado *T. cruzi* foi primitivamente um grupo de parasitas restritos a morcegos. Hamilton et al. (2012) sugerem a hipótese que um tripanossoma ancestral parasita de morcegos, provavelmente do Velho Mundo, deu origem a todas as espécies do clado *T. cruzi* com espécies limitadas a morcegos, como também espécies capazes de infectar outras classes de mamíferos. Assim, vários desses tripanossomas foram transmitidos dos morcegos para outros mamíferos, onde ocorreu a especialização do parasito para *T. cruzi* (HAMILTON et al., 2012a, b). Mais tarde, Lima et al. (2013) confirmaram essa hipótese evolucionária ao descreverem que uma nova espécie de *Trypanosoma* de morcegos (*Trypanosoma livingstonei*) divergiram de um tripanossoma de morcego ancestral comum que evoluiu exclusivamente em chiropteras ou mudou em oportunidades independentes para mamíferos de várias ordens formando o clado *T. cruzi*.

A enorme variabilidade genética evidenciada com diferentes marcadores moleculares levou à divisão de *T. cruzi* em seis unidades discretas de tipagem-DTUs (TcI à TcVI) e o conhecimento dos padrões geográficos de distribuição dessas DTUs no ambiente selvagem ainda é insuficiente (MARCILI et al., 2009c; ZINGALES et al., 2009; LIMA et al., 2014). Além dessas linhagens de *T. cruzi*, foram descritas uma linhagem associada a morcegos (TcBat) (MARCILI, 2008; LIMA et al., 2015).

As DTUs TcII, TcV e TcVI tem sido associada a transmissão no ciclo doméstico e peridoméstico causando grandes alterações em humanos, com manifestações cardíacas e digestivas que TcI e TcIV circulam entre primatas silvestres e são transmitidos por espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (RAGONE et al., 2012; VIRREIRA et al., 2006; ZINGALES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2013).

TcBat está mais relacionado com TCI, cepa bastante encontrada em marsupiais da família Didelphidae, acredita-se que não sejam exclusivos desses mamíferos e recentemente foi encontrado em seres humanos (RAMÍREZ et al., 2014). Já foram identificados morcegos infectados pelas linhagens TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcBat, além da presença de infecções mistas (JANSEN et al., 2015).

2.4 *Trypanosoma* em morcegos

Os morcegos podem ser infectados por *Trypanosoma* de diversos subgêneros, dentre os quais o Subgênero *Herpetosoma* - onde já foram encontrados parasitados com *T. rangeli* e alguns relatos não confirmados de formas *T. lewisi*-like (MARINKELLE, 1976); Subgênero *Megatrypanum* onde estão a maioria dos tripanossomas descritos em morcegos, porém, as informações sobre esses parasitos se restringem ao encontro de grandes formas tripomastigotas no sangue do hospedeiro, sendo que a apenas uma espécie de tripanossoma de morcego (*T. sp bat*) classificada morfologicamente no subgênero *Megatrypanum* foi posicionada na árvore filogenética do gênero *Trypanosoma*, o que mostrou que essa espécie não pode ser classificada em nenhum dos subgêneros tradicionalmente estabelecidos (STEVENS et al., 1999) e subgênero *Trypanozoon*, no pantanal, onde foi detectado *T. evansi* em morcegos frugívoros e insetívoros apenas por PCR (HERRERA et al, 2004).

Além desses subgêneros, quirópteros podem ser parasitados com espécies do subgênero *Schizotrypanum* que é constituído pelas espécies *T. cruzi* e tripanossomas restritas aos quirópteros: *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma vespertilionis*, *Trypanosoma erneyi* e *Trypanosoma livingstonei*, formando o clado *T. cruzi* (LIMA et al., 2012)

T. c. marinkellei é a espécie que está mais filogeneticamente associada com *T. cruzi*, essa espécie se restringe a morcegos da família Phyllostomidae e é transmitido apenas por triatomíneos do gênero *Cavernicola* (MARINKELLE, 1982). São poucos os isolados dessa espécie analisados, existem dúvidas sobre o ciclo de vida e não se conhece os mecanismos envolvidos na restrição de *T. c. marinkellei* aos morcegos nem aos triatomíneos do gênero *Cavernicola*.

Trypanosoma dionisii é a espécie exclusiva de morcegos, descrita no novo e velho mundo, distante filogeneticamente de *T. cruzi*. Formas amastigotas, similares as de *T. cruzi*, foram encontradas no músculo esquelético de morcegos infectados com essa espécie (HOARE, 1972; MOLYNEUX, 1991; GARDNER E MOLYNEUX, 1988).

Aproximadamente 80 espécies de morcegos foram encontradas infectadas por tripanossomas ao redor do mundo e no Brasil existem 40 espécies de morcegos onde foi registrada a infecção e mais de dez espécies de tripanossomas catalogadas, porém pouco ainda se sabe sobre o desenvolvimento de tripanossomas em quirópteros (MARCILI, 2008; LIMA, 2011; JANSEN et al., 2015).

No Brasil, em diversas regiões, há inúmeros relatos a respeito da infecção por parasitos do gênero *Trypanosoma* em morcegos. As primeiras descrições foram feitas por Dias, em 1933, na cidade Lassance, estado de Minas Gerais, durante estudos envolvendo a pesquisa de hemoflagelados em diferentes mamíferos, entre eles, morcegos pertencentes à família Phyllostomidae.

Pesquisas sobre a infecção por *T. cruzi* em mamíferos silvestres, examinaram morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* no estado de São Paulo e observaram a presença de um tripanosoma em esfregaços sanguíneos (DEANE; SUGAY, 1963). Morcegos das espécies *Artibeus planirostris*, *Phyllostomus hastatus* e *Phyllostomus discolor* foram encontrados infectados por tripanosomas e isolados por xenodiagnóstico no estado do Ceará (FABIÁN, 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Verificar a ocorrência de *Trypanosoma* spp. que infectam de morcegos capturados na Amazônia Maranhense.

3.2 Específicos

- Isolar parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na Amazônia Maranhense;
- Caracterizar molecular e morfolologicamente os isolados obtidos dos morcegos capturados;
- Diagnóstico e caracterização molecular das amostras de sangue e tecidos colhidas dos morcegos capturados na Amazônia Maranhense;

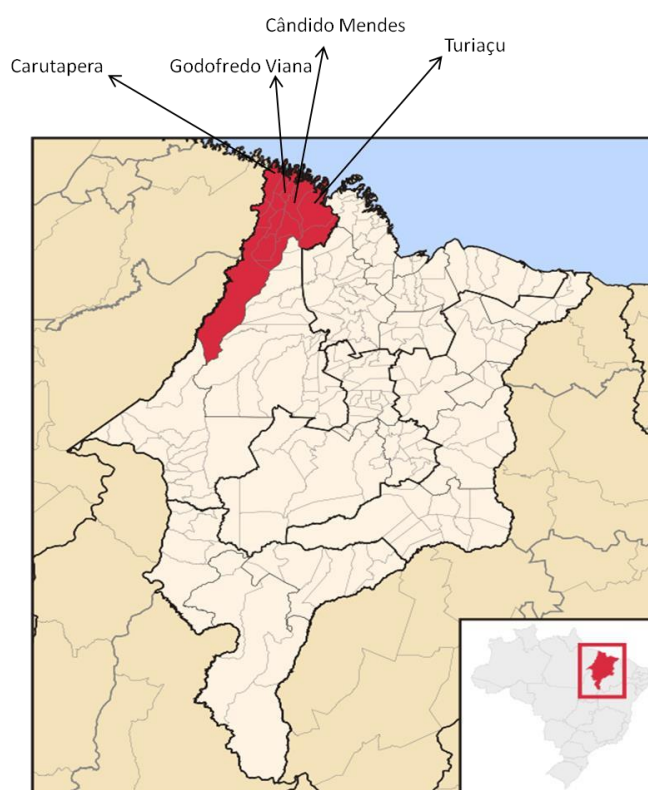
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – (CEEAA)/UEMA do Curso de Medicina Veterinária, conforme o protocolo nº01/2016 e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-ICMBio (54384-1).

4.2 Áreas amostradas

O estudo foi realizado em quatro municípios no Estado do Maranhão que fazem parte da Amazônia Maranhense: Turiáçu, Cândido Mendes, Godofredo Viana e Carutapera (Figura 1). Estes municípios estão localizados na microrregião do Gurupi que pertencente à mesorregião do Oeste Maranhense.



pt.wikipedia.org

Figura 1. Área de estudo, estado do maranhão, mesorregião do Oeste Maranhense

4.3 Captura e identificação dos animais

Os períodos de coleta foram selecionados com base no calendário lunar, sendo dada preferência para as fases de lua minguante e nova. As fases de lua crescente e cheia eram evitadas uma vez que é amplamente conhecido que as atividades de determinadas espécies, principalmente de *D. rotundus*, são fortemente influenciadas pela presença do luar (FLORES; CRESPO et al., 1972; GREENHAL., 1988; UIEDA., 1992; 2008).

As capturas dos morcegos foram realizadas em períodos de 5 dias em cada município ao longo de dois anos. A primeira coleta ocorreu no mês de abril /2017 no município de Godofredo Viana e Candido Mendes e a segunda foi executada no mês de março/2018 no município de Turiaçu e Carutapera. As coletas foram realizadas das 18:00 às 00:00h (seis horas de captura) utilizando 10 redes/noite de 12m de comprimento x 3m de altura e malha 25mm. As redes foram armadas entre 0,5 e 2,0 metros de altura nas trilhas, junto às fontes de alimento (plantas com flores, frutos e animais domésticos) e foram vistoriadas a cada 30 minutos.

Depois de capturados, os morcegos foram triados e mantidos vivos individualmente em sacos de pano e levados base de estudo onde foram fotografados e identificados, feito anotações referentes às coletas, tais como: data, local, hora, número de captura e ambiente. Alguns exemplares de cada espécie capturada, além de indivíduos mortos durante o manuseio serviram de espécime-testemunho e foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA GENBIMOL e posteriormente serão depositados na Coleção de Vertebrados da UFMA, Campus Chapadinha/MA. Os morcegos foram anestesiados com ketamina para a coleta dos dados e posteriormente eutanasiados, fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70%. O número definitivo de exemplares por espécie a ser depositado em coleção obedeceu a licença de coleta/transporte obtida junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

A identificação dos espécimes foi realizada com base em chaves de classificação especializada (UIEDA et al., 2006; MIRANDA et al., 2011; REIS et al., 2011).

4.4 Isolamento de *Trypanosoma*

Para isolamento das espécies de tripanossomas o sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca e imediatamente inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base suplementada com 15% sangue de

coelho) e fase líquida de meio LIT (Liver Infusion Tryptose contendo soro fetal bovino e antibióticos). As hemoculturas foram mantidas em temperatura ambiente de 27°C e foram analisados semanalmente por 30 dias. Em caso de positividade, eram feitos repliques de duas a três hemoculturas novas (MARCILI et al., 2013).

4.5 Esfregaço Sanguíneo

O sangue obtido foi utilizado para a confecção de esfregaços sanguíneos em triplicata, em camada delgada, por amostra que foram fixados com metanol, corados com Giemsa e analisados com microscópio óptico no aumento de 40x e 100x. As lâminas de esfregaço foram percorridas por completo em busca de formas tripomastigotas dos parasitos.

4.6 Extração de DNA e Reações de amplificação

A extração dos tecidos de baço, fígado e sangue foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit Genejet Genomic DNA purification® (thermo Scientific, UAB, Lihuania) com a incubação prévia de 0,5g de tecido e 20µL da enzima proteinase K (20mg/ml) e 700µL solução de lise.

Os oligonucleotídeos e condições das reações que foram utilizadas para a amplificação da SSU rDNA, gGAPDH estão descritos em trabalhos anteriores (MARCILI et al., 2009; HAMILTON et al., 2004) e o gene que codifica a quitinase de espécies de *Leishmania* (Quit224Fow GTTCMACTACGAGGCCTTCTTCA e Quit1182R CAGATCATTATCCCAGACAAGTT- 3min 94 °C/40x 94°C 30 seg; 64°C 30 seg; 72°C 30 seg/7 min 72°C) e que amplifica um fragmento de 900 pares de bases.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 50 V/100 mA, corado com Syber Safe (Invitrogen) e a visualização das bandas fotografados em transiluminador de luz U.V.

4.7 Purificação e sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste em Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Depois de purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com

especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI *PRISM* 3500 (Life Technologies).

4.8 Análises das sequências

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, Wis.) e submetidas a análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST two sequences analysis) (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostra

Foram capturados 82 quirópteros (tabela 1), com um esforço de captura de 5 redes-noite, para a pesquisa da infecção natural por *Trypanosoma* sp., representando três famílias (Vespertilionidae., Molossidae, Phyllostomidae). Destes, 24 (28,3%) morcegos foram oriundos do município de Godofredo Viana-MA, sendo, 23 animais da família Phyllostomidae e 1 da família Vespertilionidae. No município de Turiaçu – MA foram capturados 14 (16 %) morcegos, todos da família Phyllostomidae, das seguintes espécies: *Artibeus fimbriatus*, *Dermanura gnoma* e *Uroderma bilobatum*. No município de Candido Mendes- MA foram capturados 26 (33,3%) morcegos sendo 25 da família Molossidae das espécies *Molossus* sp. e 1 da família Phyllostomidae. No município de Carutapera- MA foram capturados 18 (20,9%) morcegos, todos da família Phyllostomidae das espécies *Artibeus* sp., *Carollia* sp., *Glossophaga soricina* e *Dermanura* sp.

Tabela 1: Relação de famílias de morcegos encontradas em quatro municípios do maranhão entre março de 2017 e abril de 2018.

Família	Turiaçu	Candido Mendes	Godofredo Viana	Carutapera	TOTAL
Phyllostomidae	14	1	23	18	53
Molossidae	0	25	0	0	25
Vespertilionidae	0	0	1	0	1
Total	14	26	24	18	82

Dentre as espécies de morcegos registradas em todas as áreas destacaram-se, pela frequência com que foram encontradas espécie *Molossus molossus* representando 29,6% (24/82) e espécie *Artibeus* sp. 32% (26/82) do total de amostras capturadas, seus hábitos alimentares são exclusivamente de insetos para a família Molossidae e predominantemente frutívoros para morcegos das espécies *Artibeus* sp.

A frequência de espécies da família phyllostomidae capturadas é decorrente de sua grande diversidade presente no Brasil, onde é representando por cerca de 57% das espécies possuindo diversos hábitos alimentares, sendo apontados na literatura como cruciais para a dinâmica de florestas tropicais, por serem os principais dispersores de sementes de muitas plantas (REIS, 2011).

Um estudo realizado por Dario et al. (2017) 186 morcegos foram capturados no estado do Espírito Santo sendo *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata* as espécies mais

frequentemente capturadas e *Carollia perspicillata* a principal espécie de morcego, apresentando maior número de indivíduos infectados por *Trypanosoma* sp.

Santos et al. (2017) realizou um estudo sobre a Importância de Chiroptera na manutenção de espécies de *Trypanosoma* no Estado do Acre. Os morcegos foram coletados em quatro expedições realizadas em uma floresta urbana e uma área mais preservada os municípios de Rio Branco e Xapuri, respectivamente. No total, foram examinados 367 morcegos de 23 gêneros e 32 espécies, sem diferença significativa entre o número de quirópteros capturados nas duas áreas. A composição da quiropterofauna foi específica para cada município, embora *Artibeus* spp. e *Carollia* spp. tenham prevalecido em ambas as áreas.

Além disso, trabalhos realizados em diversos biomas corroboram com o padrão de espécies capturadas, sendo a maioria de animais da família Phyllostomidae (LOURENÇO et al 2017, CAVAZZANA et al., 2010)

5.2 Hemoculturas e Esfregaços sanguíneos

De 81 culturas semeadas em meio de cultura, em 4 (4, 94%) evidenciou-se formas flagelares similares a *Trypanosoma*, entretanto, não foram estabelecidas e mantidas em laboratório, sendo o tempo de sobrevivência e crescimento na cultura em LIT insuficiente para a extração de DNA. Para Lemos et al. (2014) vários fatores podem afetar o crescimento da cultura em meios, dentre eles fatores intrínsecos como a não adaptação do parasita ao meio, a ocorrência de cultura mista, ou extrínseco como a contaminação por fungos ou bactérias.

Os morcegos que foram positivos na cultura pertenciam as seguintes espécies: *Molossus molossus* (família Molossidae), *Dermanura cinerea* e *Artibeus fimbriatus* (família Phyllostomidae).

A morfologia das hemoculturas positivas foi compatível com o gênero *Trypanosoma* e com formas tripomastigotas em culturas, semelhante ao subgênero *Schizotrypanum*. Szpeiter et al (2017) em estudo realizado no Pará observou uma prevalência dos tripanossomas de morcegos, avaliada por hemocultura de 9% de culturas para 111 morcegos encontrando amostras semelhantes a parasitos do subgênero *Schizotrypanum* de morcegos das famílias Emballonuridae, Molossidae e Phyllostomidae. No Brasil, pelo menos dez espécies já foram registradas em morcegos,

especialmente nos subgêneros *Herpetosoma* e *Schizotrypanum* (HOARE 1970, MAIA DA SILVA et al., 2009; CAVAZZANA et al., 2010; JANSEN et al., 2015).

Estes resultados diferem de Costa et al. (2015) que trabalhando com animais silvestres em seis municípios do Estado do Maranhão, obtiveram, a partir de mamíferos da ordem Chiroptera, nove hemoculturas positivas, isoladas, criopreservadas e quando posicionados na filogenia foram agrupados como *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi*. Esta diferença pode ter ocorrido porque alguns dos tripanosomatídeos detectados pela PCR e não isolados em hemocultura podem ter exigências nutricionais não contempladas no meio de cultura empregado. Estudos avaliando os meios de cultura in vitro mais apropriados para espécies de tripanossomatídeos em morcegos são necessários para otimizar o uso deste método de isolamento, já que em estudos realizados em diversas regiões do país, foram relatados uma frequência de 20 a 35% das culturas positivas que não geraram isolados (CAVAZZANA et al., 2010; ACOSTA et al., 2014; COSTA et al., 2014).

Em estudo realizado por Lisboa et al. (2008), 14 amostras de *Trypanosoma cruzi* foram isoladas de morcegos nas regiões da Amazônia, Cerrado e Pantanal, demonstrando a importância do monitoramento desses animais, principalmente nos ambientes peridomésticos. Em diferentes regiões do Brasil, *Trypanosoma cruzi* foi isolado de morcegos com hábitos alimentares frugívoros (*Artibeus* sp.) e misto (*Phyllostomus* sp.) (LISBOA et al. 2008).

Já Lourenço et al (2017) trabalhando 138 hemoculturas onde nove (6,5%) foram positivas para tripanossomatídeos, cinco de *Carollia perspicillata*, duas de *Diphylla ecaudata* ,uma de *Phyllostomus hastatus* e uma de *Artibeus planirostris*. A análise dos parasitas da hemocultura mostrou flagelados morfologicamente semelhantes a *Typanossoma rangeli* e *Trypanossoma dioniisi*, confirmados por métodos moleculares.

O grau de parasitemia que morcegos e, portanto, a capacidade de infectar vetores, ainda não foi bem estudada, entretanto, isolamento via hemocultura de *T. cruzi* a partir de sangue de morcegos da América Central e do Sul mostra seu status como reservatório nessas áreas (CAVAZZANA et al., 2010; LIMA et al., 2012; PINTO et al., 2015).

Das 246 lâminas de esfregaço sanguíneo analisadas em nenhuma foi observada formas que se assemelhasse à tripomastigotas do parasito que era o objetivo da leitura, assim como Lourenço et al (2017) também não encontraram parasitas em amostras de sangue de 146 morcegos.

A ausência de tripomastigotas nas lâminas de esfregaço sanguíneo em indivíduos positivos pela PCR pode ser explicada pela baixa parasitemia encontrada nesses mamíferos (HOARE, 1973; MARCILI, 2008; LIMA, 2011), onde apenas uma gota de sangue não foi suficiente para a detecção nas lâminas. Pesquisas posteriores de tripanossomas em morcegos utilizaram quase exclusivamente amostras de sangue periférico e é possível que o uso da punção cardíaca seja menos sensível para a detecção de espécies de tripanossoma (GORCHAKOV et al., 2016) o que pode ser explicado também a ausência das formas tripomastigostas nos esfregaços sanguíneos.

Fredy et al. (2018) encontraram a prevalência de *Trypanosoma* sp. e *T. cruzi* por microscopia de 37,8% (42/111) e 1,8% (2/111), respectivamente. A frequência de *Trypanosoma* sp. foi semelhante entre morcegos hematófagos (38,8%, 26/67) e não hematófagos (36,3%, 16/44) realizados em Lima-Peru usando a mesma metodologia de coleta e e coloração das lâminas.

No Equador, Pinto et al. (2015) capturaram 74 morcegos e o sangue foi retirado e inoculado em meio bifásico Novy-Nicolle-MacNeal, que resultou em 27 (36,5%) positivos para *T. cruzi* e um positivo para *T. cruzi rangeli*. Desses animais, todos os morcegos positivos foram negativos por microscopia direta, e os tripanossomas foram detectados apenas por PCR, como ocorreu nesse estudo onde não foram detectados formas tripomastigotas nos esfregaços e achados somente por PCR.

Apesar de não ter sido encontrado, tripomastigotas nas lâminas de esfregaço, foram encontradas formas semelhantes as amastigotas em algumas lâminas (Figura 2).

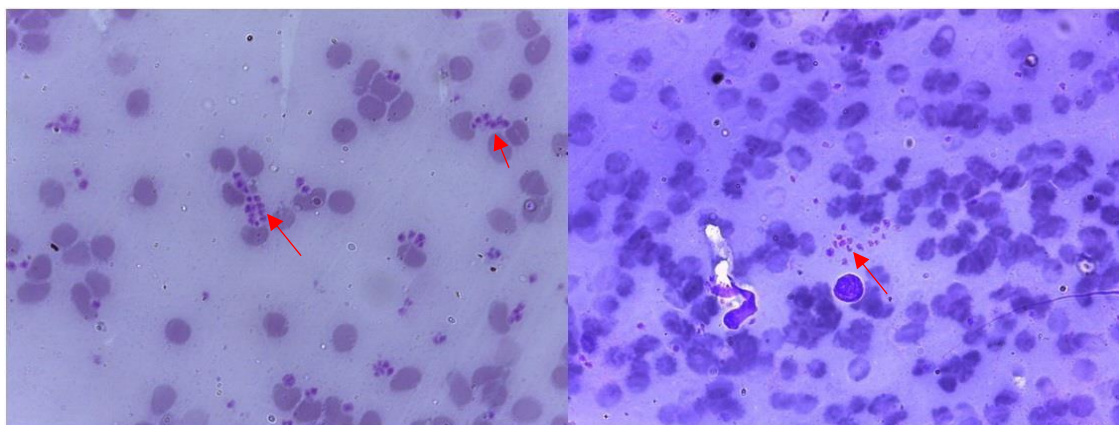


Figura 2. Formas amastigotas em esfregaços sanguíneos

5.3 Detecção molecular de tripanossomatídeos em diferentes amostras biológicas de morcegos

Foram coletadas tecido do baço, fígado e sangue de todos os animais eutanasiados para o procedimento de diagnóstico molecular, perfazendo um total de 198 amostras (58 de fígado, 58 de baço, 82 de sangue).

Todas as 198 amostras foram submetidas a extração e PCR utilizando o DNA barcoding para tripanossomatídeos (V7V8) dos genes SSU rDNA, onde 44 apresentaram-se positivas sendo 17 de baços, 18 fígados e 9 sangues, resultando em uma taxa de infecção de aproximadamente 22% e 20 amostras apresentando bandas duplas, podendo ser sugerido uma coinfeção, uma vez que o marcador V7V8 é um gene que amplifica sequências de DNAs de parasito da família Trypanosomatidae.

As 44 amostras positivas para o gene SSU rDNA foram amplificadas por PCR para o gene gGAPDH, onde 27 (61,6%) foram positivas. No geral, das 198 amostras, 13,63% (27) podem ser consideradas positivas para *Trypanosoma* sp. Estes resultados encontram-se de acordo com o nível geral de detecção de tripanossomas em morcegos, encontrados em estudos do Brasil, Panamá, Equador e Colômbia que variou de 11 a 37%, quando utilizados esses genes (CAVAZZANA et al., 2010; COTTONTAIL et al., 2014; PINTO et al., 2015).

Uma frequência menor foi encontrada por Matthew et al. (2018) onde um morcego foi positivo para *T. cruzi* resultando em 0,27% prevalência nos 361 morcegos amostrados, porém usou genes específicos para esta espécie de *Trypanosoma* que não amplificam outras espécies.

Dos 82 morcegos capturados, 17 (20,73 %) apresentaram positivas para o gGAPDH, sendo todos eles da família Phyllostomidae, resultados superiores em comparação aos encontrados por Filgueiras et al. (2018) onde 182 morcegos pesquisados nas reações de PCR, em apenas um *Carollia perspicillata* (0,5%), espécie pertencente a família Phyllostomidae, foi detectado positividade no estado do Acre que faz parte do Bioma amazônico.

Um total de 115 morcegos foram capturados em três áreas amazônicas de Província de Chapare, Bolívia. Todos 18 tripanossomas isolados neste estudo foram recuperados de morcegos pertencentes a *C. Perspicillata* (GARCIA et al., 2012).

As amostras positivas para ambos os genes foram sequenciadas, porém algumas das sequências geradas não tiveram qualidade satisfatória para identificar o parasito, e outras apesar de ter se obtido sequências de boa qualidade, não houve similaridade com nada

que já foi depositado no Genbank até o momento, devendo no futuro ser novamente amplificada e sequenciada para que possa ser feita análise de similaridade no GenBank e o posicionamento filogenético das espécies encontradas.

Das amostras que foram encontradas formas semelhantes as amastigotas no esfregaço sanguíneo, foram extraídos o DNA do sangue e tecidos e além de terem sido testados para a região V7V8 SSUrDNA e gGAPDH, foram testados também para o gene da quitinase.

As amostras positivas foram sequenciadas, sendo que no V7V8 das sequências geradas tiveram qualidade ruim, impossibilitando a comparação no GenBank ou qualquer outro banco de dados para sequências de nucleotídeos. O gGAPDH não teve amostras positivas e para o gene da quitinase, duas amostras foram positivas e quando sequenciadas e submetidos a análise BLAST apresentou 99% de similaridade com *Leishmania infantum* e 98% de similaridade com *Leishmania amazonensis*.

Estudos demonstraram que os morcegos podem ser fontes de alimento para *Lutzomyia longipalpis* em cavernas Venezuelanas (LAMPO et al., 2000). No Brasil, duas espécies de *Leishmania* foram identificadas em macerados fragmentados de baço e fígado de morcegos usando um nested PCR seguido por sequenciamento dos produtos amplificados. *Molossus molossus* e *Glossophaga soricina* foram infectados com *L. Infantum* e *L. amazonensis*, e este último também foi encontrado em *Molossus rufus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Eumops glaucinus*, *E. auripendulus*, *Artibeus literatus*, *Sturnira lilium* e *Myotis nigricans* (SAVANI et al., 2010). Também, *Leishmania* (*Viannia*) sp. foi detectado em uma lesão de pele *Glossophaga soricina* e sangue de *Molossus molossus* (SHAPIRO et al., 2013).

Berzunza (2015) que encontrou em análise por PCR dos tecidos retirados do coração, fígado, baço e pele de 420 morcegos onde 41 (9,77%) que deram positivo para o gênero *Leishmania*, dos morcegos infectados a maioria deles pertencia à família Phyllostomidae.

Os resultados deste estudos indicam que os quiróperos podem ser potenciais reservatórios para tripanossomatídeos, principalmente os de interesse para saúde pública e que podem participam do ciclo silvestres desses parasitos, ajudando a mantê-los na natureza e que existe uma grande possibilidade desses mamíferos servirem como fonte de infecção para humanos ainda mais que na região de estudo, em 2005 houve um surto de raiva humana transmitida por morcego hematófago, onde 22 pessoas foram a óbito (SINAN NET,2019), evidenciando assim, a presença dos morcegos próximo a residência

humana e a possibilidade desses mamíferos servirem como fonte de infecção de *Leishmania* e *Trypanosoma* para humanos, caso haja a presença de insetos vetores na residência, trazendo riscos aos moradores. Assim, faz-se necessário pesquisas avaliando a infecção experimental de tripanossomatídeos em morcegos e a capacidade de ser infectante para flebotomíneos e triatomíneos, o que poderá demonstrar o papel destes hospedeiros na transmissão enzoótica desses parasitas.

O presente estudo amplia o conhecimento das espécies de tripanossomatídeos encontradas em morcegos no Estado do Maranhão e sua continuação irá contribuir para a análise da diversidade de tripanossomatídeos em morcegos do Nordeste, a qual ainda é pouco conhecida, visto que a maioria dos estudos relacionados ao tema é focada nas regiões Sudeste e Sudoeste do Brasil (SAVANI et al., 2010; JANSEN et al., 2015; LIMA, 2011; MARCILI et al., 2013; ACOSTA et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

1. As áreas de estudo apresentaram morcegos infectados por *Trypanosoma* spp. o que demonstra ampla circulação do parasito nessa região no Estado do Maranhão e a participação desse grupo de mamíferos nos ciclos silvestres desses parasitos.
2. Quatro culturas foram positiva para *Trypanosoma* spp., porém não foi estabelecida e mantidas em laboratório.
- 3- Não foi possível a caracterização morfológica e molecular do parasita, uma vez que não houve crescimento do parasita em meio de cultura e não se encontrou formas compatíveis com tripomastigotas no esfregaço sanguíneo.
- 4- A caracterização molecular realizada através da amplificação por PCR do gene SSU rRNA e gGAPDH revelaram amostras positivas para *Trypanosoma* sp., confirmando ser uma técnica eficaz para o diagnóstico de tripanossomatídeos em morcegos, mesmo quando apresentam baixa parasitemia, porém a sequências geradas não tiveram boa qualidade, impossibilitando a comparação no GenBank ou qualquer outro banco de dados para sequencias de nucleotídeos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA IC, COSTA AP, GENNARI SM, MARCILI A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic rainforest fragment and surroundings in the state of Espírito Santo, Brazil. **J Med Entomol**; v. 51, n.3, p. 686-693,2014.
- ALTSCHUL, S. F. I. Basic local alignment search tool. **J. Molecular. Biology**. n. 215, p. 403–410, 1990
- ADAMS, E. R.; HAMILTON P.B.; RODRIGUES A. C.; MALELE, II, DELESPAUX V, TEIXEIRA MM, GIBSON W. New *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* genotypes from tsetse flies in East Africa. **Parasitology**. v. 137, n. 4, p. 641-50, 2010a.
- ALESSANDRA FILGUEIRAS, JULIANA HELENA DA SILVA BARROS, SAMANTA C.C. XAVIER, SORAIA FIGUEIREDO DE SOUZA, LUCIANA DOS SANTOS MEDEIROS, VANIA MARIA FRANC, A RIBEIRO, ANA MARIA JANSEN, ANDRÉ LUIZ R. ROQUE. Natural *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* (Steel,1885) infection among mammals from Brazilian Amazon.**Acta Tropica**. 2018
- BERZUNZA-CRUZ M.; RODRÍGUEZ-MORENO Á; GUTIÉRREZ-GRANADOS G, GONZÁLEZ-SALAZAR C, STEPHENS C.R; HIDALGO-MIHART M, ET AL.; (2015) *Leishmania* (L.) *mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. **PLoS Negl Trop Dis** 9(1):
- BAKER, J.R. The origins of parasitism in the protists. **International Journal of Parasitology Research**., v. 24, n.8, p.1131-1137, 1994.
- BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, **Museu Nacional**, 2007.
- CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**, v. 14, p. 461-81, 1981.
- BUSSE, I; PREISFELD, A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 617-24, 2003.
- BRANDÃO, A.A; MIRANDA, A.; DEGRAVE, W. M.; SOUSA, M. A. The heterogeneity of choanomastigotes hapod trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implicaitons. **Parasitology Research**, v. 86, n.10, p. 809-12, 2001.
- BREGLIA, S. A.; SLAMOVITS, C. H; LEANDER, B. S. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 86-92, 2007.
- BOWER, S.M.; WOO, P.T. Immunological comparison of four *Trypanosoma* spp. (subgenus *Schizotrypanum*) from bats. **Parasitology**. v.4, p. 85:111, 1982.

CAMARGO, E. P. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1998.

COTTONTAIL, V.M., KALKO, E.K.V., COTTONTAIL, I., WELLINGHAUSEN, N., TSCHAPKA, M., PERKINS, S.L., PINTO, C.M., 2014. High Local Diversity of Trypanosoma in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the T. cruzi Clade. **PLoS ONE** 9

CARTAYA, J. T. Neuva filaria y otros parasitos en la sangre del murcielgo Artibeus peripilatus. **Rev Sanid Benef Minic**. 1910; 3:503-6.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**. 1981;14:461-81.

CAVAZZANA, JR. M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; DA SILVA, F.M.; JUNQUEIRA, A.C.; VELUDO, H.H.; VIOLA, L.B.; CAMPANER, M.; NUNES, V.L.; PAIVA, F.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P. TEIXEIRA, M. M. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. **International Journal of Parasitology Research**, 40 (2010). p. 345-355.

COSTA, A. P; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; DE CARVALHO ARAÚJO, A.; DA SILVA FERREIRA, J. I.; TONHOSOLO, R.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.15, n.12, p. 765-774; 2015.

DARIO M. A; MORATELLI R; SCHWABL P; JANSEN A. M; LLEWELLYN M. S. Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.11, n.7, 2017.

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DAVILA, A.M. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 610-4, 2001.

DIAS E. On a Schizotrypanum from a bat of Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**.; v. 27, n.2, p. 143- 8. 1933

DIAS, E. Revisão geral dos hemoflagelados de quirópteros. 9a. **Reunião Sociedade argentina de Patologia Regional do Norte**, v.1, p. 10-88, 1936.

ESBÉARD, C.E.L., LUZ, J.L., COSTA, L.M. & BERGALLO, H.G. 2014. Bats (Mammalia, Chiroptera) of an urban park in the metropolitan area of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v.104, n.1,p.59-69

FREDY E. VILLENA; LUIS A. GOMEZ-PUERTA; ERIK J. JHONSTON; O. MELISA DEL ALCAZAR; JORGE L. MAGUIÑA; CHRISTIAN ALBUJAR; V. ALBERTO LAGUNA-TORRES; SERGIO E. RECUENCO; SARAH-BLYTHE BALLARD; AND JULIA S.

AMPUERO. First Report of *Trypanosoma cruzi* Infection in Salivary Gland of Bats from the Peruvian Amazon. **Journal Tropical Medicine**. v.99, n.3, 2018

FABIÁN M.E. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma*. **Cadernos de Saúde Pública**.; v.7, n.1, p.69-81; 1991.

FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L.B.; TAKATA, C.S.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, p. 1623-38, 2007.

FERREIRA, R. C.; SOUZA, A.; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; BARRETTI, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in brazilian Amazonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.55, n.5, p. 427-445, 2008.

FLORES-CRESPO, R.;LINHART, S.B., BURNS, R.J. & MITCHELL, G.C. 1972. Foraging behavior of the common vampire bat related to moonlight. **Journal Mammal.**, v.53,n.3, p. 366-368.

FUNAYAMA, G. K.; BARRETO, M. P. Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LIV. Natural bat infection, *Epitesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) by *T. cruzi*. **Revista Brasileira Biologia**. v. 33, p. 439-44,1973.

GARCIA L, ORTIZ S, OSORIO G, TORRICO MC, TORRICO F, ET AL. Phylogenetic Analysis of Bolivian Bat Trypanosomes of the Subgenus *Schizotrypanum* Based on Cytochrome b Sequence and Minicircle Analyses. **PLoS ONE**. v.7, n .5, 2012

GARDNER, R. A.; MOLYNEUX, D. H. *Trypanosoma (Megatrypanum) incertum* from *Pipistrellus pipistrellus*: development and transmission by cimicid bugs. **Parasitology**. 1988; 96, 433-47.

GORCHAKOV, R., TROSCLAIR, L.P., WOZNIAK, E.J., FERIA-ARROYO, P.T., GARCIA, M.N., GUNTER, S.M., MURRAY, K.O. *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence and Bloodmeal Analysis in Triatomine Vectors of Chagas Disease From Rural Peridomestic Locations in Texas, 2013- 2014. 2016

GRISARD E.C.; STURM N. R. ; CAMPBELL D.A; A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. **Parasitology**. 2003;127:265–271

HERRERA, L.; DAS CHAGAS, X. S.; VIEGAS, C.; MARTINEZ, C.; COTIAS, P. M.; CARRASCO, H.; URDANETA-MORALES, S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Experimental Parasitology**. v. 107, n.1-2, p. 78-88, 2004.

HODO, C. L.; GOODWIN, C. C; MAYES, B. C; MARISCAL, J. A; WALDRUP, K. A.; HAMER, S. A. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. **Acata Tropica**. 2016

HAMILTON P.B. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? **Trends Parasitology**;v.28, n.5, p.173, 2012b

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GAUNT, M.W.; GIDLEY, J.; GIBSON, C.W. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.1393-1404, 2004.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 431-43, 2005 a.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; COOKE, B.; BOAG, B.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3167-76, 2005 b.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, P.B.; ADAMS, E.R.; NJIOKOU, F.; GIBSON, W.C.; CUNY, G.; HERDER, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81-6, 2009.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 431-43, 2005 a.

HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends in Parasitology**, v.28, p.136–141, 2012a.

HOARE, C.A. **The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Part 2 Systematic**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. P.123-625, 1972.

HOARE C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. **Journal Protozoology**. v.11, p. 200–207, 1964

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

KAUFER, A. et al The Evolution of Trypanosomatid Taxonomy. **Parasit Vectors** 10 (1), 287. 2017 Jun 08

LAMPO, M., FELICIANGLI, M.D., MARQUEZ, L.M., BASTIDAS, C., LAU, P., A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.62, p.718–719, 2000.

LEONARD G.; SOANES D.M.; STEVENS J. R. Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. **Infections, Genetics and Evolution.** v.11, n.5, p. 955-9, 2011.

LUKES J.; SKALICKY T.; TYC J.; VOTÝPKA J, YURCHENKO V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology.** P.18, 2014

LUKES J, HASHIMI H, ZIKOVA A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. **Current Genetic.** v.48, n.5, p.277-99, 2005.

LUN, Z.R.; LAI, D.H.; LI, F.J.; LUKES, J.; AYALA, F.J. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. **Trends Parasitology**, v. 26, n. 9, p. 424-7, 2010.

LIMA, L.; SILVA, F. M.; NEVES, L.; ATTÍAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. **The Protis**, v. 163, n. 6, p. 856-72, 2012.

LIMA L. ORTIZ P.A.; DA SILVA F.M.; ALVES JM, SERRANO M.G.; CORTEZ A.P.; ALFIERI S.C.; BUCK G. A.; TEIXEIRA M. M.; Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. **Plos One.** v.7, n.6: e3838, 2012a.

LIMA VS, JANSEN AM, MESSENGER LA, MILES MA, LLEWELLYN MS. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. **Parasit Vectors.** 2014;7(1):263

LIMA, L. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África) Tese (**Doutorado**) – Universidade de São Paulo – SP. 2011. 73 f.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C.

S.; CAMPANER, M.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the Trypanosomacruzi clade. **Parasites & Vectors**. v. 3, p. 221, 2013.

LIMA, L.; SILVA, F. M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. **The Protist**, v. 163, n. 6, p. 856-72, 2012.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ, P.A.; TREJO-VARÓN, J.A.; CARRANZA, J.C.; PINTO, C. M.; SERRANO, M. G.; BUCK, G.A.; Camargo, E.P. Teixeira, M. M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Trop**. 2015.

LISBOA C.V.; PINHO A.P.; HERRERA H. M.; GERHARDT M.; CUPOLILLO E, JANSEN A. M.; *Trypanosoma cruzi*(Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.156, p. 314–318, 2008.

JOÃO LUCAS M. LOURENÇO, THAÍS T.C. MINUZZI-SOUZAA, LARISSA R. SILVAA, AMANDA C. OLIVEIRAA VAGNER J. MENDONÇAA,C, NADJAR NITZB, LUDMILLA M.S. AGUIARD, RODRIGO GURGEL-GONÇALVES. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savannah. **Acta Tropica**. v. 177, 2017.

MATTHEW D. NICHOLS,^{1,2} WAYNE D. LORD,¹ MICHELLE L. HAYNIE,¹ ROBERT E. BRENNAN,¹ VICTORIA L. JACKSON,¹ AND WENDY S. MONTERROSO. *Trypanosoma cruzi* in a Mexican Free-Tailed Bat (*Tadarida brasiliensis*) in Oklahoma, USA. **Journal of Wildlife Diseases**. v.55, n.2, 2018

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; DA SILVA, F. M.; PINTO A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *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 of Parasitology**.; v. 39, n.5, p. 615-23, 2009a.

MIRANDA, J. M. D.; BERNARDI, I. P.; PASSOS, F.C. Chave ilustrada para determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil. 2011. Curitiba.

MING LEI & DONG DONG. Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. **Scientific Reports**. v.6, n. 1, 2016.

MOLYNEUX, D.H. **Parasitic Protozoa**. 2nd ed. London: Academic Press; 1991. p. 195-223: Trypanosomes of bats.

MOLYNEUX DH. Trypanosomes of bats. In JP Kreier, JR Baker (eds), Parasitic Protozoa, 2nd ed, vol 1, **Academic Press, San Diego**. p. 195-223,1991.

MARINKELLE, C.J. The Biology of the Trypanosomes of Non-Human Primates. In: Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the kinetoplastida. **London: Academic Press**. p. 218-48,1976.

MARINKELLE C.J. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. **Revista de Biología Tropical**. v.30, n.2, p.107-11, 1982a.

MARINKELLE C.J. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**.v.76, p.125–134, 1982.

MONTEIRO W. M, MARGIOTO TESTON A. P, GRUENDLING A. P, DOS REIS D, GOMES M. L, DE ARAUJO S. M, BAHIA M. T, MAGALHAES L. K, DE OLIVEIRA GUERRA J. A, SILVEIRA H, TOLEDO M. J, VALE BARBOSA M. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. **Plos Neglected Tropical Diseases**.v.7, n.2, e2069, 2013.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v. 128, Pt 3, p. 283-94, 2004 a.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-61, 2004b.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; ORTIZ, P.A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAO-DIAS, J.L.; et al. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *lewisii* from domestic rats to primates. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 522-9, 2010.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A.C.; VELUDO, H.H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V.L.; TEIXEIRA, M.M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641-55, 2009 a.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; BATISTA, J.S.; JUNQUEIRA, A.C.; SOUZA, A.I.; DA ROSA, J.A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular**

epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, v. 9, n. 6, p. 1265-74, 2009 b.

MARCILI A, DA COSTA AP, SOARES HS, ACOSTA I DA CL, DE LIMA JTR, MINERVINO AHH, et al. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, **Brazil**. **J Parasitol**. 2013;99: 1071–1076. pmid:23859496

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.; DA SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, M.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M. *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**, v. 39, n. 5, p. 615-23, 2009 c.

MICHELS, P.A.; POLISZCZAK, A.; OSINGA, K.A.; MISSET, O.; VAN BEEUMEN, J.; WIERENGA, R.K.; BORST, P.; OPPERDOES, F.R. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, v. 5, n. 5, p. 1049-56, 1986.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2211-9, 2001.

MASLOV DA, VOTÝPKA J, YURCHENKO V, LUKES J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol*. 2013;29(1):43-52.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.

NOGUEIRA, N.R. DE LIMA, I.P. MORATELLI, R., TAVARES, V..C, GREGORIN, R. & PERACCHI., A.L. 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List* 10 (4): 808-821.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B JR.; DEERFIELD, D. W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **Embnew News**. v.4 p. 14, 1997.

PODLIPAIEV, S. A. Catalogue of world fauna of trypanosomatidae (Protozoa). *Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences*. Leningrad, v. 217, p. 1-177, 1990.

PORCEL BM, DENOEUDE F, OPPERDOES F, NOEL B, MADOUY MA, HAMMARTON TC, FIELD MC, DA SILVA C, COULOUX A, POULAIN J, KATINKA M, JABBARI K, AURY JM, CAMPBELL DA, CINTRON R, DICKENS NJ, DOCAMPO R, STURM NR, KOUMANDOU VL, FABRE S. The streamlined

genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. **Plos Genet.** v. 10, n.2, e1004007, 2014.

PEACOCK L, COOK S, FERRIS V, BAILEY M, GIBSON W. The life cycle of *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* in the tsetse fly. **Parasity Vectors.**v.5, p.109, 2012

PINTO CM, OCAÑA-MAYORGA S, TAPIA EE, LOBOS SE, ZURITA AP, AGUIRRE-VILLACÍS F, ET AL. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. **Plos One.** V.10, n.10,p. 2-4 , 2015

PAGLIA, A.P., FONSECA, G.A.B. da, RYLANDS, A. B., HERRMANN, G., AGUIAR, L. M. S., CHIARELLO, A. G., LEITE, Y. L. R., COSTA, L. P., SICILIANO, S., KIERULFF, M. C. M., MENDES, S. L., TAVARES, V. da C., MITTERMEIER, R. A. & PATTON J. L. 2012. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil** / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição / 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp.

RAGONE PG, PÉREZ BRANDAN C, PADILLA AM, MONJE RUMI M, LAUTHIER JJ, ALBERTI D'AMATO AM, TOMASINI N, CIMINO RO, ROMERO NM, PORTELLI M, NASSER JR, BASOMBRIO MA, Diosque P. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. **Acta trop.**v.123, n.3, p.196-201, 2012.

RAMÍREZ JD, HERNÁNDEZ C, MONTILLA M, ZAMBRANO P, FLÓREZ AC, PARRA E & CUCUNUBÁ ZM. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. **Zoonoses Public Health.** v.61, n.7, p.477-9, 2014.

ROQUE, A.L.R. & JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americans. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.** v.3, p. 251-262., 2014.

REIS, N. R; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds), 2011. **Mamíferos do Brasil.** Londrina. 2ª ed. 439p.

RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; TEIXEIRA, M.G. Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215-24, 2006

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics.** v.19. p.1572-1574, 2003.

ROTUREAU, B.; Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.74, p. 81–96, 2006.

SVOBODOVÁ , M.; ZÍDKOV , L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKES, J.; VOT PKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a

parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 423 -432, 2007.

SANTOS, A. L.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ELIAS, C. G.; Vermelho, A. B.; Branquinha, M. H. *Phytomonas* serpens: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v. 9, n.8, p. 915-921, 2007.

SANTOS, F.C.B. **Importância de Chiroptera na manutenção de espécies de Trypanosoma (Trypanosomatida e Trypanosomatidae) no estado do Acre** – 145f, Rio de Janeiro – 2017. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz – Pós graduação em Biologia Parasitária, 2017.

SARATAPHAN, N.; VONGPAKORN, M.; NUANSRICHAY, B.; AUTARKOOL, N.; KEOWKARNKAH, T.; RODTIAN, P.; STICH, R. W.; JITTAPALAPONG, S. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1118-1121, 2007.

SAVANI, E.S., DE ALMEIDA, M.F., DE OLIVEIRA CAMARGO, M.C., D'AURIA, S.R., SILVA, M.M., DE OLIVEIRA, M.L., et al., Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonenses* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**. 168, p. 5–10, 2010.

SHAPIRO, J.T., DA COSTA LIMA JUNIOR, M.S., DORVAL, M.E., DE OLIVEIRA, F.A., CEPA MATOS, M.F., BORDIGNON, M.O.; First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Trop.** 128, p. 171–174, 2013.

SINAN NET. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019. 61 p. Disponível em: <http://http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanwin/cnv/raivama.def>

STEVENS J, RAMBAUT A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. **Infect Genet Evol.**v.1, n.2, p.143-50, 2001.

STEVENS J. R, TEIXEIRA M. M, BINGLE L. E, GIBSON W.C. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal of Parasitology**. 1999b;29(5):749- 57.

STEVENS, J. R., NOYES, H. A., SCHOFIELD, C. J., GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v.48, p.1-56, 2001.

STEVENS, J.R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226-32, 2008.

STEVENS, J.R.; GIBSON, W.C. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**. 1999;15:432-7.

- STEVENS J, NOYES H, GIBSON W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v.93 n.5, p.669-76, 1998.
- SIMMONS, N. B. Chiroptera. Pp. 159-174 in: Origins of the major clades of placental mammals (K. Rose and D. Archibald, eds.). **Johns Hopkins University Press**. 2005.
- SIMMONS, N. B.; VOSS, R. S. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1. Bats. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.237, p. 1-219, 1998.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.
- SEKIAMA, M.L.; REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; ROCHA, V.J. Morcegos do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná (Chiroptera, Mammalia), **Revista brasileira de Zoologia**. v.18, n.3, p.749 – 754, 2001.
- FREDY E. VILLENA; LUIS A. GOMEZ-PUERTA; ERIK J. JHONSTON; O. MELISA DEL ALCAZAR; JORGE L. MAGUIÑA; CHRISTIAN ALBUJAR; V. ALBERTO LAGUNA-TORRES; SERGIO E. RECUENCO; SARAH-BLYTHE BALLARD AND JULIA S. AMPUERO. First report of trypanosoma cruzi infection in salivary gland of bats from the peruvian amazon, **Journal Tropical Medicine**.v.99, n.3, p. 723–728, 2018
- SWOFFORD, J. R. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sunderland: **Sinauer Associates**. 1998.
- TEIXEIRA, M. M. G.; BORGHESAN, T. C.; FERREIRA, R. C.; SANTOS, M. A.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; Milder, R. V.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, v. 162, p. 503524, 2011.
- THOISY B, BOURHY H, DELAVAL M, PONTIER D, DACHEUX L, DARCISSAC E, DONATO D, GUIDEZ A, LARROUS F, LAVENIR R, SALMIER A, LACOSTE V, & LAVERGNE A. 2016. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. **Plos Neglected Tropical Diseases**. Jan 25;10(1)
- THOMAS, M.E, RASWEILER, IV J.J. & D'ALESSANDRO, A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102 (5): 559-565.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**. 1997. 25 4876-4882.
- TRUC P, TIOUCHICHINE ML, CUNY G, VATUNGA G, JOSENANDO T, SIMO G,

- HERDER S. Multiple infections of *Trypanosoma brucei gambiense* in blood and cerebrospinal fluid of human African trypanosomiasis patients from Angola: consequences on clinical course and treatment outcome. **Infect Genet Evol.** 2012;12(2):399-402
- UIEDA, W. Período de atividade alimentar e tipos de presa dos morcegos hematófagos (Phyllostomidae) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira Biologia** 1992. 52(4): 563-573.
- UIEDA, W. História natural dos morcegos hematófagos no Brasil. In: Pacheco, S.; Marques, R. & Esberard, C.E.L. (orgs.). 2008. **Morcegos no Brasil. Porto Alegre**, Ed. Armazem
- UIEDA, W; Ester, M.; Santos, C. F. **Chave de Campo para Identificação de Morcegos Brasileiros**. 2006. v. 100, n. 4, p. 1-3.
- VOTÝPKA J.; SUKOVÁ E.; KRAEVA N.; ISHEMGULOVA A.; DUŽÍ I.; LUKEŠ J.; YURCHENKO V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, p. 763-81. 2013.
- VOSS, R.S.; EMMONS, L.H. Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, 1996.v.230, p1-115.
- VIRREIRA M, SERRANO G, MALDONADO L, SVOBODA M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. **Acta tropica**. 2006;100(3):252-5.
- VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMDSEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). Biology of the kinetoplastida. New York: Academic Press, p. 1-34.1976.
- VIOLA, L.B.; ATTÍAS, M.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake *Trypanosomes*: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 594-602, 2009 a.
- VIOLA, L.B.; ALMEIDA, R.S.; FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v. 136, p. 55-65, 2009 b.
- ZINGALES B, MILES MA, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM,

TEIXEIRA MM, SCHIJMAN AG, LLEWELLYN MS, LAGES-SILVA E, MACHADO CR, ANDRADE SG, STURM NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection Genetic Evolution**.v.2, n.2, p. 240-53 2012

ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MR, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO AM, MACHADO CR, MILES MA, ROMANHA AJ, STURM NR, TIBAYRENC M, SCHIJMAN AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2009;104(7):1051-4.