



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

*Trypanosoma* spp EM CÃES RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL

LUCAS PINTO FERES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA-DF  
DEZEMBRO DE 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

*Trypanosoma* spp. EM CÃES RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL

Aluno: Lucas Pinto Feres

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Giane Regina Paludo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO:

BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO DE 2017

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO**

FERES, L. P. *Trypanosoma spp. em cães residentes no Distrito Federal*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 60p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa Dissertação de Mestrado pode ser reproduzida sem a autorização escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Feres, Lucas Pinto.

*Trypanosoma spp. em cães residentes no Distrito Federal*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 60p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2017.

1. *Trypanosoma spp.* 2. Cães. 3. PCR baseada em rDNA. 4. Polimorfismo  
5. Distrito Federal.

I. Paludo, Giane Regina, orientadora.

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

*Trypanosoma* spp. EM CÃES RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL

LUCAS PINTO FERES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS  
COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADO POR:

---

GIANE REGINA PALUDO, Doutora (Universidade de Brasília)  
ORIENTADOR

---

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Doutora (Universidade de Brasília)  
EXAMINADOR EXTERNO

---

DANIELI BROLO MARTINS, Doutora (Universidade Federal de Goiás)  
EXAMINADOR EXTERNO

BRASÍLIA/DF, 19 de Dezembro de 2017

Dedico...

Aos dois Grandes amores da minha vida. Tudo por vocês.  
Papai te ama.

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, sem Ele não somos nada.

À minha família, por toda a dedicação, paciência, compreensão.

À minha orientadora, Giane, pela paciência dedicação e orientação mesmo nos momentos mais apertados.

À toda equipe do laboratório de patologia clínica veterinária da UnB, especialmente à Marcela. Sem vocês não teria chegado até aqui.

À UnB que me acolheu e me presenteou com essa oportunidade

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos Gerais	3
1.2 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Família Trypanosomatidae	4
2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.1.2 <i>Trypanosoma (Trypanozoon) evansi</i>	10
2.1.3 <i>Trypanosoma caninum</i>	12
2.1.4 <i>Trypanosoma rangeli</i>	13
2.2 DIAGNÓSTICO DAS TRIPANOSOMÍASES	14
3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2 – <i>Trypanosoma</i> spp. EM CÃES RESIDENTES NO DISTRITO	24
FEDERAL	
1 RESUMO	25
2 ABSTRACT	26
3 INTRODUÇÃO	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1.1.1-Forma tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> ; A- esquemático; B e C - Microscopia óptica; Fonte: Coura et al; 2011.....	6
Figura 1.1.1.2 - Ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i> ; Fonte: Rassi et al, 2010.....	7
Figura 1.1.2.1 - Forma circulante do <i>Trypanosoma evansi</i> ; Fonte: Desquesnes et al, 2013.....	10
Figura 2.1.3.1 - <i>Trypanosoma caninum</i> : a, c, d, e, h, i – Epimastigotas;b, f – Esferomastigotas; g – Epimastigota em divisão; Fonte: Madeira et al, 2009.....	12
Figura 2.1 – Resultado da PCR para família Tripanosomatidae usando os oligonucleotídeos D75 e D76. Coluna 1: régua molecular (100 bp, Invitrogen®) Coluna 2: controle negativo (água); Coluna 3: Controle positivo; Colunas 4 a 11, 14 e 15: amostras negativas; Colunas 12 e 13: amostras positivas.....	33
Figura 2.2 - Resultado da PCR para <i>Leishmania</i> spp. usando os oligonucleotídeos FW e BW. Coluna 1: régua molecular (100 bp, Invitrogen®) Coluna 2 e 3: controle negativo (água); Colunas 3 a 12: amostras negativas; Colunas 13 e 14: controle positivo.....	36

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Tabela 2.1 – Distribuição de amostras positivas e negativas para <i>Trypanosoma</i> spp. (oligonucleotídeos D75 e D76) de acordo com habitat do cão</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 2.2 – Distribuição das amostras positivas e negativas para <i>Trypanosoma</i> spp. (oligonucleotídeos D75 e D76) dividido entre as regiões administrativas analisadas</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- bp- Pares de base
- CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DTUs – discrete typing unit
- DF – Distrito Federal
- ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática
- Epi - antígeno epimastigota
- fg - fentogramas
- IgG Imunoglobulina G
- IFI - Imunofluorescência indireta
- IHA - Imuno hemoaglutinação
- ITS – Espaços internos transcritos
- LAMP - loop-mediated isothermal amplification
- mM – micromóis
- MS – Ministério da Saúde
- MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio
- PCR – Reação de Cadeia de Polimerase
- Ras - Regiões administrativas
- rDNA – Ácido ribonucleico ribossomal
- RN - Recém Nascido
- SL – splice leader
- TESA - Antígeno secretado excretado por tripomastigota
- UnB - Universidade de Brasília
- WHO – Organização Mundial da Saúde

## RESUMO

Autor: Lucas Pinto Feres

Orientadora: Giane Regina Paludo

A Família Triponosomatidae compreende diversas espécies que infectam mamíferos, répteis peixes e plantas. As espécies que acometem cães no Distrito Federal são *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma evansi* e *Leishmania* spp. Sendo parasitas com abrangência epidemiológica por toda a América, a correta identificação das espécies mostra-se fundamental para o diagnóstico preciso e consequente abordagem terapêutica assim como estabelecimento de epidemiologia ecológica e genética populacional das diferentes linhagens de parasitas. Objetivou-se com esse estudo avaliar a ocorrência da infecção por *Trypanosoma* spp. em cães residentes no Distrito Federal (DF), Brasil e sua distribuição por região administrativa analisada e habitat. Para isso, foram analisadas por meio da PCR 206 amostras de sangue de cães residentes no DF. Dessas amostras, 16 (7,7%) foram positivas para a infecção por *Trypanosoma* spp. em diferentes habitats (domiciliar, peridomiciliar e rural ou silvestre) e regiões administrativas do DF, não demonstrando diferença ( $p > 0,05$ ) entre os habitats ou regiões estudadas. A ocorrência da infecção nas amostras estudadas demonstrou uma baixa taxa de infecção por *Trypanosoma* spp. na região do Distrito Federal.

### Palavras-chave:

1. *Trypanosoma* spp. 2. Cães. 3. PCR baseada em rDNA. 4. Distrito Federal. 5. Brasil

## ABSTRACT

The Family Tripanosomatidae comprises several species who infects mammals, reptiles, fishes and plants. The species who infect dogs in Federal District are *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania* spp. As parasites with epidemiological scope for all America continent, the right species' identification show itself fundamental for precise diagnosis as to provide the right therapeutic approach, ecological epidemiology and genetics population of the different parasites lineage. The research's objectives was to evaluate the occurrence of infection by *Trypanosoma* spp. in resident dogs on Federal District, Brazil for habitat and administrative region distribution. Were analyzed by PCR 206 dogs' blood samples residents in Federal District. These samples, 16 (7,7%) were positive for infection by *Trypanosoma* spp. in different habitats (domicile, peridomiciliary, and rural or wild) and administrative regions of Federal District, doesn't showing difference ( $p>0,05$ ) between the habitats or administrative regions. The occurrence of infection in studied samples reveal results bellow expectation for infection by *Trypanosoma* spp. in Federal District area.

### Key-words:

1. *Trypanosoma* spp. 2. Dogs. 3. rDNA based PCR. 4. Federal District. 5. Brazil

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Os protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma* spp. são agentes etiológicos de um grupo de doenças de grande importância no mundo e ao mesmo tempo são também das doenças mais negligenciadas (Rassi et al.; 2010, WHO, 2015; Kaufer et al., 2017). Estão presentes em todo o planeta principalmente entre as zonas tropicais e subtropicais, causando doenças como as tripanosomíases humana africana e americana em humanos e parasitando mais de 150 espécies de mamíferos, entre primatas não humanos e das ordens Xenartha, Didelphimorphia, Carnivora e Rodentia (Maia da Silva, 2004), incluindo-se aqueles de convívio doméstico, como o cão e o gato, (Zingales et al. 2012).

O cão é susceptível à infecção por diversas espécies de tripanosomídeos. *Trypanosoma cruzi* em cães, pode causar, dependendo da linhagem, doença de Chagas semelhante à humana, tanto na forma aguda como crônica (Dantas-Torres, 2008). *Trypanosoma evansi* também representa um importante agente etiológico, causador da doença conhecida como “surra”. Outras duas espécies acometem os cães no Brasil: *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma caninum*, ambas descritas como assintomáticas para cães, porém com importante papel epidemiológico no tocante ao diagnóstico sorológico em relação às espécies patogênicas (Maia da Silva et al., 2004; de Oliveira et al., 2015).

O cão é considerado um bom modelo para os estudos de doença de Chagas e leishmaniose, porque apresenta papel importante na cadeia de transmissão dessas doenças, servindo como hospedeiro e reservatório (Castañera et al., 1998; Montenegro et al, 2002; Pascon et al., 2010). O uso dessa espécie como sentinela para essas doenças também é descrito (Castañera et al., 1998), apresentando susceptibilidade alta à “surra”, tendo como sinais clínicos edema de membros posteriores, apatia, desidratação, membranas mucosas pálidas, febre e perda de peso, sendo geralmente fatal (Dantas-Torres, 2008; Desquenes et al., 2013). A doença de Chagas no cão apresenta-se da mesma forma que a humana, geralmente sendo fatal em casos agudos e assintomática quando crônica, sendo o cão um reservatório carreador importante em áreas endêmicas, que no Brasil significa todas as

regiões, menos a região Sul. Em modelos experimentais apenas episódios esporádicos de febre foram notados durante a primeira semana pós infecção, sendo que alguns cães desenvolvem miocardites focais e discretas (Dantas-Torres, 2008).

Na África, a tripanosomíase humana africana (etiologia: *Trypanosoma brucei* spp.) está presente em 36 países da região subsaariana colocando mais de 61 milhões de pessoas em risco de contrair a doença por meio da mosca tsé-tsé (Kaufer, et al., 2017). Relata-se uma queda do número de casos descritos entre 2004 e 2014, com aproximadamente 15.000 casos estimados anualmente (MS, 2015). No novo mundo, principalmente na América Latina, a tripanosomíase americana (etiologia: *Trypanosoma cruzi*) coloca em risco mais de 17 milhões de pessoas, sendo que se estima que existam 8 milhões de infectados. (Kaufer et al., 2017). Os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) para doença de Chagas aguda do Ministério da Saúde do Brasil em último levantamento relata que a transmissão vetorial no Brasil é controlada. A ingestão oral ainda demonstra ser a forma de transmissão predominante atualmente no Brasil (MS, 2015).

Os meios diagnósticos utilizados atualmente tem grande dificuldade em identificar corretamente a espécie de *Trypanosoma* envolvido em cada infecção. Isso ocorre devido à semelhança morfológica entre diferentes espécies (Gomes, et al 2009). Ocorre também devido às reações sorológicas inerentes a cada espécie e mesmo de diferentes gêneros que, mesmo naqueles não virulentos ao hospedeiro vertebrado, podem sensibilizar exames sorológicos feitos a campo dificultando o diagnóstico preciso (Umewaza, et al., 2009).

Na última década, diversos foram os métodos moleculares estabelecidos para identificação correta das linhagens filogenéticas que acometem determinado hospedeiro, já que cada linhagem pode causar diferente morfologia, conteúdo de DNA, patogenicidade, susceptibilidade às drogas entre outros parâmetros (Zingales et al., 2012; Duz, et al., 2014).

## **1.1 Objetivos Gerais**

Detectar a presença de *Trypanosoma spp.* em cães residentes no Distrito Federal.

## **1.2 Objetivos específicos:**

a) Identificar a infecção por *Trypanosoma spp.* em cães no Distrito Federal, Brasil por meio da PCR.

b) Avaliar se há significância entre as características domiciliares nas amostras coletadas de acordo com cada região administrativa pesquisada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Trypanosomatidae

A Família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastida), Ordem Trypanosomatida é caracterizada por protozoários que possuem flagelos e cinetoplasto, uma estrutura única desses parasitas onde se encontra ácido desoxirribonucleico (DNA) dentro das mitocôndrias (Hoare, 1972). A Ordem Trypanosomatidae compreende diversos protozoários parasitas predominantemente monoxêmicos, embora haja muitos tripanosomatídeos de nichos heteroxêmicos. Os gêneros de maior importância são aqueles patogênicos a humanos, com potencial zoonótico, como o *Trypanosoma cruzi*, (Doença de Chagas), *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* (Tripanosomíase Humana Africana) e *Leishmania spp.* (Leishmanioses) (Kaufner et al., 2017). Embora não seja reconhecidamente patogênico em humanos, *Trypanosoma rangeli* é citado como um parasita amplamente distribuído na América do Sul e Central e atua como um fator de dificuldade no diagnóstico da doença de Chagas devido às reações sorológicas cruzadas (Hamilton et al., 2011).

Duas sessões não taxonômicas foram criadas para separar os tripanosomas que parasitam mamíferos cujo desenvolvimento ocorre exclusivamente no intestino do vetor e conseqüentemente transmitido pelas fezes como *T. cruzi*, (Stercoraria) de tripanosomas transmitidos por inoculação de formas metacíclicas na saliva da mosca Tsé-tsé como *Trypanosoma evansi* e *T. brucei* (Salivaria) (Hoare, 1972). *T. rangeli*, apesar de estar classificado como stercoraria, pois seu ciclo de vida envolve desenvolvimento no intestino do vetor, não possui formas metacíclicas em material fecal, possui características do ciclo salivaria, pois migra pela hemolinfa até as glândulas salivárias do vetor, completando seu ciclo e tornando-se infectante através da picada do vetor. (Hoare, 1972, Maia da Silva, 2004).

Entre os tripanosomatídeos de importância veterinária, além de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. que acometem uma grande gama de vertebrados (Rassi et al., 2010; Kaufer et al., 2017), *T. (Trypanozoon) evansi*, acomete cavalos, bovinos, búfalos e cães causando na América do Sul, a doença conhecida popularmente como “surra” em cães e “mau de cadeiras” em equinos, (Eberhardt et al., 2014 Jaimes-Dueñas et al., 2017). *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma (Duttonella) vivax* e *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* são importantes agentes etiológicos de um complexo de doenças em bovinos na África conhecida como “nagana”. *Trypanosoma equiperdum* é o agente etiológico causador da enfermidade conhecida como “durina” e é transmitida por via sexual (Desquesnes et al., 2013).

O *Trypanosoma caninum* foi descrito recentemente na cidade do Rio de Janeiro e em outras regiões do Brasil (Oliveira et al., 2015). Aparentemente inofensivo ao cão, foi isolado de fragmento intacto de pele além de possuir características morfológicas únicas quando em culturas axênicas (Madeira et al., 2009 Barros et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

*T. rangeli* é altamente predominante na América Central e noroeste da América do Sul onde é simpátrico com *T. cruzi* (Maia da Silva, et al., 2007). Apenas 3 relatos de infecção humana no Brasil foram relatados, embora relatos em outros mamíferos e em triatomíneos ocorreram nas regiões Sul e Sudeste. Apesar de não patogênico para os hospedeiros vertebrados, *T. rangeli* o é para o triatomíneo, dificultando repasto e muda (Maia da Silva, et al., 2004).

### **2.1.1 *Trypanosoma cruzi***

A tripanossomíase humana americana, conhecida como a doença de Chagas é uma antropozoonose transmitida por vários insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Chagas, 1909). Foi descoberta no norte de Minas Gerais, Brasil, onde

operários empenhados na construção da estrada de ferro central do Brasil eram parasitados pelo vetor hematófago. (Chagas, 1909; Zingales et al., 2012). Porém achados em múmias datadas de 9 mil anos atrás comprovam que o parasita é muito mais antigo que seu relato e descrição (Rodriguez et al., 2016).



Figura 1.1.1 - Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*; A - esquemático; B e C - Microscopia optica; Fonte: Coura et al.; 2011

É um parasita com ocorrência em toda a América Central e do Sul, além de haver relatos de imigrantes doentes, aumentando o alcance dessa moléstia. Até a década de 80, a doença de Chagas era delimitada a áreas pobres ou rurais. Com a crescente urbanização, a doença aumentou seu alcance, tornando-se urbana, periurbana, rural e/ou silvestre (Rassi. Dados de 1985 demonstram que 25% da população (100 milhões de pessoas) da América do Sul e Central estavam sob risco de infecção. E que 17 milhões de pessoas estavam infectadas. Após iniciativas regionais, como a Iniciativa do Cone Sul, o Pacto Andino e a Iniciativa da América Central para erradicação e controle da doença de Chagas, que propunham programas para erradicação da transmissão domiciliar, o Uruguai em 1997, o Chile em 1999 e o Brasil em 2006 conseguiram interromper a transmissão domiciliar (MS, 2015). Ações federais dos mais diversos países estabeleceram testes em praticamente 100% das doações sanguíneas. Levantamentos epidemiológicos em 2010 indicaram que 20% da população (100 milhões de pessoas) da América Central estavam sob risco, e 7.7 milhões de pessoas estavam infectadas. Números de 2010 da WHO indicam 5.7 milhões de pessoas infectadas. (Rassi et al., 2010; WHO, 2015). Em áreas onde a tripanosomíase americana é endêmica, estima-se que 15 a 50% dos cães estejam expostos à infecção por *T. cruzi* (Dantas-Torres, 2008).

*T. cruzi* parasita humanos e mais de 150 espécies de animais domésticos (cães e gatos, por exemplo) e mais de 130 espécies de animais silvestres (roedores, marsupiais), possuindo três ciclos estabelecidos: doméstico, peridoméstico e silvestre

(Dantas-Torres, 2008).

A principal forma de transmissão é por meio do repasto de triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, popularmente conhecidos como barbeiros. Existem relatos de cerca de 100 espécies de triatomíneos, mas poucos são vetores competentes. Os mais relevantes são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma dimidiata* (Coura, et al., 2015). Os triatomíneos possuem 5 fases de ninfa e os adultos, tanto machos quanto fêmeas fazem repasto sanguíneo. A chance do triatomíneo estar infectado depende principalmente do número de repastos feitos. Portanto, indivíduos adultos têm uma maior chance de estarem infectados (Coura et al., 2015). Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Hemíptera: Triatominae) e mosquitos flebotomíneos (Psychodidae) podem adquirir *T. cruzi* quando há repasto em cães infectados, mas não há evidências que suportem o desenvolvimento e subsequente transmissão (Dantas-Torres, 2008, Ferreira et al., 2015).

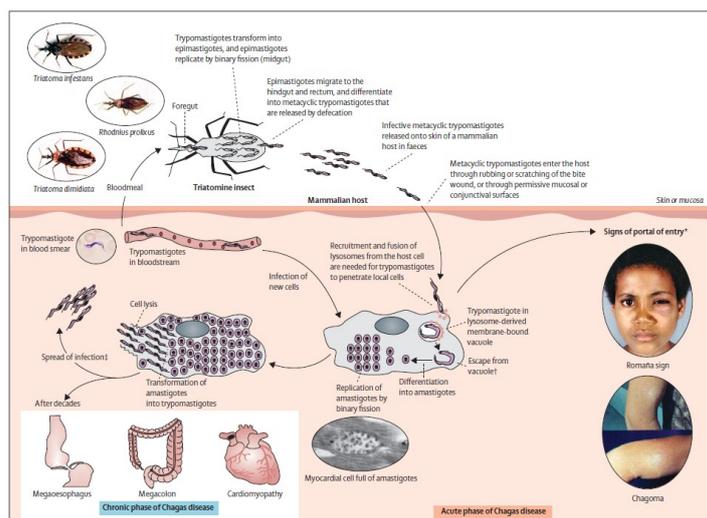


Figura 1.1.2 - Ciclo do *Trypanosoma cruzi*; Fonte: Rassi et al, 2010

A transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea é bem documentada na América Latina e representa a segunda forma mais comum de transmissão (Coura et al., 2015). Existe chance de 10 a 20% de transmissão através de transfusão, mas diversos fatores influenciam essas probabilidades como a transfusão

de componentes sanguíneos (a transfusão de plaquetas é potencialmente perigosa), concentração parasitária e a linhagem parasitária (Rassi et al., 2010).

A transmissão da infecção por via vertical é documentada e relatada próximo a 5% na Bolívia, Chile e Paraguai. Nos outros países endêmicos, fica próximo a

1%. Tais variações são afetadas por fatores como a linhagem do parasita, saúde geral da mãe e fatores placentários. Existem relatos de transmissão por transplante de órgãos e medula óssea. A transmissão por via oral pelo consumo de carne crua, caldo de cana e de açaí é acidental e depende da presença de altas cargas parasitárias. Esse tipo de infecção geralmente se apresenta clinicamente de forma aguda e severa, com alta mortalidade (Rassi et al., 2010).

A transmissão por via oral é provavelmente a forma de transmissão mais comum na natureza entre os animais silvestres, através da ingestão de insetos por pequenos mamíferos. Esse fenômeno foi observado já na descrição da doença, pelo próprio Chagas (Coura et al., 2015, Rodrigues et al., 2016).

O ciclo do *T. cruzi* inicia-se no repasto sanguíneo do vetor, quando este alimenta-se de sangue do hospedeiro mamífero e ingere a forma tripomastigota circulante do parasita. No vetor, *T. cruzi* sofre transformação em epimastigota, migrando para o intestino médio do vetor e começando a dividir-se por fissão binária. As epimastigotas, após fissão binária, migram para o fim do intestino e reto, onde diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas. São liberadas junto à defecação do vetor durante o repasto na pele do hospedeiro, penetrando-a através da ferida causada pela picada do vetor e por microlesões mecânicas causadas por prurido ou ainda através de superfícies mucosas e/ou conjuntivas (Rassi et al.; 2010, Coura 2012 et al.; Kaufer et al., 2017).

Após a penetração na pele, as formas infectantes entram para o citoplasma de células do hospedeiro. Há necessidade de resposta do hospedeiro recrutando e fundindo o lisossoma das células. No citoplasma do hospedeiro, vacúolos parasitóforos são formados derivados da fusão membrana-lisossoma. Após escapar do vacúolo, há diferenciação de tripomastigota metacíclica em amastigota, que se replicarão por fissão binária (Rassi et al., 2010). Com a multiplicação do parasita, a célula do hospedeiro incha ocasionando posteriormente lise celular. Nesse momento ocorre a transformação da forma amastigota para a forma de tripomastigota circulante, com crescimento de flagelos. A infecção se espalha com a infecção de outras células de tecidos adjacentes (Coura et al.

2012).

Devido à grande diversidade biológica do *T. cruzi* quanto à sua morfologia, conteúdo de DNA, patogenicidade, susceptibilidade às drogas entre outros parâmetros, a espécie tornou-se um excelente modelo de estudo com marcadores moleculares que objetivavam relacionar epidemiologia molecular e genética de população. O parasita possui padrão evolutivo reticulado (Zingales et al., 2011), com predomínio de propagação clonal (Tibayrenc et al., 1990), onde as progênies apresentam multilocus genotípicos virtualmente idênticos aos genótipos parentais, sendo que o termo clone nesse caso, refere-se à estrutura da espécie (Zingales et al., 2012b, Souza et al., 2015).

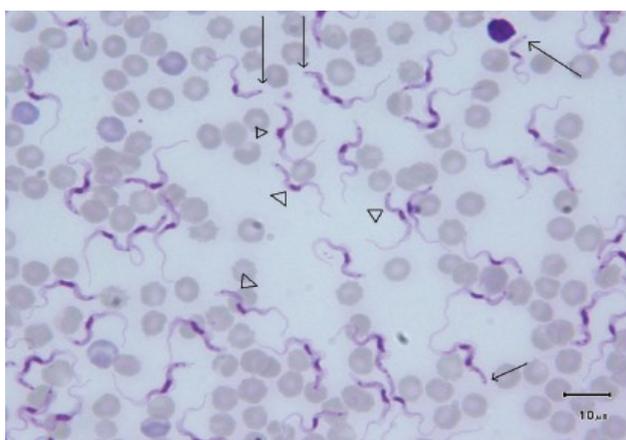
Desde a década de 1970, marcadores moleculares foram utilizados para diferenciar os subtipos de *T. cruzi*. Por meio da evolução da biologia molecular, em 2009, chegou-se a um consenso quanto à nomenclatura utilizada para esses subgrupos: foram classificados em 6 "discrete typing units" (DTUs), *TcI* a *TcVI*. (Zingales et al., 2009; Souza et al., 2015). Os DTUs são definidos como os conjuntos que são identificáveis por meio de marcadores genéticos comuns, moleculares ou um grupo desses. (Tibayrenc et al., 1998).

O tratamento da doença de Chagas humana atualmente é feito por duas drogas: Nifurtimox e Benzonidazol. Apenas Benzonidazol está disponível no Brasil (Urdina et al, 2010). Antifúngicos que inibem ergosterol também são usados na terapia humana (Coura et al, 2012). Em cães, os tratamentos experimentais envolvendo benzonidazol demonstraram eficácia na cura das formas aguda (62,5%) e crônica (38,7%) da doença utilizando o mesmo protocolo humano (Guedes, 2009). Outro tratamento experimental utilizando um inibidor sulfona-vinil cisteína protease (N-methylpiperazina-phehomophe-vinilsulfona-phenyl) mostrou-se eficaz na prevenção de lesões cardíacas durante a fase aguda da doença por meio de inoculações de tripomastigotas por via subcutânea, demonstrando que os níveis séricos de troponina cardíaca I mantêm-se baixos em cães tratados com o inibidor e altos em cães não tratados, sendo um melhor marcador patológico para as alterações causadas pela doença do que as alterações do

eletrocardiograma, que mostraram-se inalteradas para os dois grupos (Barr et al., 2005).

### 2.1.2 *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi*

*Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* é o agente etiológico da enfermidade conhecida como “surra” afetando várias espécies de mamíferos na África, Ásia e América Latina (Bazzoli et al., 2002, Eberhardt et al., 2014, Jaimes-Dueñas et al., 2017). O parasita é originário da África e foi provavelmente introduzido na América do Sul por colonos Espanhóis durante o século XVI (Eberhardt et al., 2014). Foi o primeiro tripanosoma a ser descrito no mundo, em 1880, por Griffith Evans, no sangue de equinos e dromedários (Desquesnes et al., 2013).



Na circulação sanguínea, *T. evansi* é caracterizado como a maioria dos membros do subgênero *Trypanozoon*: tamanho pequeno se comparado a *Trypanosoma theileri*, mas maior que *Trypanosoma congolensis*, extremidade posterior fina, flagelo livre, movimentos livres, porém produzindo movimento limitado no campo do microscópio e uma membrana ondulante altamente visível

Figura 1.2.1 - Forma circulante do *Trypanosoma evansi*; Fonte: Desquesnes et al., 2013

(Desquesnes et al., 2013).

Acredita-se que *T. evansi* seja derivado do *T. brucei brucei*, transmitido ciclicamente pela mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.). Devido à perda dos maxicírculos do DNA mitocondrial do cinetoplasto, o *T. evansi* perdeu a habilidade de realizar fosforilação oxidativa não sendo capaz de desenvolver o ciclo no vetor invertebrado, impedindo a transformação ao estágio procíclica (Schnauffer et al., 2002; Eberhardt et al., 2014;

Desquesnes et al., 2013), ficando “presa” em sua forma circulante, onde há divisão por fissão binária. A transmissão ocorre por via mecânica por meio de moscas hematófagas do gênero *Tabanus* (Díptera: Tabanidae) e *Stomoxys* (Díptera: Muscidae) (Dantas-Torres, 2008), além da mosca tsé-tsé na África e Ásia. Entre os carnívoros, a transmissão pode ocorrer também de forma iatrogênica, ingestão de sangue e tecidos infectados com *T. evansi* (Aquino et al.; 1999; Bazzoli et al., 2002; Jaimes-Dueñas et al., 2017). Na América do Sul, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* também participa da cadeia de transmissão (Herrera et al., 2004; Desquesnes et al., 2013, Eberhardt et al., 2014). Outra importante via de transmissão está relacionada ao hábito naturalmente carnívoro dos canídeos. Existem relevantes estudos que comprovam a transmissão do *T. evansi* por via oral, quando alimentados com sangue e vísceras de animais infectados (Raina et al., 1985; Bazzoli et al., 2002)

Apesar de haver relatos de infecção humana na Ásia e África, aumentando a importância dos animais domésticos na infecção humana, nas Américas não há relatos de casos humanos (Jaimes-Dueñas, 2017). As espécies acometidas incluem cavalos, bovinos, cães, búfalos (Herrera 2004 et al.; Eberhardt et al., 2014; Jaimes-Dueñas et al., 2017).

Os cães são muito susceptíveis à infecção por *T. evansi*, geralmente apresentando quadro febril (39-41°C), edema de cabeça, incluindo laringe (um importante diferencial para Raiva) pernas e parede abdominal, anemia, paralisia dos membros posteriores, fraqueza e perda de apetite, e consequente emaciação, a miocardite quando presente, geralmente é fatal (Desquesnes et al., 2013, Jaimes-Dueñas et al., 2017). Em cães, pode ser observado sintomatologia ocular, como lacrimejamento, ceratite, opacidade corneana e/ou sinais hemorrágicos que podem levar a depósitos de fibrina na câmara anterior do olho. O parasita pode ser observado no fluido aquoso durante a infecção ativa e mesmo após tratamento (Hoare, 1972; Aquino et al., 1999; Savani et al., 2005; Sonika et al., 2007, Desquesnes et al., 2013).

O *T. evansi* tem distribuição tropical e subtropical, presente em mais de 30 países da África, Ásia e Oceania. Está relacionado nessas regiões à presença de camelos e dromedários. No Ocidente, há relatos de surtos na Espanha e França. *T. evansi* está

presente em toda a América Latina, onde foi descrito primeiramente em 1827 no estuário da Ilha de Marajó, seguido de Paraguai, Pantanal Mato-grossense, e posteriormente na Bolívia, Venezuela, Guiana e Colômbia (Desquesnes et al., 2013).

O tratamento é feito com quinapirâmida sulfato e quinapirâmida clorida em aplicação única (3:2 w/w) (Singh et al., 1993) ou aceturato de diminazeno (7 mg/kg, em dose única) (Colpo, et al., 2005).

### 2.1.3 *Trypanosoma caninum*

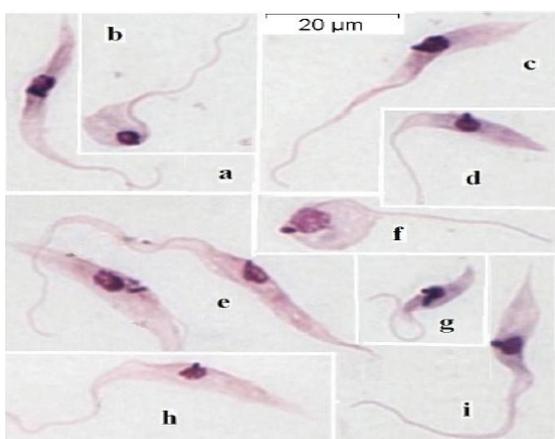


Figura 2.1.3.1 - *Trypanosoma caninum*: a, c, d, e, h, i – Epimastigotas; b, f – Esferomastigotas; g – Epimastigota em divisão; Fonte: Madeira et al, 2009

*Trypanosoma Caninum* é um protozoário descrito em 2009 na Cidade do Rio de Janeiro que apresenta duas características que o difere das demais espécies do gênero: presença de formas epimastigotas aflageladas em culturas axênicas e a presença em fragmentos de pele intactos (Madeira et al., 2009; Oliveira et al., 2015). Tentativas de isolamento de sangue total e outros tecidos não obtiveram sucesso (Barros et al., 2012). Aparentemente, não causa alterações patológicas no cão, embora a

infecção ative uma resposta humoral mediana, que pode constituir um fator de importância no diagnóstico sorológico para outras tripasonomíases. Até 2015 *T. caninum* já havia sido identificado em 62 casos em seis diferentes Estados do Brasil. (Madeira et al., 2014; Oliveira et al., 2015).

### 2.1.4 *Trypanosoma rangeli*

*Trypanosoma rangeli* é o segundo gênero de *Trypanosoma* que parasita o homem na América Latina, além de diversos outros mamíferos (Maia da Silva, et al., 2004). Os animais infectados por *T. rangeli* incluem primatas humanos e não humanos, Xenartha, Didelphimorphia, Carnivora e Rodentia (Maia da Silva, 2004). É um parasita predominante na América Central e norte da América Latina, e embora não seja patogênico para hospedeiros humanos, é patogênico para vetores invertebrados, onde dificulta a muda e a alimentação, além de causar anormalidades corporais (Maia da Silva, et al., 2007, 2009).

Diferente de outras espécies de Tripanosoma, *T. rangeli* tem características tanto do ciclo estercoreário quanto do salivário. Embora inicie seu desenvolvimento no intestino do vetor, os tripanosomas ali não são formas metacíclicas, e a transmissão por via fecal não é a mais usual. Após a fase inicial de desenvolvimento no intestino, formas flageladas penetram pela parede do intestino e continuam seu desenvolvimento na hemolinfa e glândulas salivares do vetor. Os insetos triatomíneos transmitem *T. rangeli* através de inoculação de formas metacíclicas presentes na saliva durante picada ou repasto (Maia da Silva et al., 2004).

Aparentemente, o gênero *Rhodnius* spp. é o único vetor competente para *T. rangeli* (Maia da Silva, et al., 2007). O comportamento do *T. rangeli* de distintas origens geográficas varia de acordo com as várias espécies de *Rhodnius* sugerindo uma longa história evolucionária entre as espécies (Maia da Silva, et al., 2009).

Não é possível diferenciar a infecção *T. rangeli* de *T. cruzi* morfologicamente e nem por meio de exames sorológicos (Maia da Silva et al., 2009). A diferenciação mais usual é feita pelo dimorfismo do gene S24 alfa e “splice leader DNA” (SL) embora esteja esclarecido que não se diferencia todas as linhagens por meio desses marcadores moleculares (Hamilton et al., 2011). Filogenia referida usando sequências de ITS rDNA e SL identificaram pelo menos 5 diferentes linhagens de *T. rangeli*. As linhagens TrA, TrB e TrC associadas com as espécies triatomíneas simpátricas dos complexos *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius brethesi* e *Rhodnius pallences*, respectivamente, constituem as três maiores linhas evolutivas da espécie (Ortiz et al, 2009).

## 2.2 Diagnóstico das Tripanosomíases

A fase aguda da Doença de Chagas em humanos é diagnosticada por meio de exame parasitológico de sangue fresco, assim como por meio do esfregaço sanguíneo, pois nessa fase da doença, os tripanosomídeos estão circulantes (Gomes et al., 2012). Se houver suspeitas de transmissão vertical, deve-se primeiro testar a mãe sorologicamente, e caso confirmada a infecção, o recém-nascido (RN) deve ser testado. Em crianças positivas, o tratamento etiológico deve começar de imediato. Em caso de negativo do RN, mas cuja a mãe teste positivo, o RN deve ser reexaminado em 6 a 9 meses, para que seja realizado teste sorológico específico à procura de IgG contra *T. cruzi* (Gomes et al., 2012).

Na fase crônica, as reações sorológicas à procura de IgG anti-*T. cruzi* (SIGMA), ELISA, Imunofluorescência indireta (IFI), hemoaglutinação indireta (IHA) são mais comumente utilizadas além de métodos indiretos parasitológicos, que embora específicos, não apresentam boa sensibilidade (xenodiagnóstico e hemocultura) (Montenegro et al., 2002; Gomes et al., 2012).

Em cães, o diagnóstico é realizado da mesma forma: em infecções agudas, quando há sintomatologia, esses sinais diferem muito em suas apresentações clínicas de acordo com a linhagem de *T. cruzi* envolvido na infecção (Almeida et al., 2013). Devido à alta parasitemia circulante nessa fase, o exame parasitológico de sangue total e do esfregaço sanguíneo são as formas mais eficientes de diagnóstico. Já em infecções crônicas, a maioria dos exames sorológicos como TESA (trypomastigote excreted secreted antigen)-ELISA e epi (epimastigote antigen)-ELISA podem obter falsos positivos devido à reação cruzada com *Leishmania* spp., *T. evansi* e *T. rangeli*. Apenas TESA-blot foi padronizado para um correto diagnóstico (Umewaza et al., 2009). Muitos grupos têm tentado desenvolver ensaios moleculares mais sensíveis para detecção precoce e acompanhamento de tratamento tanto da fase aguda quanto da fase crônica da doença sendo esses exames usados como marcadores iniciais de sucesso ou fracasso terapêutico (Gomes et al., 2012).

A grande susceptibilidade dos cães ao *T. evansi* faz com que diagnóstico da “surra” seja muitas vezes clínico ou por exame parasitológico do sangue total ou do esfregaço, após suspeita clínica inicial. Como *T. evansi* não possui a capacidade de sair de sua forma tripomastigota, durante a infecção, sempre estará na corrente sanguínea. O diagnóstico molecular também constitui uma importante ferramenta de diagnóstico (Desquesnes et al., 2013; Jaimes-Dueñez et al., 2017).

Embora o diagnóstico de *T. caninum* e *T. rangeli* não sejam relevantes clinicamente pois não são patogênicos para os cães, a correta identificação destes parasitas mostra-se importante pois estes causam alterações imunológicas moderadas que podem sensibilizar os exames sorológicos mais comuns para enfermidades como leishmaniose visceral canina (LVC) e tripanosomíase americana (de Oliveira et al., 2015).

A diferenciação molecular atualmente é uma importante ferramenta para diferenciação acurada entre as diferentes espécies de tripanosomídeos, sendo essencial para o entendimento epidemiológico e da patogênese desses parasitas. Como ocorre na tripanosomíase humana africana, os dois causadores das formas aguda e crônica *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* são indistinguíveis pelos exames parasitológicos diretos, assim como ocorre com principais linhagens de *T. cruzi*. Nesses casos, é indispensável a identificação do parasita (Adams et al., 2008).

Muitas técnicas vêm sendo utilizadas para identificação molecular específica das espécies de tripanosomatídeos. O primeiro método com capacidade de identificar um pequeno número de microrganismos infectando vertebrados e invertebrados foram as técnicas de identificação espécie específica por sonda de DNA: a metodologia consiste de amostras não purificadas de tecido coletadas diretamente do vertebrado e do invertebrado, seguida de hibridização normalmente com fragmentos de DNA radioativamente marcados. É razoavelmente sensível, sendo capaz de detectar 1000 tripanosomídeos, mas foi caindo em desuso após a introdução da PCR (Adams et al., 2008).

A PCR é uma metodologia com alta sensibilidade que permite a

amplificação do DNA do agente a partir da utilização de conjuntos de oligonucleotídios específicos para cada espécie, gênero ou família. A identificação é feita pela presença de produtos da PCR de tamanhos específicos em gel de agarose. O aumento rápido dos dados de sequenciamento genético gerados pelos estudos de biologia celular, taxonomia, e projetos genoma aumentaram as sequências alvos para essas reações. Embora tenha alta sensibilidade, o número de reações necessárias numa mesma amostra a campo faz com que esse método seja caro e lento. No caso da família *Tripanosomatidae*, as sequências alvos usadas nessa técnica incluem espaços internos transcritos (ITS) do locus do RNA ribossomal que são facilmente amplificados usando oligonucleotídeos complementares dos genes rRNA 18S, 24S alfa, 28S ou 5.8S. A técnica de PCR de fragmentos restritos de domínios polimórficos discrimina diferentes espécies pelos tamanhos específicos de regiões polimórficas do gene 18S, 24S alfa, e 28S rRNA (Adams, et al., 2008; Hamilton et al., 2011). A comparação do sequenciamento junto ao GENBANK é utilizado para identificação das espécies de tripanosomatídeos (Maia da Silva et al., 2004; Adams et al, 2008).

A metodologia conhecida como *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), é uma técnica extremamente sensível, capaz de identificar um 1 fg de DNA, aproximadamente 0,01 tripanosomídeos. A técnica pode ser utilizada diretamente de amostras teciduais, dispensando a necessidade de extração de DNA e poder ser visualizada pela eletroforese clássica em gel assim como os produtos podem ser visualizados por corantes, facilitando seu uso em locais remotos (Adams et al, 2008).

Ainda existem lacunas a serem preenchidas no estudo do parasitismo dos tripanosomídeos em cães. O diagnóstico das espécies que acometem os cães, e a distribuição de vetores e a prevalência dos parasitas na população canina precisa ser determinada. Estudos abrangentes utilizando diversos métodos diagnósticos são necessários para que os dados sejam úteis para o planejamento correto de políticas de controle de zoonoses e de seus vetores.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; New molecular tools for the identification of trypanosome species. **Future Microbiology**. v. 3(2), p. 167-176, 2008.

AQUINO, L.P.C.T. Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da infecção experimental em cães com *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p 255-260, 1999.

ALMEIDA, A. do B.P.F de; de PAULA, D.A.J.; OTTO, N.M.L.P.; JAUNE, F.W.; CRUZ, R.A.S.; MADEIRA, M.de F.; NAKAZATO, L.; MENDONÇA, A.J.; PESCADOR, C.A.; SOUSA, V.R.F. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in central western Brazil: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.55, n.4, p.287-289, 2013.

CASTAÑERA M.B., LAURICELLA M.A., CHUIT R., GÜRTLER R.E. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v.92, p. 671-683, 1998.

COURA J.R.; BORGES-PEREIRA J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.45(3), p. 286-296, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**. v. 1:25, p.17, 2008.

DESQUESNES, M.; HOLZMULLER, P.; LAI, D.H.; DARGANTES, A.; LUN, Z.R.; JITTAPLAPONG, S. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Research International**. v.2013, p. 174-176, 2013.

DUZ, A.L.C.; VIEIRA, P.M.de A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARDOSO, J.M.de O.; de OLIVEIRA, F.C.B.; REIS, L. E.S.; TAFURI, W.L.; VELOSO, V.M.; REIS, A. B.; CARNEIRO, C.M. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 109(8), p.1005-1013, 2014.

EBERHARDT, A.T.; MONJE, L.D.; ZURVERA, D.A.; BELDOMENICO, P.M. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capybaras from Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays. **Veterinary Parasitology** v.202, p.226–233. 2014.

GUEDES, P.M.; VELOSO, V.M.; AFONSO, L.C.; CALIARI, M.V.; CARNEIRO, C.M., DINIZ, L.F. & LANA, M. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and low IL-10 production during the acute infection phase **Veterinary immunology and immunopathology** v.130(1), p.43-52, 2009.

GOMES Y.M.; LORENA V.M.; LUQUETTI .A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has, been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 104 (suppl 1), p. 115–21. 2009.

HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology** v.125, 263–275. 2004.

HERRERA, L. *Trypanosoma cruzi*, causal agent of Chagas disease: The borderline between wild and domestic cycles in Venezuela. **Frontiers in Public Health**, v. 2, 2014.

HOARE, H. E. The trypanosomiases of mammals: A zoological monograph. **Oxford: Blackwell** p.555-93, 1972.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and vectors** v. 10, p.17, 2017.

JAIMES-DUEÑES, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; VALENCIA-HERNANDEZ, A.; SÁNCHEZ-ARÉVALO, D.; POCHE-CEBALLOS, A.; ORTÍZ-ÁLVAREZ, J.; MEJÍA-JARAMILLO, A. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggest the epidemiological importance of this species in Colombia. **Preventive Veterinary Medicine** v. 139, p. 82-89, 2017.

MADEIRA, M.F.; SOUSA, M.A.; BARROS, J.H.; FIGUEIREDO, F.B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology** v. 136, p. 401-413, 2009.

MADEIRA, M.F.; BARROS, J.H.; FIGUEIREDO, F.B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. SOUSA, V.R.F.; ALVES, A.S. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: Aspects of natural infection. **Jornal da Parasitologia** v.100, p.231-234, 2014.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; AÑEZ, N.; SHAW, J.J.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M.G. 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, p. 549–561, 2004.

MAIA DA SILVA, F.; JUNQUEIRA, A.C.; CAMPANER, M.; RODRIGUES, A.C.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, L.E.; CABALLERO, Z.C.; MONTEIRO, F.A.; COURA, J.R.; AÑEZ, N.; TEIXEIRA, M.M.G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology** v.16, p.3361–3373, 2007.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M. JR.; ORTIZ, P.A.; CAMPANER, M.; TAKEDA G.F.; PAIVA, F.; NUNES, V.L.B.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Tropica** v. 109, p.199–207, 2009.

MILES, M.A., YEO, M., GAUNT, M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease. In: Kelly, J.M. (Ed.), *Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Chagas Disease*. **Eurekah.com & Kluwer Academic/ Plenum Publishers** p. 1–15, 2003.

MORA M.C., SANCHEZ NEGRETTE O., MARCO D. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. **Jornal da Parasitologia**; v. 91, p.1468–73, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica de 200 a 2013. Secretaria de Vigilância em Saúde – Boletim Epidemiológico. v. 46. nº 21, 2015.

MONTENEGRO, V.M.; JIMÉNEZ M.; DIAS J.C.P.; ZELEDÓN, R. Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica; **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 97(4), p.491-494, 2002.

PASCON J.P.E.; NETO G.B.P.; SOUSA M.G.; JUNIOR D.P; CAMACHO A.A. Clinical characterization of chronic chagasic cardiomyopathy in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 30(2), p115-120, 2010.

RAINA, A. K.; KUMAR, R.; RAJAORA, V. S.; SRIDHAR SINGH, R. P. Oral Transmission of *Trypanosoma evansi* in dogs and mice. **Veterinary Parasitology** v. 18, p. 67-9, 1985.

RASSI, A. & MARIN-NETO, J. A. Chagas disease; Review Article; **The Lancet** v.375, n.9723, p.1388-1402, 2010.

SCHIJMAN A.G. Differential detection of *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24s ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina; **Acta Tropica** v. 99, p.50–54, 2006.

SOUTO, R.P., VARGAS, N., ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Experimental Parasitology** v.91, p. 306–314, 1999.

SOUZA, T.P.; SOUZA, C.; LOPES, D.O.; SANTOS, L. L.; BORTOLETA, N.D.A.; MACEDO, A.M.; VALADARES, H.M.S.; Desenvolvimento de um sistema de PCR multiplex para a caracterização molecular de cepas do *Trypanosoma cruzi* em suas principais linhagens filogenéticas; **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica** Blucher Biochemistry Proceedings, v.1, n.1. p. 1-2. 2015.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** v. 164, n. 2-4, p. 118-123, 2009.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal of Parasitology** v.28, p.85–104, 1998.

UMEZAWA, E. S.; SOUZA, A. I.; PINEDO-CANCINO, V. et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 15–20, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, February, 2015; nº 6,6; 90:33-44.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. v.12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 104, p. 1051-1054, 2009.



## **CAPÍTULO 2**

## 1 RESUMO

A Família Trypanosomatidae compreende diversas espécies que infectam mamíferos, répteis peixes e plantas. As espécies que acometem cães na região analisada são *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma evansi* e *Leishmania* spp. Sendo parasitas com abrangência epidemiológica por toda a América, a correta identificação das espécies mostra-se fundamental para o diagnóstico preciso e consequente abordagem terapêutica assim como estabelecimento de epidemiologia ecológica e genética populacional das diferentes linhagens de parasitas. Objetivou-se com esse estudo avaliar a ocorrência da infecção por *Trypanosoma* spp. em cães residentes e sua distribuição por região administrativa e habitat no Distrito Federal (DF), Brasil. Foram analisadas por meio da PCR 206 amostras de sangue de cães residentes no DF. Dessas amostras, 16 (7,7%) foram positivas para a infecção por *Trypanosoma* spp. em diferentes habitats (domiciliar, peridomiciliar e rural ou silvestre) e regiões administrativas do DF, não demonstrando diferença ( $p>0,05$ ) entre os habitats ou regiões estudadas. A ocorrência da infecção nas amostras estudadas demonstrou uma baixa taxa de infecção por *Trypanosoma* spp. na região do Distrito Federal.

### Palavras-chave:

1. *Trypanosoma* spp. 2. Cães. 3. PCR baseada em rDNA. 4. Distrito Federal. 5. Brasil

## 2 ABSTRACT

The Family Tripanosomatidae comprises several species who infects mammals, reptiles, fishes and plants. The species who infect dogs in analyzed region are *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania* spp. As parasites with epidemiological scope for all America continent, the right species' identification show itself fundamental for precise diagnosis as to provide the right therapeutic approach, ecological epidemiology and genetics population of the different parasites lineage. The research's objectives was to evaluate the occurrence of infection by *Trypanosoma* spp. in resident dogs for habitat and administrative region distribution in Federal District, Brazil. Were analyzed by PCR 206 dogs' blood samples residents in Federal District. These samples, 16 (7,7%) were positive for infection by *Trypanosoma* spp. in different habitats (domicile, peridomiciliary, and rural or wild) and administrative regions of Federal District, doesn't showing difference ( $p>0,05$ ) between the habitats or administrative regions. The occurrence of infection in studied samples reveal results bellow expectation for infection by *Trypanosoma* spp. in Federal District area.

Key-words:

1. *Trypanosoma* spp. 2. Dogs. 3. rDNA based PCR. 4. Federal District. 5. Brazil

### 3 INTRODUÇÃO

Os protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma* spp. são agentes etiológicos de um grupo de doenças de grande importância no mundo e ao mesmo tempo são também das doenças mais negligenciadas (Rassi et al.; 2010, WHO, 2015; Kaufer et al., 2017). além de estarem presentes em todo o planeta principalmente entre as zonas tropicais e subtropicais. São parasitas causadores de doenças como as tripanossomíases humana africana e americana e parasitando mais de 150 espécies de mamíferos, entre primatas não humanos e das ordens Xenartha, Didelphimorphia, Carnivora e Rodentia (Maia da Silva, 2004), incluindo-se aqueles de convívio doméstico, como o cão e o gato, (Zingales et al. 2012).

O cão é susceptível à infecção por diversas espécies de tripanosomídeos. *Trypanosoma cruzi* em cães, pode causar, dependendo da linhagem, doença de Chagas semelhante à humana, tanto na forma aguda como crônica (Dantas-Torres, 2008). *Trypanosoma evansi* também representa um importante agente etiológico da doença conhecida como “surra” (Desquesnes, et al., 2013). Outras duas espécies acometem os cães no Brasil: *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma caninum*, ambas descritas como assintomáticas para cães, porém com importante papel epidemiológico no tocante ao diagnóstico sorológico em relação às espécies patogênicas (Maia da Silva et al., 2004; de Oliveira et al., 2015).

O cão é considerado um bom modelo para os estudos de doença de Chagas, porque apresenta papel importante na cadeia de transmissão dessas doenças, pois serve como hospedeiro e reservatório (Castañera et al., 1998; Montenegro et al, 2002; Pascon et al., 2010). O uso dessa espécie como sentinela para essas doenças também é descrito (Castañera et al., 1998). Cães apresentam alta susceptibilidade à “surra” e sinais clínicos como edema de membros posteriores, apatia, desidratação, membranas mucosas pálidas, febre e perda de peso, e prognóstico desfavorável (Dantas-Torres, 2008; Desquesnes et al., 2013). A doença de Chagas no cão apresenta-se da mesma forma que a humana,

geralmente fatal em casos agudos e assintomática quando crônica, sendo o cão um reservatório carreador importante em áreas endêmicas, que no Brasil significa todas as regiões, menos a região Sul. Em modelos experimentais apenas episódios esporádicos de febre foram notados durante a primeira semana pós infecção, sendo que alguns cães desenvolvem miocardites focais e discretas (Dantas-Torres, 2008).

Na África, a tripanossomíase humana africana (etiologia: *Trypanosoma brucei* spp.) está presente em 36 países da região subsaariana colocando mais de 61 milhões de pessoas em risco de contrair a doença por meio da mosca tsé-tsé. Relata-se uma queda do número de casos descritos entre 2004 e 2014, com aproximadamente 15.000 casos estimados anualmente. No novo mundo, principalmente na América Latina, a tripanossomíase americana (etiologia: *Trypanosoma cruzi*) coloca em risco mais de 17 milhões de pessoas, sendo que se estima que existam 8 milhões de infectados. (Kaufer et al., 2017). Os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) para doença de Chagas aguda do Ministério da Saúde do Brasil em último levantamento relata que a transmissão vetorial no Brasil está controlada. A ingestão oral ainda demonstra ser a forma de transmissão predominante no Brasil (MS, 2015).

Os meios diagnósticos utilizados atualmente tem grande dificuldade em identificar corretamente a espécie de *Trypanosoma* envolvido em cada infecção. Isso acontece devido à semelhança morfológica entre diferentes espécies (Gomes, et al 2012). Ocorre também devido às reações sorológicas inerentes a cada espécie e mesmo de diferentes gêneros que, mesmo naqueles não virulentos ao hospedeiro vertebrado, podem sensibilizar exames sorológicos feitos a campo dificultando o diagnóstico preciso (Umewaza, et al., 2009).

Na última década, diversos foram os métodos moleculares estabelecidos para identificação correta das linhagens filogenéticas que acometem determinado hospedeiro, já que cada linhagem pode causar diferente morfologia, conteúdo de DNA,

patogenicidade, susceptibilidade às drogas entre outros parâmetros (Zingales et al., 2012; Duz, et al., 2014).

Levando-se em consideração a importância do diagnóstico e a falta de informações na região este trabalho teve por objetivo detectar a presença de *Trypanosoma* spp. em cães que residem atualmente no DF.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### *4.1 Coleta das amostras e delineamento experimental*

Os métodos experimentais desse projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no uso Animal - CEUA – UnB (Protocolo 40/2017).

Foram coletadas 206 amostras de sangue total de cães residentes no DF no período de janeiro de 2016 a outubro de 2017, com ou sem proprietário, abrigados em lares ou abrigos temporários diversos. As amostras coletadas foram selecionadas por conveniência, tendo como pré-requisito único para a seleção, o cão ser residente no DF no período supracitado. As amostras foram organizadas de acordo com a região administrativa onde o cão residia (RA – unidades administrativas da organização pública, conhecidas antigamente como “cidades satélites”, cito-as: Águas Claras, Asa Sul, Asa Norte, Vicente Pires, Setor de mansões Park Way (SMPW), Estrutural, Taguatinga, Programa de Assentamento Dirigido do DF (PAD-DF), Paranoá e São Sebastião) e seu habitat em relação aos tutores: domiciliar, para aqueles cães que vivem em apartamentos e que não tem acesso irrestrito às áreas livres; peridomiciliar para aqueles cães cuja rotina oferece acesso irrestrito à moradia dos tutores e às áreas livres; rural ou silvestre para cães que não tem acesso à casa dos tutores ou que vivem a maior parte do tempo em áreas livres. Após a coleta, as amostras foram imediatamente refrigeradas e mantidas entre 4° a 8° C e posteriormente processadas para extração de DNA.

Delineou-se um teste estatístico para observar se há diferença significativa entre os tipos de habitat e entre as RA onde os cães pesquisados residiam. Para tanto utilizou-se o teste de Qui quadrado, sem correção de Yates para os habitats e com correção de Yates para as RAs, com nível de significância de  $p=0,05$ .

### *4.2 Extração do DNA*

A extração do DNA foi realizada a partir de 200  $\mu$ L de sangue total

utilizando kit comercial (Promega Corporation, WI, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

#### 4.3 Técnica da Reação em Cadeia de Polimerase

A mistura da PCR foi composta tampão 1X da TaqDNA Polimerase (Invitrogen®, Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 nM de cada oligonucleotídeo do domínio polimórfico D7 do gene RNA24S alfa ribossomal D75 5'GCAGATCTTGGTTGGCGTAG3' (posição 01-20) e D76 5'GGTTCTCTGTTGCCCTTTT3' (posição 279-298), 125 µM de dNTP, e 1.5 U de TaqDNA polimerase e cerca de 5 ng do DNA das amostras para um volume final de 25 µL (Souto & Zingales, 1993; Souto et al., 1999; Schijman et al., 2006, Ferreira et al., 2015). As reações foram realizadas em dois termocicladores, no termociclador C1000 thermal cycler, ou no termociclador BioradMyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A PCR consistiu um programa de cinco etapas em "touch-down". Partindo de uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, foi usada uma amplitude entre 60° a 52° C, nos primeiros ciclos: 1 minuto a 94° C, 1 minuto de anelamento em cada temperatura a 60°, 58°, 56°, e 54° C e 1 minuto de alongamento a 72° C. A seguir foram submetidos a 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 52° C e um minuto a 72° C. Uma última etapa de extensão a 72° C por 10 minutos finaliza o programa. Os controles positivos foram selecionadas de amostras de pacientes naturalmente infectados e positivos por microscopia de luz presentes na rotina do laboratório de Patologia Clínica da UnB e na PCR. O comprimento esperado do produto da PCR para *T. Cruzi* I é de 270 bp, *T. cruzi* II, 290 bp, *T. rangeli* 240bp, *T. evansi* (250 bp), *Leishmania spp.* (225 bp (Souto, 1999; Schijman, 2006), *T. caninum* 250 bp (Machado et al, 2009)

Todos as reações da PCR utilizaram água ultrapura miliQ (estéril e desprovida de DNA) como controle negativo e todas as amostras foram testadas em duplicata. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados por transiluminador ultravioleta (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland,

CA) corado com brometo de etídio (Vetec Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) na concentração de 0,1 a 0,5µg/mL.

As PCR que obtiveram resultado positivo com os oligonucleotídeos D75/D76 foram testadas em duplicata para *Leishmania* sp. por meio da PCR. A mistura da PCR foi composta tampão 1X da TaqDNA Polimerase (Invitrogen®, Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM oligonucleotídeos FW 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3', BW-B 5'-CCGCCCCTATTTTACACCA ACCCC-3, e BW-CA 5'-GGCCCACTATATTACACC AACCCC-3', 0,5 mM de dNTP, 1 U.I. de TaqDNA polimerase e cerca de 5 ng do DNA das amostras para um volume final de 25 µL (Ferreira et al, 2015) As reações foram realizadas em dois termocicladores, no termociclador C1000 thermal cycler, ou no termociclador BioradMyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As condições da PCR foram 94°C for 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. O comprimento esperado do produto da PCR para *Leishmania* é de 120 bp.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 206 amostras analisadas, 16 (7,7%) amostras resultaram em exames positivos para *Trypanosoma* spp. por meio da separação dos produtos da PCR em gel de agarose a 2% (Figura 2.1).

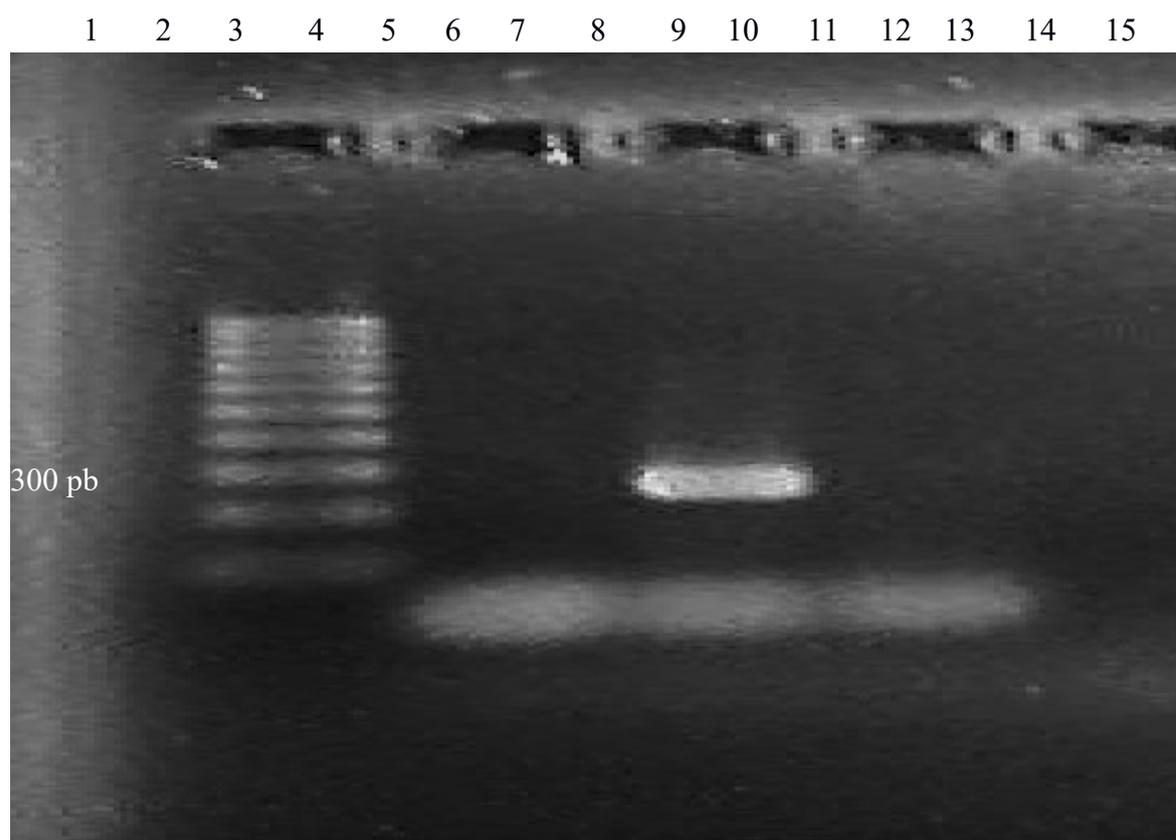


Figura 2.1 – Resultado da PCR para família Trypanosomatidae usando os oligonucleotídeos D75 e D76. Coluna 1: régua molecular (100 bp, Invitrogen®) Coluna 2: controle negativo (água); Coluna 3: Controle positivo; Colunas 4 a 11, 14 e 15: amostras negativas; Colunas 12 e 13: amostras positivas.

A distribuição das amostras positivas em relação ao habitat está apresentada na Tabela 2.1. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os habitats propostos. O mesmo teste estatístico, com correção de Yates, foi utilizado para as amostras presentes nas diferentes regiões pesquisadas (Tabela 2.2) e também não houve diferença ( $p>0,05$ ).

Na região do Park Way, onde predomina casas e o hábito de caça ocorre em

ambientes peridomiciliares, como quintais, apesar de não ser estimulada nem necessária foi demonstrada a presença da infecção de *T. cruzi* tanto em hospedeiro vertebrado (*Didelphis albiventris*) como em *Rhodnius neglectus*, um vetor secundário na transmissão das tripansomíases (Gurgel-Gonçalves et al., 2004). O reduzido número de amostras de algumas regiões também pode ter favorecido o resultado abaixo do esperado para a população canina estimada. Mesmo com 12% das amostras da região administrativa Águas Claras infectadas por *Trypanosoma* spp. o mesmo comportamento poderia ser esperado se regiões como Asa Sul ou Asa Norte tivessem números de amostras compatíveis, podendo ter comprometido a análise e não tenha havido diferença estatística. Porém, como não se trata de um estudo da prevalência, os resultados apresentados para a infecção de *D. albiventris* (4,8%) (Gurgel-Gonçalves et al., 2004), considerado reservatório secundário da infecção por *T. cruzi* e a presença de triatomíneos em diversas regiões administrativas está em concordância com a baixa ocorrência de *Trypanosoma* spp. no Distrito Federal.

Tabela 2.1 – Distribuição de amostras positivas e negativas para *Trypanosoma* spp. (oligonucleotídeos D75 e D76) de acordo com habitat do cão

HABITAT	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAIS
Domiciliar	6 (2,9%)	72 (34,9%)	78 (37,8%)
Peridomiciliar	6 (2,9%)	46 (22,3%)	52 (25,2%)
Rural/ Silvestre	4(1,9%)	72 (34,9%)	76 (36,8%)
Totais	16 (7,7%)	190 (92,2%)	206

A presença de barbeiros da espécie *Panstrongylus megistus* infectado por *Trypanosoma* spp. em análise no Distrito Federal, (Maeda et al., 2012) também demonstrou a ocorrência da infecção em áreas administrativas próximas a Águas Claras. Embora uma ocorrência tenha acontecido naquele estudo também em Taguatinga, região onde não houve resultados positivos (7 amostras, nenhum resultado positivo) porém a mostra em Águas Claras (72 amostras, 6 amostras positivas) foi 10 vezes maior, podendo ter influenciado a análise do presente estudo.

A metodologia utilizada não permitiu a diferenciação entre as espécies de tripanosomídeos com precisão já que esses oligonucleotídeos anelam em toda a família Tripanosomatiadae. Outros oligonucleotídeos do mesmo rDNA alvo podem participar na diferenciação direta apenas de *T. cruzi* (oligonucleotídeos D71 e D72) e de *T. rangeli*

(oligonucleotídeos R1 e R2). Todas as amostras positivas foram testadas por meio da PCR para *Leishmania* spp. objetivando-se diferenciar o gênero encontrado nas amostras (Figura 2.2), uma vez que a área analisada é considerada endêmica para esse parasita. Todas as

Tabela 2.2 – Distribuição das amostras positivas e negativas para *Trypanosoma* spp. (oligonucleotídeos D75 e D76) dividido entre as regiões administrativas analisadas do DF

Região Administrativa	Amostras Positivas	Amostras Negativas	TOTAIS
Águas Claras (Domiciliar)	6 (2,9%)	66 (32%)	72 (34,9)
Asa Sul (Domiciliar)	0 (0%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)
Asa Norte (Domiciliar)	0 (0%)	4 (1,9%)	4 (1,9%)
Vicente Pires (Peri-domiciliar)	4 (1,9%)	13 (6,3%)	17 (8,2%)
SMPW (Peri-domiciliar)	2 (0,9%)	6 (2,9%)	8 (3,8%)
Estrutural (Peri-domiciliar)	0 (0%)	20 (9,7%)	20 (9,7%)
Taguatinga (Peri-domiciliar)	0 (0%)	7 (3,3%)	7 (3,3%)
PAD DF (Rural/ Silvestre)	0 (0%)	40 (19,4%)	40 (19,4%)
Paranoá (Peri-domiciliar)	1 (0,4%)	14 (6,7%)	15 (7,2%)
São Sebastião (Peri-domiciliar)	3 (1,4%)	18 (8,7%)	21(10,1%)
TOTAIS	16 (7,7%)	190 (92,3%)	206

amostras positivas nesse estudo foram negativas para *Leishmania* spp. confirmando a infecção por *Trypanosoma* spp. A prevalência do agente etiológico da leishmaniose é persistente e vem aumentando sua incidência nos últimos anos (Reis et al, 2017). Os exames sorológicos entre as *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. não são métodos confiáveis para o diagnóstico dessas doenças em cães assintomáticos pois as reações cruzadas são bem descritas (Souza et al., 2009; Luciano et al, 2009) mesmo que sejam usados oficialmente para o diagnóstico de LVC. Portanto é necessário a inclusão de exames mais específicos como a PCR para determinar diagnósticos, diminuir a possibilidade de falsos resultados por reação cruzada e identificar corretamente possíveis casos de coinfeção por várias espécies da Família Trypanosomatidae.

Não existem dados oficiais sobre a população canina no DF, portanto a população é estimada junto aos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

(IBGE) definindo a população média de cães no Brasil de 1,8 cães por domicílio. Os dados oficiais de 2013 mostram mais de 700.000 domicílios no DF (IBGE, 2013), estimando-se uma população canina aproximada de 380.000 cães. Quando se compara a população canina presumida e o total de amostras do presente estudo o resultado obtido está abaixo do esperado (7,7%), uma vez que cerca de 15 a 50% da população canina em áreas endêmicas se encontra sob risco de infecção por *Trypanosoma* spp. (Dantas-Torres, 2008). Portanto, mesmo que o presente estudo não tenha avaliado a prevalência de *Trypanosoma* spp. na população total de cães, a ocorrência abaixo do esperado reforça o controle atual da transmissão vetorial no Distrito Federal.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

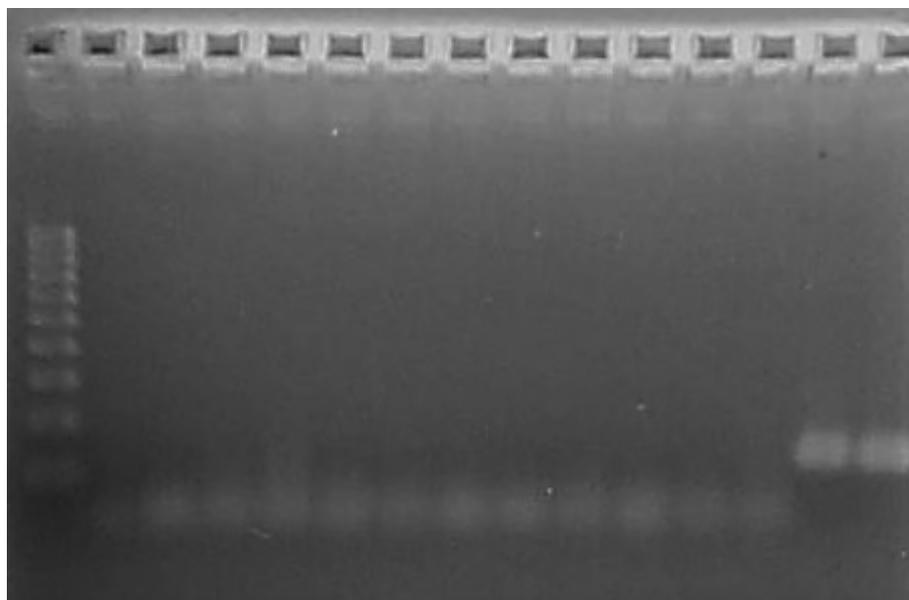


Figura 2.2 - Resultado da PCR para *Leishmania* spp. usando os oligonucleotídeos FW e BW. Coluna 1: régua molecular (100 bp, Invitrogen®) Coluna 2 e 3: controle negativo (água); Colunas 4 a 13: amostras negativas; Colunas 14 e 15: controle positivo

Os resultados demonstram que não existe diferença na infecção por *Trypanosoma* spp. entre as amostras positivas independente da forma que os cães são domiciliados. Em ambientes domiciliares, A infecção por *Trypanosoma* spp. é improvável por via vetorial. Desta forma, os animais positivos possivelmente foram infectados por meio de ingestão de insetos infectados, caça de pequenos animais ou ainda carcaça de animais infectados por *Trypanosoma* spp. mesmo em áreas altamente urbanizadas

(Almeida et al., 2013). Esses resultados são compatíveis com último inquérito nacional realizado entre 2001 e 2008 em crianças menores de cinco anos, residentes em área rural, que apontou uma prevalência da infecção de 0,03%. Destas, 0,02% com positividade materna concomitante, sugerindo transmissão vertical e apenas 0,01% com positividade somente na criança, indicando provável transmissão vetorial (MS, 2015). Esses resultados demonstram o êxito no controle da transmissão da doença por via vetorial sustentada no país, atestada pela certificação da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde em 2006 (MS, 2015) e que também condiz com os resultados apresentados, devido à baixa ocorrência de infecção por *Trypanosoma* spp. em cães nas regiões do DF analisadas nesse estudo.

A ocorrência de *Trypanosoma* spp. observada nas amostras pode ser explicada pela presença já descrita de vetores sinantrópicos registrados no DF como o *Panstrongylus megistus*, *P. geniculatus*, *P. diasi*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma pseudomaculata* e *T. sordida*. Oficialmente, *T. infestans* nunca foi registrado em casas nos limites do DF desde a instalação da vigilância entomológica, tampouco a transmissão autóctone de *Trypanosoma cruzi* foi comprovada na mesma região (Maeda et al., 2012). Há relatos da presença de *Trypanosoma* sp. em insetos flebotomíneos transmissores de LVC (Ferreira et al., 2015), porém investigações não sugerem que mosquitos, aracnídeos e anelídeos desempenhem papel na transmissão das tripanosomíases (Bazzoli et al., 2002; Dantas-Torres, 2008).

A infecção por via oral por ingestão dos insetos portadores de formas tripomastigotas é a forma de infecção mais provável em ambientes domiciliados. Nos ambientes peridomiciliar e rural, além da transmissão por via oral por ingestão de insetos, a vida livre dos cães também sustenta a possibilidade de transmissão por ingestão de carcaças e pequenos animais devido ao hábito de caça inerente aos cães (Castañera et al., 1998; Aquino et al., 1999; Bazzoli et al., 2002). Os resultados não coincidem com os resultados de inquérito sorológico realizado na região nordeste do Brasil onde o ambiente peridomiciliar e rural é considerado um fator de risco relevante naquela região para *Trypanosoma cruzi* (Ferreira et al., 2016). Assim sendo, a infecção oral por meio de ingestão de insetos ou de carcaças contaminadas seria uma via de transmissão mais

provável no DF que na região nordeste do Brasil.

O sequenciamento genético dos produtos obtidos por meio da PCR faz-se necessário para identificar as espécies de *Trypanosoma* spp. Após os resultados do sequenciamento, espera-se identificar predominantemente *T. Cruzi TcI*, pois esses parasitam cães e há ocorrência desse parasita na região central do Brasil (Almeida et al., 2013). A identificação de *T. evansi* também é possível, embora a maioria dos relatos de infecção onde não há tratamento adequado resulta em óbito, há relato infecção crônica em um cão com sintomatologia característica como fraqueza progressiva, inapetência e anemia no Rio Grande do Sul, onde mesmo sem devido tratamento o cão se reestabeleceu (Franciscato et al., 2007). Outro relato também no Rio Grande do Sul, onde houve apresentação aguda em dois cães também sintomáticos apresentando febre, inapetência, perda de peso e que apesar do tratamento específico com aceturato de diminazeno (7 mg/kg, em dose única) os pacientes vieram a óbito. (Colpo, et al., 2005). A infecção experimental de cães por *T. evansi* demonstrou sinais clínicos como febre, edema de membros anteriores e apatia (Aquino, 1999; Bazolli et al., 2002).

*T. rangeli* é prevalente em toda a América do Sul e Central em humanos e outros mamíferos, incluindo a Ordem Carnivora, mas como esse parasita só foi descrita na região amazônica (Maia da Silva, 2004, 2007, 2009), sua presença nas amostras analisadas é improvável.

Os relatos de *T. caninum* aumentam a cada ano desde a sua descrição (Pinto et al., 2014; de Oliveira et al., 2015) mas é improvável que alguma das amostras seja identificada pois todos os espécimes até agora identificados só foram isolados a partir de culturas axênicas de fragmentos intactos de pele e testaram negativo para hemocultura, infecção de macrófagos e triatomíneos, podendo indicar transmissão por outros vetores não triatomíneos (Madeira et al., 2009, de Oliveira et al., 2015).

## 6 CONCLUSÃO

Diante das 206 amostras analisadas, 7,7%(16) das amostras estavam infectadas para *Trypanosoma* spp. demonstrando uma situação endêmica para a infecção por *Trypanosoma* spp., com a presença de hospedeiros, vetores e parasitas na região pesquisada, possibilitando assim a transmissão vetorial, mecânica e por via oral. Não verificou-se diferença entre os ambientes que os cães vivem como fator de risco, sendo que os cães domiciliados, peridomiciliados e de ambiente rural/ silvestre apresentaram infecção por *Trypanosoma* spp. em 2,9% (6), 2,9%(6) e 1,9%(4) das amostras respectivamente. Em relação às regiões analisadas onde residem os cães no que diz respeito à presença da infecção por *Trypanosoma* spp. não se verificou diferença, mas o reduzido número de amostras coletadas em algumas regiões pode ter comprometido a análise. As técnicas de diagnóstico por meio da PCR devem ser usadas para o correto diagnóstico dos diversos parasitas que podem acometer os cães devido à reações cruzadas nos exames sorológicos atualmente utilizados.

A situação epidemiológica em relação aos tripanosomídeos na região estudada requer mais pesquisas para determinar a circulação das diferentes espécies na região e a determinação da prevalência daquelas espécies patogênicas tanto para cães, como para humanos, uma vez que ambos hospedeiros representam grupos de risco para essas endemias.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; New molecular tools for the identification of trypanosome species. **Future Microbiology**. v. 3(2), p. 167-176, 2008.

AQUINO, L.P.C.T. Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da infecção experimental em cães com *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p 255-260, 1999.

ALMEIDA, A. do B.P.F de; de PAULA, D.A.J.; OTTO, N.M.L.P.; JAUNE, F.W.; CRUZ, R.A.S.; MADEIRA, M.de F.; NAKAZATO, L.; MENDONÇA, A.J.; PESCADOR, C.A.; SOUSA, V.R.F. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in central western Brazil: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.55, n.4, p.287-289, 2013.

CASTAÑERA M.B., LAURICELLA M.A., CHUIT R., GÜRTLER R.E. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v.92, p. 671-683, 1998.

COLPO, C.B.; Monteiro, S.G.; Stainki, D.R.; COLPO, E.T.B.; HENRIQUES, G.B. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.35, n.3, p.717-719, 2005.

COURA J.R.; BORGES-PEREIRA J. - Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 45(3):p. 286-296, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**. v. 1(25), p.17, 2008.

DESQUESNES, M.; HOLZMULLER, P.; LAI, D.H.; DARGANTES, A.; LUN, Z.R.; JITTAPLAPONG, S. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Research International**. v.2013, p. 174-176, 2013.

DUZ, A.L.C.; VIEIRA, P.M.de A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARDOSO, J.M.de O.; de OLIVEIRA, F.C.B.; REIS, L. E.S.; TAFURI, W.L.; VELOSO, V.M.; REIS, A. B.; CARNEIRO, C.M. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 109(8), p.1005-1013, 2014.

EBERHARDT, A.T.; MONJE, L.D.; ZURVERA, D.A.; BELDOMENICO, P.M. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capybaras from Argentina using smearmicroscopy and real-time PCR assays. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.226–233, 2014.

FERNANDES, A. R. D. F., PIMENTA, C. L. R. M., VIDAL, I. F., OLIVEIRA, G. C., SARTORI, R. S., ARAÚJO, R. B., & AZEVEDO, S. S. Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25(1), p.90-98, 2016.

FERREIRA, T.S.; MINUZZI-SOUZA, T.T.C.; ANDRADE, A. J. de; COELHO, T.O.; ROCHA, D.A.; OBARA, M.T.; HECHT, M.; NITZ, N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. And *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.48(6), p.776-779, 2015.

GOMES Y.M.; LORENA V.M.; LUQUETTI .A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 104 (1), p. 115–21, 2009.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTEM, A.; PALMA A.R.T.; ABAD-FRANCH F.; CARRANZA, J.C. ; CUBA CUBA, C.A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.46(6), p.323-330, 2004.

HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet.Parasitol.* v125, p263–275, 2004.

HERRERA, L. *Trypanosoma cruzi*, causal agent of Chagas disease: The borderline between wild and domestic cycles in Venezuela. **Frontiers in Public Health**, v. 2, 2014.

HOARE, H. E. The trypanosomiasis of mammals: A zoological monograph. **Oxford: Blackwell**, p.555-93, 1972.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2013 [online]. Brasília: IBGE; 2013. Available from: – <https://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?codmun=530010&idtema=94>; consultado em 08/12/2017.

JAIMES-DUEÑES, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; VALENCIA-HERNANDEZ, A; SÁNCHEZ-ARÉVALO, D.; POCHE-CEBALLOS, A.; ORTÍZ-ÁLVAREZ, J.; MEJÍA-JARAMILLO, A. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggest the epidemiological importance of this species in Colombia. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 139, p. 82-89, 2017.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and vectors**. v. 10, p.17, 2017.

LUCIANO, R.M., LUCHEIS, S.B., TRONCARELLI, M.Z., LUCIANO, D.M.,

LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.46(3), p.181-187, 2009.

MAEDA, M. H.; GURGEL-GONÇALVES, R. Conhecimentos e práticas de moradores do Distrito Federal, Brasil, em relação à doença de Chagas e seus vetores. **Revista de Patologia Tropical** v. 41, n. 1, p. 15-36, 2012.

MAEDA M.H.; KNOX M.B.; GURGEL-GONÇALVES R.; Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** V45, p.71-76, 2012.

MILES, M.A., YEO, M., GAUNT, M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease. In: Kelly, J.M. (Ed.), *Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Chagas Disease*. **Eurekah.com & Kluwer Academic/Plenum Publishers** p. 1–15, 2003.

MORA M.C., SANCHEZ NEGRETTE O., MARCO D. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. **Jornal da Parasitologia** v. 91, p.1468–73, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica de 200 a 2013. Secretaria de Vigilância em Saúde – Boletim Epidemiológico. v. 46, n 21, 2015.

MONTENEGRO, V.M.; JIMÉNEZ M.; DIAS J.C.P., ZELEDÓN, R.; Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica; **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97(4), p.491-494, 2002.

PASCON J.P.E., NETO G.B.P., SOUSA M.G., JUNIOR D.P. & CAMACHO A.A. Clinical characterization of chronic chagasic cardiomyopathy in dogs. **Pesquisa**

**Veterinária Brasileira**. v. 30(2), p115-120, 2010.

RAINA, A. K., KUMAR, R., RAJAORA, V. S.; SRIDHAR, SINGH, R. P. Oral Transmission of *Trypanosoma evansi* in dogs and mice. **Veterinary Parasitology** v. 18, p. 67-9, 1985.

RASSI, A. & MARIN-NETO, J. A. Chagas disease; Review Article; **The Lancet** v.375, n.9723, p.1388-1402, 2010.

REIS, L.L.D., BALIEIRO, A.A.D.S., FONSECA, F.R., & GONÇALVES, M.J.F. . Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50(5), p.638-645, 2017.

SCHIJMAN A.G. Differential detection of *Blastocrithidia triatome* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24s ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina; **Acta Tropica** v. 99, p.50–54, 2006.

SOUZA, A.I., OLIVEIRA, T.M., MACHADO, R.Z., & CAMACHO, A.A. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira** p.150-152, 2009.

SOUZA, T.P.; SOUZA, C.; LOPES, D.O.; SANTOS, L. L.; BORTOLETA, N.D.A.; MACEDO, A.M.; VALADARES, H.M.S.; "Desenvolvimento de um sistema de PCR multiplex para a caracterização molecular de cepas do *Trypanosoma cruzi* em suas principais linhagens filogenéticas", . In: **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica - Blucher Biochemistry Proceedings**, v.1, n.1, p. 1-2, 2015.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 118-123, 2009.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents:

the need for an integrated approach. **International Journal of Parasitology** v.28, p.85–104, 1998.

UMEZAWA, E. S.; SOUZA, A. I.; PINEDO-CANCINO, V. et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 15–20, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record** v6,nº 6; p. 33-44, 2015

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution** v.12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 1051-1054, 2009.