Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação em Zoologia

Ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Distrito Federal, Brasil.

João Lucas Magner Lourenço

Orientador

Rodrigo Gurgel Gonçalves - Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores - Faculdade de Medicina / UnB

Coorientadora

Ludmilla Moura de Souza Aguiar – Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos – Departamento de Zoologia/UnB

Brasília – DF

2016

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Zoologia

Dissertação de Mestrado
João Lucas M. Lourenço

Título:
"Ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Distrito Federal, Brasil."

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves
Presidente/Orientador
FM/UnB

Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw
Membro Titular
USP

Prof. Dr. Jader Soares Marinho Filho.
Membro Titular
ZOO/UnB

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
Membro Suplente
GEM/UnB

Brasília, 29 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agredeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, pela oportunidade dada em realizar este trabalho, os ensinamentos e a paciência mantida durante todo este curso de mestrado.

A toda equipe que me ajudou durante o curso: Ao Prof. Dr. Vagner José Mendonça pelo auxílio nos trabalhos de campo e análises filogenéticas. À profa. Dra. Ludmilla Aguiar por provar que os morcegos são realmente os mamíferos mais legais. À Aline Rapello por me ensinar os procedimentos de manejo de animais silvestres. Ao Barbosa pelo auxílio no transporte às áreas de estudo e também manejo dos morcegos. As minhas duas estagiárias maravilhosas (Larissa e Amanda) que tiveram que me aguentar durante todo este trabalho. À Renata do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da UnB que me ajudou, e muito, nos procedimentos moleculares e aguentou toda a minha desordem no laboratório. Ao prof. Dr. César Cuba Cuba por revisar versões preliminares da dissertação.

À Profa. Dra. Nadjar Nitz, coordenadora do Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LIB) da Faculdade de Medicina da UnB pela colaboração na realização dos procedimentos moleculares. A todos do LIB que me ajudaram de alguma forma neste processo. À Camilla pelo socorro nas PCRs, à Cássia por me ensinar a cuidar das hemoculturas e especialmente à Thais Minuzzi por me mostrar que biologia molecular não é bicho de sete cabeças. Ao veterinário Rafael por mostrar técnicas de anestesia e coleta de sangue dos morcegos. Aos membros da banca examinadora, Dr. Jeffrey Shaw, Dr. Jader Marinho Filho e Dr. Fernando Rodrigues por aceitarem participar de minha avaliação.

Finalmente, agradeço à Pós-Graduação de Zoologia da Universidade de Brasília (PG-ZOO) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado. Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....06

LISTA DE TABELAS.....09

RESUMO.....10

ABSTRACT.....11

1. INTRODUÇÃO.....12

1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera) 12

1.2 Tripanossomatídeos.....14

1.2.1 O gênero *Trypanosoma* e a Doença de Chagas.....16

1.2.2. O gênero *Leishmania* e as Leishmanioses.....18

1.3 Os tripanossomatídeos de morcegos.....19

1.3.1 *Trypanosoma* spp 19

1.3.2. *Leishmania* spp. 22

1.3.3. The “Bat Seeding Hypothesis” 24

1.4. Genes utilizados para estudos de taxonomia e filogenia em tripanossomatídeos.....26

1.5 A PCR em tempo Real.....28

1.6 A situação atual da leishmaniose e Doença de Chagas no Distrito Federal 28

1.7 Justificativa 29

1.8 Objetivos. 30

2. MATERIAIS E MÉTODOS 31

2.1 Áreas de Estudo.....31

2.2 Amostragem e identificação dos morcegos 32

2.3 Coleta de material biológico 33

2.4 Análise parasitológica do material biológico.....34

2.5 Análise molecular do material biológico.....35

2.6. Autorização e aspectos éticos da pesquisa 38

3. RESULTADOS 38

3.1 Amostragem 38

3.2. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos.....42

3.3. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos entre sexos, categorias de massa corporal e entre espécies 43

3.4. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos de acordo com o hábito alimentar.....45

3.5. Esfregaços sanguíneos e hemoculturas.....46

3.6. Detecção molecular de tripanossomatídeos em diferentes amostras biológicas de morcegos. 47

3.7. Identificação molecular das espécies de tripanossomatídeos nas amostras 48

3.7.1 qPCR – kDNA.....48

3.7.2. Sequenciamento dos amplicons SSU rRNA 50

4.0 DISCUSSÃO 55

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS 61

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62

ANEXOS

Anexo 1 76

Anexo 2 77

Anexo 3 80

Anexo 4.....81

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Árvore evolutiva da ordem Chiroptera baseada em genes nucleares e mitocondriais de quirópteros (Teeling, 2009) 13

Figura 2. Estágios de desenvolvimento mais conhecidos de tripanossomatídeos. A: Promastigota; B: Epimastigota; C: Tripomastigota; D: Amastigota; n: núcleo; c: cinetoplasto; b; bolsa flagelar; f: flagelo; m: membrana ondulante. Fonte: Adaptado de Hoare (1972). 15

Figura 3. Formas celulares de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* (A, B) *T. vespertillionis*; (C,D) *T. pipistrelli*; (E,F) *T. phyllostomae* (Adaptado de Hoare, 1972)..... 20

Figura 4. Algumas formas celulares de tripanossomas do gênero *Megatrypanum* presentes em morcegos da América do Sul. (A) *Trypanosoma megaderma;* (B) *Trypanosoma pifanoi*; (C) *Trypanosoma leonidasdeanei*; (D, E) *Trypanosoma pessoai*. (Hoare, 1972).....22

Figura 5. "The bat seeding hypothesis". O *T. cruzi* teria se originado de um tripanossoma proveniente de um morcego. (T) representa a passagem do parasito dos morcegos para outros mamíferos (Hamilton *et al.*, 2012).....25

Figura 6. Representação esquemática de cistron ribossômico de rRNA precursores de tripanossomatídeos (Lima, 2011) 27

Figura 7. Exemplo de maxicírculo de kDNA de *T. cruzi* (Westenberger *et al*., 2006) 28

Figura 8. Locais de amostragem dos morcegos no Distrito Federal, Brasil. BRAZ (Fazenda Sarah, Brazlândia), FERCAL (Fercal, ao norte de Sobradinho), REBIO (Reserva Biológica da Contagem, Sobradinho), ARB (Arboreto da UnB, Asa Norte), JBB (Jardim Botânico de Brasília) e FAL (Fazenda Água Limpa da UnB, Park Way). (Fonte: Google Earth) 31

Figura 9. Montagem das redes de neblina (A) e captura dos quirópteros (B) 33

Figura 10. Coleta de sangue do antebraço (A). Realização do swab (B). Coleta de sangue do antebraço (C). Sangue no papel de filtro (D) 34

Figura 11. Fluxograma de processamento de amostras biológicas 35

Figura 12: Espécies de morcegos da família Phyllostomidae capturadas: (A) *Carollia perspicillata*, (B) *Desmodus rotundus*, (C) *Diphylla ecaudata*, (D) *Glossophaga soricina*, (E) *Artibeus lituratus*, (F) *Artibeus planirostris*, (G) *Chiroderma doriae*, (H) *Chiroderma villosum*, (I) *Sturnira lilium*, (J) *Platyrrhinus lineatus*, (K) *Phyllostomus hastatus*. (Fontes A, C, D, F, H: Novaes, R.L.M. < http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>) (Fonte G: Cláudio, V.C.< http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>) (Fonte I: Arboleda, D.T. <http://www.inaturalist.org>) 41

Figura 13. Espécies de morcegos da família Vespertillionidae capturadas: (A) *Lasiurus blossevillii*, (B) *Myotis riparius*, (C) *Myotis nigracans*. (Fonte: Novaes, R.L.M. < http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>) 41

Figura 14. Gel de agarose a 1% mostrando resultado da PCR direcionada ao gene SSU rRNA, para tripanossomatídeos de amostras de morcegos (1 a 17). MM: marcador de peso molecular; Controles positivos: TC (*Trypanosoma cruzi*) – LB *(Leishmania braziliensis*) - Controle negativo: CN. - B: Branco.....41

Figura 15. Número de morcegos capturados e positivos para tripanossomatídeos nas áreas de estudo no Distrito Federal entre janeiro e julho de 2015 42

Figura 16. Relação entre machos e fêmeas infectados, número total de machos e fêmeas, infecção relativa e total desses 43

Figura 17. Número de morcegos capturados e positivos para tripanossomatídeos de acordo com as categorias de massa corporal.....44

Figura 18. Número de morcegos positivos para tripanossomatídeos via PCR SSUrRNA, número de indivíduos no total por hábito alimentar e percentual de infecção (%) de acordo com o hábito alimentar.....46

Figura 19. Formas epimastigotas de tripanossomatídeos encontrados nas hemoculturas de *Carollia perspicillata*. As setas indicam as estruturas observadas: (n) núcleo, (k) cinetoplasto, (m) membrana ondulante, (f) flagelo. Barra de escala: 10 micrômetros. As sequências obtidas das amostras dessas culturas foram identificadas como *Trypanosoma dionisii*.....47

Figura 20. Formas celulares de tripanossomatídeos encontrados nas hemoculturas de *Diphylla ecaudata.* (A). Epimastigota (B). Tripomastigota. As sequências obtidas das amostras dessas culturas foram identificadas como *Trypanosoma dionisii*.....47

Figura 21. qPCR utilizando alvo kDNA que amplifica regiões do minicírculo de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli.* A *Melt curve* permite verificar a temperatura de dissociação de bases e cada espécie tem uma temperatura diferente. (A) *Melt curve* do controle positivo para *T. cruzi* (I) e amostra positiva para *T. cruzi* (II) do morcego *C. perspicillata* da área da FAL. (B). *Melt curve* do controle positivo para *T. rangeli*. (I) Amostra positiva para *T. rangeli* do morcego *A. planirostris* da área do Arboreto (II) 49

Figura 22. Gel de agarose a 1% da qPCR – kDNA realizada. São apresentadas as diferenças de alturas e pares de bases encontradas em TC (*T. cruzi*) e TR (*T. rangeli*) (amostras). B (Branco) – MM (Marcador molecular). – TC1 (Controle positivo para *T. cruzi)* 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de morcegos infectadas por espécies de *Leishmania* em relação ao hábito alimentar. (Revisado após Roque & Jansen, 2014; da Costa *et al*., 2015; Kassahun *et al*., 2015; Oliveira *et al*., 2015 e Berzunza-Cruz *et al*., 2015).....23

Tabela 2. Relação de famílias, subfamílias e espécies encontradas em seis áreas de estudo no Distrito Federal entre janeiro e julho de 2015. Proporção de machos e fêmeas encontrada e frequência (Fr.) das espécies encontradas..... 39

Tabela 3. Espécies de morcegos encontradas, total de indivíduos capturados por espécies, total de indivíduos positivos para tripanossomatídeos e frequência relativa de infecção para cada espécie..... 45

Tabela 4. Espécies e número de morcegos positivos nas amostras de sangue, asa e swab na PCR SSU rRNA.....48

Tabela 5. Número de indivíduos infectados e percentuais de infecção por *Leishmania* spp. encontrados para as espécies de morcegos em relação às áreas de estudo..... 51

Tabela 6. Espécies de morcegos e parasitos identificados a partir do sequenciamento com SSU rRNA.(*) Amostras de parasitos identificadas somente pela qPCR – kDNA.....52

RESUMO

Morcegos são hospedeiros de várias espécies de tripanossomatídeos, inclusive daquelas de interesse médico como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp*.* No entanto, pouco ainda se sabe sobre quais desses parasitos estão presentes nos morcegos do Distrito Federal (DF), Brasil, e qual o papel dos morcegos na manutenção dos tripanossomatídeos em ciclos silvestres. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos no DF. As capturas de morcegos foram realizadas com redes de neblina em seis áreas amostrais: Fazenda Água Limpa - FAL, Jardim Botânico de Brasília, FERCAL, REBIO Contagem, Campus da UnB em Brasília, e Fazenda Sarah em Brazlândia. Foram feitas coletas de fragmentos de asa, swab bucal e sangue que foi inserido em hemocultura, impregnado em papel de filtro e utilizado para realização de esfregaços sanguíneos. Para a análise molecular dos parasitos, foi realizada uma Nested PCR SSU rRNA. Na primeira PCR, foram utilizados os primers S4 e S12 gerando um fragmento de 520 bp, o qual foi usado para a Nested PCR com os primers S17 e S18 gerando um fragmento de 480bp, cujos produtos foram sequenciados. Além da Nested PCR SSU rRNA, foi também realizada uma qPCR kDNA para identificar quais amostras estavam positivas para *T. cruzi* e *T. rangeli*. Um total de 146 morcegos de 14 espécies foram capturados. Não foram identificados parasitos nos esfregaços sanguíneos. Contudo, foram identificadas hemoculturas positivas para *Trypanosoma dionisii* em *Carollia perspicillata e Diphylla ecaudata*, sendo que *T. dionisii* é registrado pela primeira vez em *D. ecaudata.* O sangue impregnado em papel de filtro foi a amostra biológica com a maior positividade para tripanossomatídeos, seguido pelas amostras de swab e de asa. Foram identificados *T. cruzi, T. rangeli, T. lewisi* e *Leishmania* spp. nos morcegos. Em todas as áreas foi detectada infecção por tripanossomatídeos, sendo que a FAL foi a área onde ocorreu a maior riqueza de espécies de tripanossomatídeos. *Leishmania* spp. foi encontrada parasitando 12 espécies de morcegos e estava presente em todas as áreas de estudo, evidenciando que este parasito está circulando no meio silvestre no DF. A PCR de amostras de swab bucal foi um método não invasivo e prático para identificação de *Leishmania* spp. Morcegos não devem ser excluídos como potenciais reservatórios para tripanossomatídeos de interesse médico, assim como na participação do ciclo enzoótico desses parasitos.

Palavras-Chave: Cerrado, morcegos, tripanossomatídeos, *Trypanosoma*, *Leishmania*, reservatório.

ABSTRACT.

Bats are hosts of various species of trypanosomatids, including those of medical interest such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. However, there isn't enough infomation about which of these parasites are present in bats of the Distrito Federal (DF), Brazil, and also the role of bats in the maintenance of the trypanosomes in the wild cycles. Therefore, this work has aimed to analyze the occurrence of trypanosomatids in bats in Distrito Federal. The bats were captured with mist nets in six sites: Fazenda Água Limpa - FAL, Jardim Botânico de Brasília, Fercal, REBIO Contagem, Campus da UnB in Brasília, and Fazenda Sarah in Brazlândia. Wing fragments, oral swabs and blood were collected. The blood collected was inserted into blood culture, impregnated in filter paper and used to perform blood smears. For the molecular analysis of the parasites, a SSU rRNA nested PCR was performed. In the first PCR, S4 and S12 primers were used, which generate a fragment of 520 bp. This fragment was used for the nested PCR with the primers S17 and S18 that generate a 480bp fragment, whose products were sequenced. Besides the nested PCR SSU rRNA, a kDNA qPCR was also performed to identify which samples were positive for *T. cruzi* and *T. rangeli*. A total of 146 bats of 14 species were captured. No parasites were identified in the blood smears. However, positive blood cultures were identified for *Trypanosoma dionisii* in *Carollia perspicillata* and *Diphylla ecaudata*, also this is the first recorded of *T. dionisii* in *D. ecaudata*. The blood impregnated in filter paper was the biological sample with the largest postivity for trypanosomatis, followed by the swab samples and the wing samples. *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. lewisi* and *Leishmania* spp. were identified in bats. In all areas infection by trypanosomatid was detected, and FAL was the area where the greatest species richness of trypanosomatids was detected. *Leishmania* spp. was found parasitizing 12 species of bats and it was present in all the the study areas, showing that this parasite is circulating in wild areas in DF. The PCR of oral swabs was a non-invasive and practical method for identification of *Leishmania* spp. Bats should not be excluded as potential reservoirs for trypanosomatids of medical interest, as well as their participation in the enzootic cycle of these parasites.

Key-Words: Cerrado, bats, trypanosomatids, *Trypanosoma*, *Leishmania*, reservoir.

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera)

A ordem Chiroptera contém pelo menos 1120 espécies descritas e é a segunda maior ordem de mamíferos (Simmons, 2005), atrás apenas dos roedores, constituindo um quarto de toda a fauna de mamíferos existente. Esta ordem é cosmopolita, ausente somente nos pólos e determinadas ilhas oceânicas, sendo que a maioria das espécies de morcegos encontra-se em regiões tropicais. Os morcegos são animais de vida longa que podem conviver em colônias com uma ou mais espécies e de poucos a milhares de indivíduos, sendo raramente solitários (Nowak, 1991). São os únicos mamíferos que voam. No Brasil, atualmente são conhecidas nove famílias, com 64 gêneros e 167 espécies de morcegos (Paglia *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2014).

Com base em dados morfológicos, a ordem Chiroptera é divida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera apresenta somente a família Pteropodidae, com espécies conhecidas como raposas voadoras e que caracteristicamente não apresentam sistema de ecolocalização. Essas espécies são frugívoras e ocorrem no Velho Mundo, geralmente vivendo em grandes colônias em árvores na África, Ásia e Oceania (Simmons & Geisler, 1998). A subordem Microchiroptera tem distribuição no Novo e Velho Mundo, com centenas de espécies, 17 famílias e quatro superfamílias: Rhinolophoidea, Emballonuroidea, Noctillionoidea e Vespertillionoidea (Teeling *et al*., 2005). Os morcegos dessa subordem são, em sua maioria, insetívoros. Porém há algumas espécies com especializações para se alimentar de pólen, frutas, néctar, brotos de plantas, até outros animais (vertebrados e invertebrados) e sangue. Atualmente, baseado em análises filogenéticas, a ordem Chiroptera é considerada como monofilética e foi divida em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. A subordem Yinpterochiroptera abrange os morcegos das famílias Pteropodidae (Megachiroptera), Rhinolophidae, Megadermatidae e Rhinopomatidae (Microchiroptera). A subordem Yangochiroptera abrange todas as outras famílias de morcegos da antiga subordem Microchiroptera (Teeling, 2009). (Figura 1).

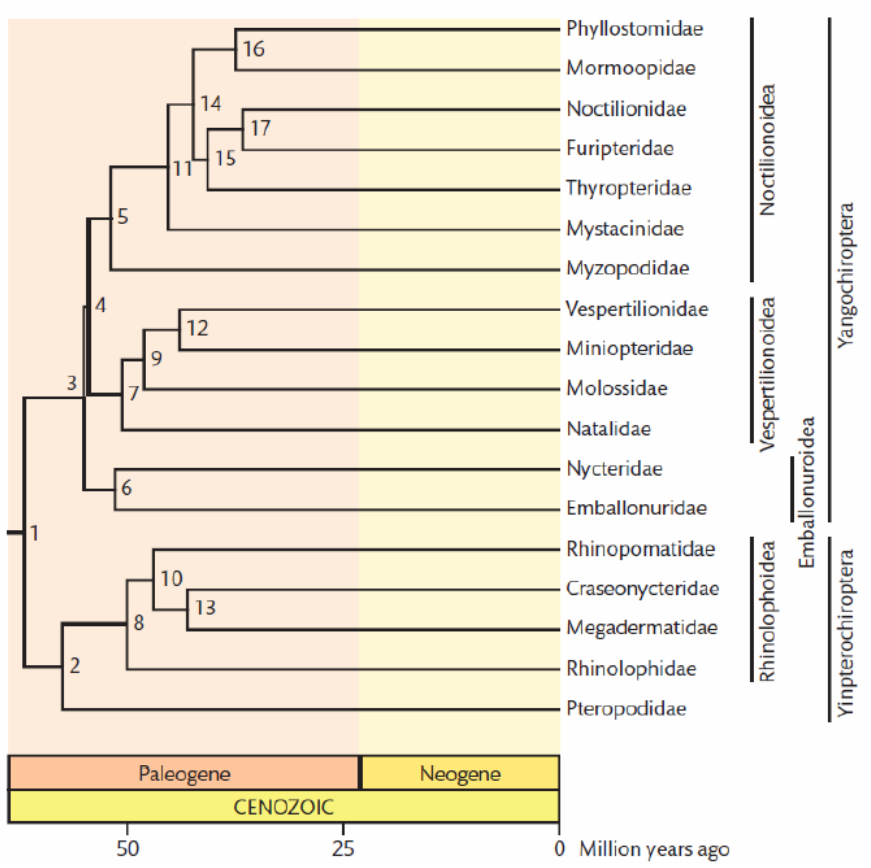


Figura 1. Árvore evolutiva da ordem Chiroptera baseada em genes nucleares e mitocondriais de quirópteros (Teeling, 2009).

Os morcegos são importantes nas comunidades neotropicais por ocuparem uma variedade de nichos tróficos e apresentarem muitas vezes a maior riqueza e abundância de espécies de uma determinada área (Gardner, 1977; Giannini & Kalko, 2004; Dietz & Kalko, 2006). Muitas espécies de morcegos atuam como dispersoras de sementes, polinizadoras e controladoras de populações de insetos (Kunz *et al.*, 2007). A sobrevivência dos morcegos depende principalmente da sua mobilidade na procura de comida e na presença de abrigo (Savani *et al.*, 2010; Aguiar *et al*., 2014).

Por serem altamente móveis, possuírem ampla distribuição geográfica e comportamento social, morcegos facilitam a transmissão de agentes infecciosos na natureza. Até o momento são conhecidas algumas doenças associadas aos morcegos como a raiva (Thoisy *et al.*, 2016), a síndrome de acuidade respiratória severa (SARS) (Menachery *et al*., 2015), a henipavirose (Guyatt *et al.*, 2003; Halpin *et al.*, 2000), a hantavirose (Oliveira *et al*., 2014), o ebola (Leroy et al., 2005) e as tripanossomíases (Hamilton *et al.*, 2012; Roque & Jansen, 2014).

Morcegos ocorrem também em cidades e os efeitos da urbanização nesses mamíferos podem depender da condição do habitat e do padrão de desenvolvimento dessas (Oprea *et al*., 2009; Esbéard *et al*., 2014). Ecossistemas urbanos oferecem abundantes recursos e abrigos, além de serem locais praticamente livres de predadores. Consequentemente, muitas espécies de morcegos conseguem se adaptar em ambientes urbanos, aumentando a probabilidade de contato com pessoas e animais domésticos (Kunz, 1982). Por serem apontados como reservatórios de doenças zoonóticas (Hamilton *et al.*, 2012; Guyatt *et al.*, 2003; Roque & Jansen, 2014) os morcegos necessitam de uma atenção maior na saúde pública, assim como os insetos vetores associados ao ambiente onde esses mamíferos são encontrados.

1.2 Tripanossomatídeos.

Tripanossomatídeos são protozoários parasitos pertencentes ao Filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 1993). Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são os de maior interesse médico na família Trypanosomatidae, responsáveis por doenças como as Leishmanioses e Doença de Chagas (DCh), respectivamente.

Os tripanossomatídeos apresentam uma alternância de formas celulares em seus ciclos biológicos, graças ao complexo fenômeno da diferenciação celular. Essa alternância de formas celulares pode ocorrer na passagem entre os hospedeiros vertebrados ou invertebrados, mas também podem acontecer dentro de um mesmo hospedeiro como uma forma de antecipação para uma próxima etapa no ciclo de desenvolvimento do parasito. São parasitos caracterizados por possuírem flagelo e uma região mitocondrial com DNA condensado, próximo ao flagelo, denominado de cinetoplasto.

Em todas as formas celulares dos ciclos biológicos de Trypanosomatidae, o flagelo origina-se próximo ao cinetoplasto, e uma bolsa flagelar, embora por vezes inconspícua à microscopia ótica, está presente no ponto em que o flagelo emerge do corpo celular. Uma "membrana ondulante" visível em tripomastigotas e epimastigotas é formada como um estiramento da membrana celular por ação mecânica do flagelo que, após emergir da bolsa flagelar, percorre a superfície extracelular da membrana citoplasmática, aderida fortemente a mesma (Hoare, 1972).

Para descrever as formas celulares dos tripanossomatídeos, uma nomenclatura específica faz referência à exteriorização e ponto de emergência do flagelo do corpo celular, à existência e extensão de membrana ondulante, a posição do cinetoplasto relativa ao núcleo e as porções anterior e posterior da célula

e ao formato geral da célula. As formas biológicas mais conhecidas dos tripanossomatídeos são: (1) Promastigota; forma celular alongada com o cinetoplasto anterior ao núcleo, o flagelo tornando-se livre a partir da porção anterior da célula. (2) Epimastigota; forma celular alongada com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo, com uma pequena membrana ondulante lateralmente disposta. (3) Tripomastigota; forma celular alongada com cinetoplasto, posterior ao núcleo, com longa membrana ondulante. (4) Amastigota; forma arredondada ou oval, com flagelo curto que não se exterioriza (Hoare, 1972) (Figura 2).

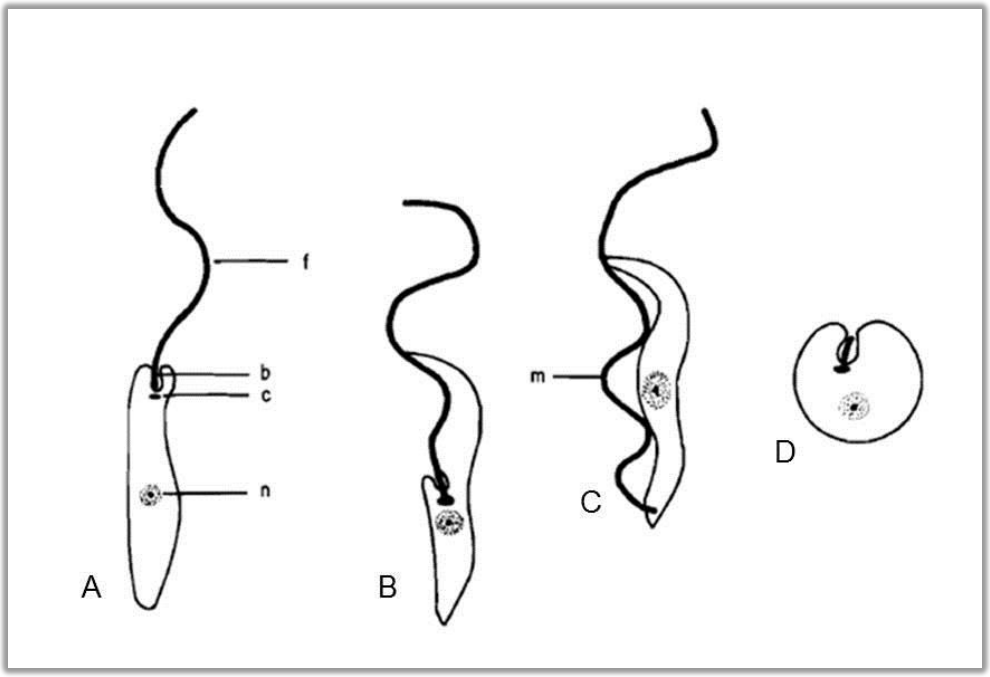


Figura 2. Estágios de desenvolvimento mais conhecidos de tripanossomatídeos. A: Promastigota; B: Epimastigota; C: Tripomastigota; D: Amastigota; n: núcleo; c: cinetoplasto; b; bolsa flagelar; f: flagelo; m: membrana ondulante. Fonte: Adaptado de Hoare (1972).

A ocorrência dessas fases durante o desenvolvimento dos tripanossomatídeos é usada na classificação taxonômica sendo um dos critérios para determinação do gênero (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia, Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*). Alguns desses gêneros incluem parasitos monoxênicos de insetos (ex: *Leptomonas*, *Crithidia*), outros são parasitos de insetos de plantas (*Phytomonas*). As espécies de tripanossomatídeos de mamíferos pertencem aos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum* (Camargo, 1998). O gênero *Trypanosoma* é ainda classificado em duas seções de acordo com o desenvolvimento no inseto vetor: (1) Stercoraria que inclui espécies em que o desenvolvimento é finalizado no trato digestório posterior do inseto e a transmissão é contaminativa; (2)

Salivaria, inclui espécies em que o desenvolvimento é finalizado no trato anterior do inseto vetor e a transmissão é inoculativa (Hoare, 1972).

1.2.1 O gênero *Trypanosoma* e a Doença de Chagas.

Mais de 150 espécies de *Trypanosoma* já foram descritas parasitando todas as classes de vertebrados. Contudo, a maioria das espécies circula apenas no ambiente silvestre e não é patogênica para seus hospedeiros (Hamilton *et al.*, 2007). Somente *T. cruzi* e *T. rangeli* infectam o homem, sendo *T. cruzi* o único patogênico para o ser humano.

Os tripanossomas apresentam-se nas formas celulares: amastigotas, esferomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. A transmissão ao hospedeiro vertebrado se dá por uma das seguintes formas: (1) pela picada do inseto vetor, hematófago. (2) pela contaminação, com fezes do vetor, de membranas mucosas ou pele escarificada. (3) pela ingestão do vetor pelo hospedeiro não humano. (4) pela inoculação de formas infectantes juntamente com a secreção oral de sanguessugas. (5) pela ingestão do vetor pelos hospedeiros, no caso dos tripanossomas de peixes. As dimensões dos tripanossomas podem variar, entre 15 e 100µm, chegando a 1.200 µm em morcegos.

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DCh), que tem ampla distribuição no continente americano (Coura & Viñas, 2010) acometendo cerca de seis a sete milhões de pessoas (WHO, 2015). Esse parasito é transmitido principalmente por triatomíneos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae (Lent & Wygodzinsky, 1979). *Trypanosoma cruzi* já foi encontrado em cinquenta gêneros e mais de 150 espécies de mamíferos de oito ordens, incluindo Chiroptera (http://www.mammalparasites.org, Jansen *et al*. 2015). No Brasil, 100.000 casos novos de DCh eram reportados anualmente nas décadas de 1970 e 1980, quando a prevalência estimada era de seis milhões de infectados. Atualmente estima-se que haja cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* no Brasil (Martins-Melo *et al*., 2014). Até o momento não há vacina nem tratamento antiparasitário efetivo (Coura e Viñas, 2010).

A ação patogênica do *T. cruzi* sobre o hospedeiro é muito variável e se deve a fatores como a diversidade genética do protozoário (Oliveira *et al.*, 1998) uma vez que as populações naturais de *T. cruzi* podem ter sido submetidas à evolução clonal, com eventos raros de combinação genética (Tibayrenc *et al*., 1986). Atualmente, com a utilização de marcadores moleculares em estudos de filogenia, as cepas de *T. cruzi*

foram divididas em seis unidades discretas de tipificação (DTUs), denominadas TcI a TcV, (Zingales *et al*., 2009). Os isolados pertencentes às DTUs TcI, TcIII e TcIV predominam no ciclo silvestre, enquanto isolados das DTUs TcII, TcV e TcVI estão associados principalmente com o ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão (Lima, 2011).

Em um estudo mais recente (Jansen *et al*., 2015) determinou-se que a infecção por *T. cruzi* é resultante de uma cadeia de fatores múltiplos e complexos. A transmissão de *T. cruzi* no ambiente silvestre está entrelaçada em uma teia ecológica complexa de espécies diferentes, onde uma súbita mudança em um dos pontos dessa resulta na emergência do parasito e a formação de um novo cenário enzoótico. Hoje já se sabe que o *T. cruzi,* pela sua habilidade de explorar diferentes tipos de recursos e sua manutenção em diversos reservatórios, pode ser considerado como um parasito generalista de espécies, sendo que cada espécie hospedeira atua como um filtro biológico diferente, possivelmente selecionando clones diversos do parasito (Jansen *et al*., 2015).

Identificar reservatórios de parasitos, como o *T. cruzi*, com vários tipos de hospedeiros é de grande dificuldade (Jansen & Roque, 2010). Segundo Ashford (1996), um reservatório pode ser considerado como um sistema ecológico complexo formado por uma ou mais espécies responsáveis pela manutenção de determinada espécie de parasito na natureza. Muitos mamíferos atuam como reservatórios para *T. cruzi* (Jansen *et al*., 2015). Por exemplo, Didelphimorphia é uma ordem que contém espécies competentes na manutenção desse parasito, assim como Artiodactyla, Cingulata, Carnivora, Primates, Lagomorpha, Rodentia e Chiroptera (http://www.mammalparasites.org). Adicionalmente, uma complexa rede DTUs e infecções mistas de *T. cruzi* foram identificadas nos biomas brasileiros (Jansen *et al*., 2015).

A distribuição da doença de Chagas está associada à distribuição dos vetores triatomíneos relacionados a essa doença (Villela *et al*., 2009, Gurgel-Gonçalves *et al*. 2012). A maioria dos triatomíneos vive em ambientes silvestres (Carcavallo *et al*., 1998), contudo algumas espécies são altamente adaptáveis ao ambiente domiciliar (Silveira & Dias, 2011). No DF, já foram registradas as seguintes espécies: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *T. sordida*, *P. geniculatus*, *P. diasi* e *Rhodnius neglectus* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Maeda *et al*., 2012). A proximidade de habitats e sítios específicos de morcegos com triatomíneos pode acarretar a possibilidade de infecção desses mamíferos por tripanossomatídeos.

As principais medidas profiláticas da doença de Chagas estão focadas no combate aos triatomíneos, no diagnóstico precoce da doença e na melhoria das condições de habitações rurais, com moradias adequadas e higiênicas que não permitam a colonização e infestação de triatomíneos vetores (Hoare, 1972).

1.2.2. O gênero *Leishmania* e as Leishmanioses.

Cerca de 35 espécies de *Leishmania* já foram descritas pertencentes a três subgêneros (*Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Viannia*), sendo que pelo menos 20 delas infectam seres humanos. Os estágios de *Leishmania* encontrados parasitando os insetos vetores, flebotomíneos, são as formas promastigota e paramastigota. Nos vertebrados, em sua maioria nos mamíferos, a forma encontrada, parasitando intracelularmente os macrófagos é a amastigota. Os amastigotas ingeridos pelos insetos vetores rapidamente se transformam em promastigotas, a forma típica do vetor. Os promastigotas, formas infectantes para os vertebrados, são inoculados juntamente com a saliva dos insetos por ocasião da alimentação destes. As formas amastigotas medem entre 2 e 5µm de diâmetro, os promastigotas entre 15 e 20 µm de comprimento, com um flagelo livre de igual tamanho.

A leishmaniose é uma zoonose resultante da infecção por parasitos do gênero *Leishmania,* e considerada uma doença tropical negligenciada (Maudlin *et al.*, 2009). As infecções não controladas resultam em lesões na pele e na mucosa (cutânea e mucocutânea), ou em lesões internas (visceral) as quais são potencialmente fatais (Ministério da Saúde, 2010).

Muitas espécies de mamíferos podem servir como reservatórios para o ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1970; Savani *et al.,* 2010; Lainson, 2010), sendo cães, gatos e cavalos os mais comuns em ambientes domésticos. Em ambientes silvestres, roedores e marsupiais são responsáveis para a manutenção de *Leishmania* (Quaresma *et al.*, 2011; Andrade *et al*., 2015). Estudo recente (Roque & Jansen, 2014) demonstra uma complexa rede de infecção por *Leishmania* em mamíferos não humanos, o que comprova que há poucas informações sobre a manutenção do parasito em potenciais hospedeiros e reservatórios. Além dos mamíferos citados anteriormente, também já foram detectadas infecções em primatas, carnívoros, cingulados, xenartras e quirópteros (Roque & Jansen, 2014).

Tendo em vista que a principal forma de infecção dos hospedeiros vertebrados é a partir da picada do flebotomíneo, as medidas profiláticas resumem-se basicamente no combate do inseto vetor. Assim, a utilização de inseticidas e de mosquiteiros são de grande utilidade, uma vez que evitam o contato dos

hospedeiros com os vetores. Contudo, essas medidas de controle são de difícil aplicação em ambiente silvestre devido à ocorrência de hábitats crípticos de diversos vertebrados (Roque & Jansen, 2014).

1.3 Os tripanossomatídeos de morcegos

1.3.1 *Trypanosoma* spp

Cerca de 80 espécies de morcegos foram encontradas infectadas por tripanossomas ao redor do mundo (Hoare, 1972, Jansen *et al*., 2015). No Brasil existem 40 espécies de morcegos já infectadas e mais de dez espécies de tripanossomas registradas (Marcili, 2008). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o desenvolvimento de tripanossomas em quirópteros (Lima, 2011). Infecções mistas por tripanossomas são bem comuns na ordem Chiroptera sendo que já foram identificadas infecções em morcegos por tripanossomas da Seção Stercoraria (subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) e Salivaria (*Trypanozoon*) (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976). Contudo, as infecções mais comuns são causadas por espécies de tripanossomas dos subgêneros *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*, e os quirópteros insetívoros são os mais afetados (Molyneaux, 1991).

O subgênero *Schizotrypanum* compreende tripanosomas relativamente pequenos com cinetoplasto volumoso e formato típico em “C”, que infectam o homem e outros mamíferos (Hoare, 1972; Lima, 2011). Com exceção de *T. cruzi*, as demais espécies desse subgênero são restritas e bastante comuns em morcegos (Hoare, 1972; Lima, 2011). As espécies que já foram descritas no Novo Mundo são: *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T.cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. hedricki*, *T. myoti*, *T. pipistrelli* e *T. phyllostomae* (Figura 3) (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976). Filogeneticamente, algumas espécies de tripanossomas desse subgênero formam o clado *T.cruzi*-like (Cottontail *et al*., 2014), tripanossomas próximos geneticamente do *T. cruzi*. São parasitos morfologicamente complicados de serem identificados, sendo que a identificação deve ser auxiliada por evidências biológicas, ecológicas (Hoare, 1972) e moleculares (Lima *et al*., 2013; Ramírez *et al*., 2014). Análises moleculares recentes (Hamilton *et al*. 2012), posicionaram o *T. cruzi* como sendo filogeneticamente próximo de *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*.

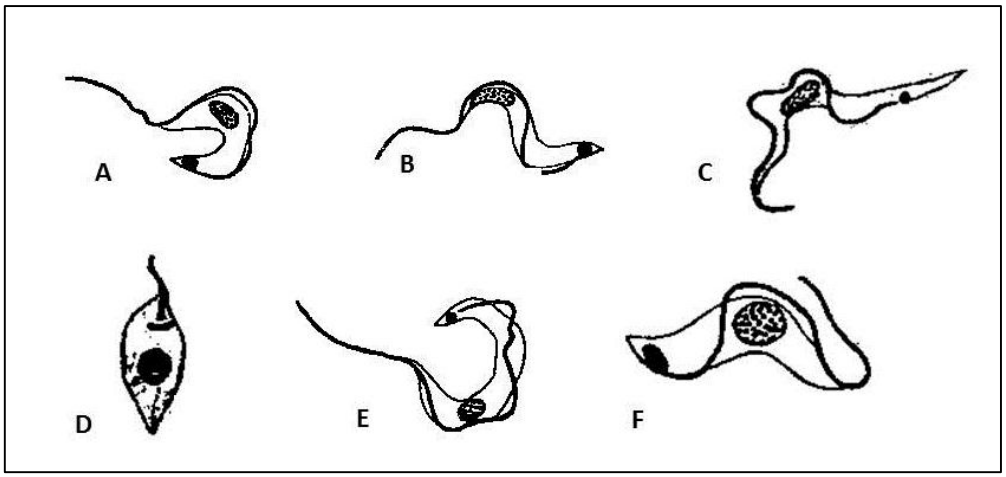


Figura 3. Formas celulares de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* (A, B) *T. vespertillionis*; (C,D) *T. pipistrelli*; (E,F) *T. phyllostomae* (Adaptado de Hoare, 1972).

No Brasil, mais de 10 espécies de tripanossomas foram registradas em cerca de 40 espécies de morcegos, em diferentes estados brasileiros como o Amazonas (Diane 1961), Pará e Mato Grosso (Lisboa *et al*., 2008; Marcili *et al*., 2013); Piauí, (Pinto & Bento, 1986), Ceará (Alencar *et al*., 1976), Santa Catarina (Steindel *et al*., 1998) e São Paulo (Barretto, 1968). Além disso, Marcili (2008) ao analisar a ocorrência de tripanossomas em amostras de sangue de 1043 morcegos de 63 espécies no Brasil mostrou uma prevalência de 12.9% de tripanossomatídeos similares a *T. cruzi*, os quais foram identificados como *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii*. Finalmente uma nova linhagem de *T. cruzi* (TcBat) foi identificada (Marcili, 2008; Lima *et al*., 2015).

Os ciclos biológicos dos tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* são praticamente idênticos, e o que os diferem são seus hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Por exemplo, *T. c. marinkellei* é transmitido por triatomíneos do gênero *Cavernicola*, enquanto *T. dionisii* é transmitido pelas fezes ou ingestão de percevejos do gênero *Cimex* (Molyneaux, 1991). *Trypanosoma phyllostomae* também é transmitido por meio das fezes de triatomíneos (Hoare, 1972).

Em relação ao *T. cruzi*, já foram identificadas populações bastante heterogêneas que diferem em diversas características morfológicas, biológicas e moleculares (Miles *et al*. 2009). Quanto aos isolados pertencentes às DTUs, já foram identificados morcegos infectados pelas linhagens TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcBat, além da presença de infecções mistas (Jansen *et al*., 2015). Em morcegos do Cerrado foram identificados isolados de TcI, TcII, TcI/TcII e *T. rangeli* (Lisboa *et al*. 2008; Jansen *et al*., 2015).

As espécies de tripanossomas do gênero *Herpetosoma* possuem tamanho intermediário com cinetoplasto subterminal não sendo patogênicas para seus hospedeiros mamíferos. Em morcegos, são encontradas as espécies *T. lewisi, T. lineatum* e *T. rangeli* (Fox & Thillet, 1962; Hoare, 1972; Maia da Silva *et al*., 2009). Análises filogenéticas baseadas em marcadores moleculares SSU rRNA e gGAPDH indicaram que *T. rangeli* é mais próximo filogeneticamente de *T. cruzi* que outros tripanossomas provenientes da África (Hamilton *et al*., 2012; Cottontail *et al*., 2014). A infecção por *T. rangeli* se dá a partir da inoculação de tripomastigotas metacíclicos presentes nas glândulas salivares e saliva dos triatomíneos durante a o repasto sanguíneo, principalmente os do gênero *Rhodnius*, contudo no ambiente silvestre também pode ocorrer a infecção a partir da ingestão dos triatomíneos pelos mamíferos hospedeiros (Cuba Cuba, 1998)

O subgênero *Megatrypanum* caracteriza-se pela grande diversidade de espécies de tripanossomas e de seus hospedeiros mamíferos e vetores (Hoare, 1972). As espécies desse subgênero são geralmente maiores e mais largas que as espécies dos subgêneros *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*, apresentam cinetoplasto próximo ao núcleo, não são patogênicas para seus hospedeiros e ainda não foram encontradas no homem (Hoare, 1972). Tripanossomas classificados neste subgênero têm sido descritos em morcegos de diferentes continentes. Contudo, as informações sobre esses tripanossomas se restringem ao encontro de grandes formas tripomastigotas no sangue do hospedeiro (Figura 4) (Lima, 2011). Nas Américas, foram descritas as seguintes espécies em morcegos: *T. pessoai* (*Carollia perspecillata* e *Desmodus rotundus*), *T. leonidasdeanei* (*Saccopterix bilineata*), *T. pifanoi* (*Artibeus lituratus* e *Phyllostomys hastatus*) e *T. megaderma-like* (*Myotis nigricans, Glossophaga soricina*) (Hoare, 1972). Recentemente, *T. theileri* foi registrado em morcegos na Colômbia (Ramírez et al. 2014). Pouco ainda se sabe sobre a forma de transmissão dos tripanossomas do subgênero *Megatrypanum*, porém trabalhos (Gardner & Molyneaux, 1998) sugerem que a transmissão pode ocorrer a partir da ingestão de fezes e predação de cimicídeos.

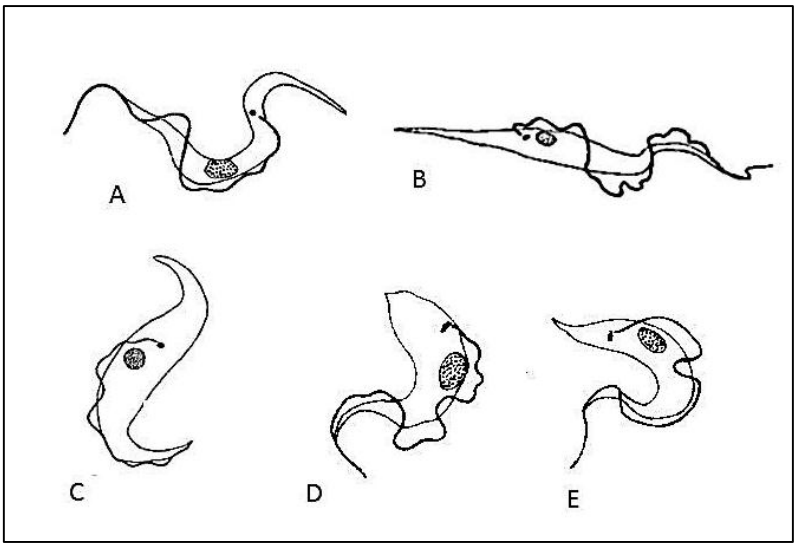


Figura 4. Algumas formas celulares de tripanossomas do gênero *Megatrypanum* presentes em morcegos da América do Sul. (A) *Trypanosoma megaderma;* (B) *Trypanosoma pifanoi*; (C) *Trypanosoma leonidasdeanei*; (D, E) *Trypanosoma pessoai*. (Hoare, 1972).

O subgênero *Trypanozoon* compreende espécies patogênicas para o homem (*T. brucei gambiese* e *T. b. rhodesiense*, na África) e para outros tipos de mamíferos (*T. b. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum*) (Hoare, 1972). No Brasil, *T. evansi* é muito comum no Pantanal e já foi identificado em morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros (Herrera *et al.*, 2004). Além disso, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* pode ser também transmissor de *T. evansi* durante o repasto sanguíneo (Hoare, 1972).

1.3.2. *Leishmania* spp.

Estudos pioneiros mostraram evidências da circulação de *Leishmania* entre morcegos (Rajedran *et al.,* 1985; Morsy *et al.,* 1987). Posteriormente, estudos em laboratório (Lampo *et al.,* 2000), demonstraram que flebotomíneos se alimentam do sangue de morcegos. Outros estudos (Tesh *et al.*, 1971; Lima *et al.*, 2008) detectaram a presença desses insetos em abrigos de morcegos, o que sugere também, a utilização do sangue dos morcegos como dieta.

Vários estudos têm registrado a ocorrência de espécies de *Leishmania* em morcegos neotropicais e do velho mundo (Tabela 1). Savani *et al*. (2010) verificaram a ocorrência de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em morcegos do estado de São Paulo. Em concordância, Shapiro *et al*. (2013) detectaram a presença de *L. braziliensis* em morcegos em áreas do Mato Grosso do Sul. Todavia, Rotereau *et al*. (2006) não detectaram infecção de morcegos por *Leishmania* em uma área da Guiana Francesa onde casos da doença foram

registrados, o que sugere que os morcegos não atuariam como reservatórios para *Leishmania* nessa área. Entretanto pouco ainda se sabe sobre a infecção e o papel dos morcegos como reservatórios para esses parasitos.

Tabela 1. Espécies de morcegos infectadas por espécies de *Leishmania* em relação ao hábito alimentar. (Revisado após Roque & Jansen, 2014; da Costa *et al*., 2015; Kassahun *et al*., 2015; Oliveira *et al.*, 2015 e Berzunza-Cruz *et al*., 2015).

Espécie de Morcego	Espécie de *Leishmania*	Hábito Alimentar	Referência
Carollia perspicillata	*L. infantum*	Frugívoro	De Lima *et al*, 2008
Molossus molossus	*L. infantum*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
	L. amazonensis		Savani *et al.*, 2010
	L. (Viannia) sp.		Shapiro *et al.*, 2013
Molossus rufus	*L. amazonensis*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
Glossophaga soricina	*L. infantum*	Nectarívoro	Savani *et al.*, 2010
	L. amazonensis		Savani *et al.*, 2010
	L. (Viannia) sp.		Shapiro *et al.*, 2013
	L. mexicana		Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Nyctinomops laticaudatus	*L. amazonensis*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
Eumops glaucinus	*L. amazonensis*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
Eumops auripendulus	*L. amazonensis*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
Artibeus liturarus	*L. amazonensis*	Frugívoro	Savani *et al.*, 2010
	L. mexicana		Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Sturnira lilium	*L. amazonensis*	Frugívoro	Savani *et al.*, 2010
	L. mexicana		Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Myotis nigricans	*L. amazonensis*	Insetívoro	Savani *et al.*, 2010
Desmodus rotundus	*L. mexicana*	Hematófago	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
	L. amazonensis		Oliveira *et a*l., 2015
	L. infantum		Oliveira *et a*l., 2015
Pteronotus personatus	*L. mexicana*	Insetívoro	Berzunza-Cruz *et al*., 2015
Pteronotus parnellii	*L. infantum*	Insetívoro	da Costa *et a*l., 2015
Artibeus jamaicensis	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015

Dermanura watsoni	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Carollia sowelli	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al*, 2015
Choeroniscus godmani	*L. mexicana*	Nectarívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2025
Glossophaga commissarisi	*L. mexicana*	Nectarívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Leptonycteris curasoae	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Phyllostomus discolor	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Sturnira ludovici	*L. mexicana*	Frugívoro	Berzunza-Cruz *et al.*, 2015
Cardioderma cor	*L. tropica*	Insetívoro	Kassahun *et al*. 2015
Nycteris hispida	*L. major*	Insetívoro	Kassahun *et a*l. 2015

1.3.3. The “Bat Seeding Hypothesis”.

Estudos buscam compreender o surgimento do *T. cruzi* nas Américas Central e do Sul (Hamilton *et al*., 2012, Lima *et al*., 2013). Evidências moleculares atuais de tripanossomatídeos na América do Sul levaram a formação da hipótese de “the bat seeding”. Segundo esta hipótese, o ancestral comum dos tripanossomas do clado de *T. cruzi* era um tripanossoma proveniente de morcego, o qual se diversificou e se dispersou geograficamente pelas Américas Centrais e do Sul. Em seguida, vários desses tripanossomas foram transmitidos dos morcegos para outros mamíferos, onde ocorreu a especialização do parasito para *T. cruzi*.

Acredita-se que a mudança dos tripanossomas dos morcegos para outros mamíferos de hábitos terrestres ocorreu pelo menos cinco vezes (Figura 5). Essa mudança de hospedeiros pode ter sido facilitada pela sobreposição de habitats dos morcegos com outros mamíferos e vetores invertebrados, onde esses vetores se alimentavam tanto dos morcegos quanto dos demais mamíferos (Hamilton *et al*., 2012). O estabelecimento do ciclo de transmissão envolvendo mamíferos de hábitos terrestres pode ter sido facilitado pelo processo de “adaptação ao hospedeiro”, onde parasitos tendem a se adaptar mais rapidamente aos novos hospedeiros em relação aos hospedeiros atuais (Hamilton *et al*., 2012).

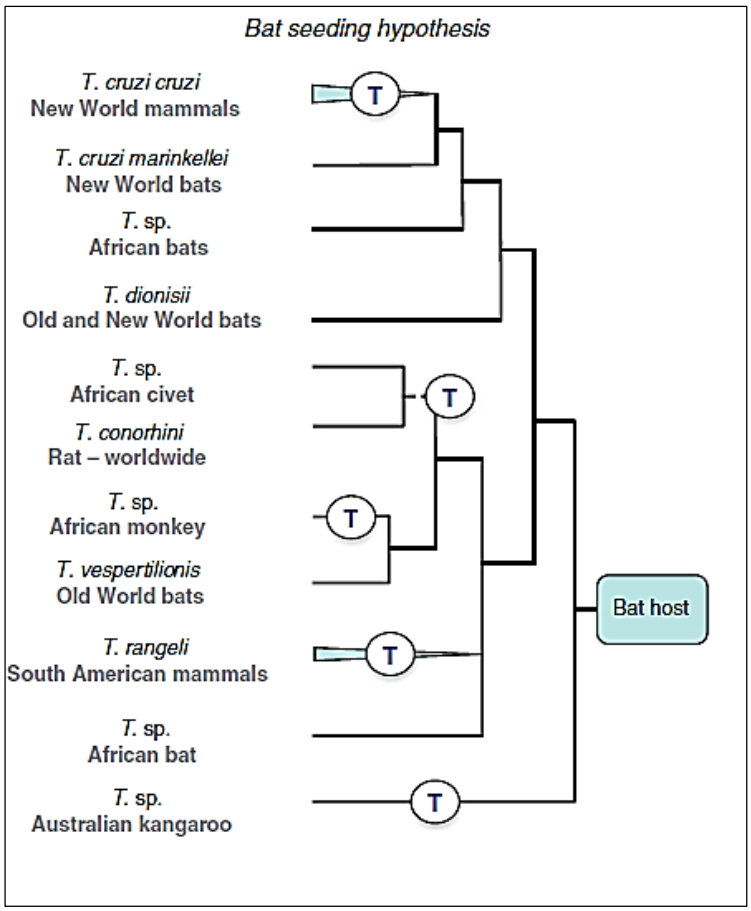


Figura 5. “The bat seeding hypothesis”. O *T. cruzi* teria se originado de um tripanossoma proveniente de um morcego. (T) representa a passagem do parasito dos morcegos para outros mamíferos (Hamilton *et al.*, 2012).

A descrição de um novo DTU de *T. cruzi* de morcegos denominado de TcBat e de *Trypanosoma livingstonei*, uma nova espécie descrita a partir de amostras de morcegos africanos e que está relacionada ao clado *T. cruzi* são dados que fortalecem essa hipótese (Hamilton *et al*. 2012; Marcili *et al*., 2009; Ramírez *et al*., 2014; Lima *et a*l., 2015). Curiosamente, TcBat está mais relacionado com TcI, cepa bastante encontrada em marsupiais da família Didelphidae. Além disso, a linhagem de *T. rangeli* TrE foi somente encontrada em morcegos e no triatomíneo *Rhodnius pictipes* na América Central e América do Sul (Marcili *et al*., 2009). Apesar de TcBat e TrE terem sido encontrados somente em morcegos e nos triatomíneos vetores em ambientes silvestres, acredita-se que não sejam exclusivos desses mamíferos. Já foram identificadas infecções, em condições laboratoriais, desses parasitos em camundongos (Marcili *et al*. 2009) e recentemente TcBat foi encontrado em seres humanos (Ramírez *et al*., 2014).

Esta hipótese levanta questões como a origem pré-humana do *T. cruzi*. Os humanos teriam sido expostos ao *T. cruzi* somente quando migraram ao Novo Mundo e tiveram contato com os insetos vetores do parasito.

1.4. Genes utilizados para estudos de taxonomia e filogenia em tripanossomatídeos.

A morfologia é considerada como o primeiro parâmetro para identificação dos tripanossomatídeos. Para espécies heteroxênicas (com hospedeiros definitivos e intermediários), além da morfologia são utilizados conhecimentos dos ciclos biológicos e patogenias (Hoare, 1972). Entretanto, a proximidade morfológica entre esses parasitos dificulta a taxonomia desses, sendo necessários outros métodos investigativos para identificação e diagnóstico.

O uso de sequências gênicas e marcadores moleculares têm sido de grande importância na identificação e reconstrução filogenética precisa desses parasitos. Atualmente, vários genes, sequências e marcadores têm sido utilizados para análises de polimorfismo genético e construção de árvores evolutivas. Alguns dos utilizados são: SSU rRNA, ITS1, gGAPDH, e TCZ. A escolha de determinado tipo de marcador depende do objetivo do estudo e do parasito a ser estudado.

Sequências do gene ribossômico têm sido utilizadas para inferir relações taxonômicas e filogenéticas entre tripanossomatídeos. Esses protozoários apresentam padrões complexos de moléculas de RNA ribossômico (rRNA). Os genes de rRNA consistem de unidades de repetição compostas por unidades de transcrição e são intercalados por um espaçador intergênico (IGS) que se repete em "tandem" várias vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição conhecida com pré-rRNA. Após várias etapas de processamento, o pré-rRNA dá origem a três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). As subunidades SSU e LSU são constituídas por sequências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS e ETS que são flanqueados pelo espaçador intergênico (IGS) que apresenta sequências altamente variáveis (Figura 6) (Sogin *et al*.,1986; Hernández *et al*., 1990; Lima, 2011). Esses genes ocorrem e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos, além de apresentarem diferentes graus de conservação, portanto, são muito utilizados para inferências de relacionamentos filogenéticos e identificação taxonômica em tripanossomatídeos.

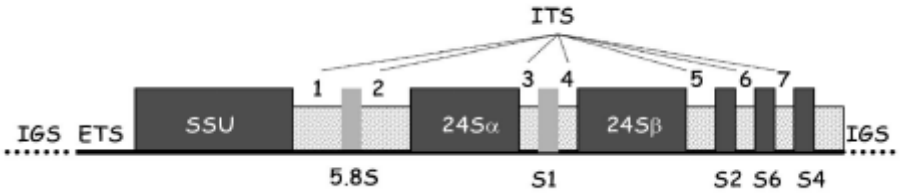


Figura 6. Representação esquemática de cistron ribossômico de rRNA precursores de tripanossomatídeos (Lima, 2011).

As sequências do gene SSU rRNA são as mais utilizadas devido a características importantes, tais como: (1) o pequeno tamanho que permite a fácil amplificação por PCR. (2) a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis. (3) a existência de dezenas de sequências de SSU rRNA de tripanossomatídeos depositadas no GenBank, permitindo comparações, análises filogenéticas e a identificação de novas espécies e linhagens (Lima, 2011).

Os genes mitocondriais dos tripanossomatídeos estão organizados nas moléculas de DNA circular denominadas de maxicírculos, que fazem parte da rede enovelada de DNA que constituem o kDNA (DNA do cinetoplasto) (Figura 7). A ausência de recombinação nesses genes faz com que esses sejam excelentes marcadores para identificação de parasitos e estudos populacionais. As taxas de divergência dos genes mitocondriais alteram bastante, em geral são maiores do que as dos genes nucleares de cópia única (Meyer, 1993). Sequencias de kDNA tem sido muito usadas para o diagnóstico molecular de *T. cruzi* e *T. rangeli* em diferentes amostras biológicas (Vallejo *et al*. 2002; Ramírez *et al*., 2015). Além disso, sequências de minicírculos já são conhecidas para a maioria das espécies de *Leishmania* (Arransay *et al*., 2000)

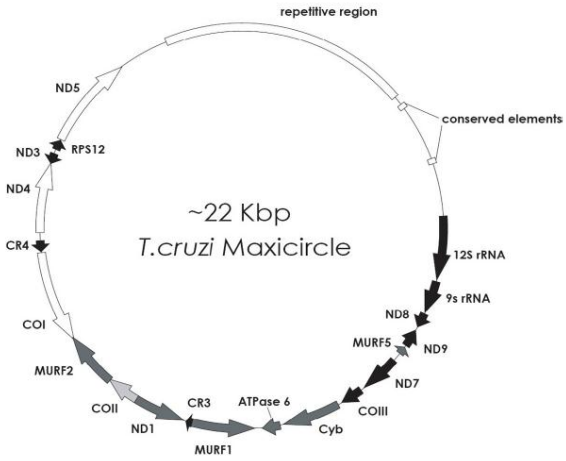


Figura 7. Exemplo de maxicírculo de kDNA de *T. cruzi* (Westenberger *et al*., 2006)

1.5 A PCR em tempo Real.

A PCR em tempo real (qPCR) é uma variação da técnica de PCR que permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa. Além disso, é altamente sensível, quando comparada com outras técnicas moleculares (Paiva-Cavalcanti *et al*., 2009).

As amostras são colocadas em uma placa e inseridas em um termociclador específico para a realização de qPCR. Em seguida, os resultados são analisados em um software e calculados em função do número de ciclos necessários para que fluorescência da reação seja detectada (fluorescência *versus* número de ciclos). Por último, é observada uma curva denominada de Multicomponente Plot que indica a quantidade de fluorescência emitida em cada ciclo da qPCR. A *multi* Plot é diferente para cada espécie.

A qPCR tem sido aplicada com sucesso no diagnóstico de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes com doença de Chagas (Ramírez *et a*l., 2015) e também na detecção de *Leishmania* em amostras humanas, caninas e de roedores silvestres (Colombo *et al*., 2015; Suárez *et al.*, 2015; Andrade et al., 2015).

1.6 A situação atual da leishmaniose e Doença de Chagas no Distrito Federal.

Trypanosoma cruzi tem sido detectado em triatomíneos no Distrito Federal (DF), principalmente em *Panstrongylus megistus* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Maeda *et al.* 2012). Já se sabe que há circulação de *T. cruzi* e *T. rangeli* em ambientes silvestres, infectando principalmente o marsupial da espécie *Didelphis albiventris* (Gurgel-Gonçalves *et al*. 2004). Recentemente, Minuzzi-Souza *et al.* (2016), mostraram a presença de primatas de cativeiro infectados por *T. cruzi* a partir de uma colônia de *P. megistus* instalada nos recintos

de primatas no Zoológico de Brasília. A presença de mamíferos hospedeiros para *T. cruzi* e de triatomíneos vetores infectados pelo tripanosoma, chama a atenção da saúde pública. A maior urbanização e consequente expansão do DF para áreas silvestres próximas pode favorecer o surgimento de casos de doença de Chagas em humanos. Dessa forma, é de fundamental importância que a vigilância epidemiológica da doença de Chagas no DF continue monitorando as populações desses insetos vetores, assim como informando aos moradores de regiões de risco sobre a importância no combate e identificação correta dos triatomíneos com intuito de evitar qualquer tipo de transmissão ao homem (Maeda *et al.*, 2012).

O rápido crescimento urbano do entorno do DF tem levado a população brasiliense invadir locais silvestres próximos ou fragmentos de cerrado. Com isso, houve um crescente aumento no número de casos humanos e caninos autóctones de leishmanioses endêmicas no DF (Porto, 2004; Brasil, 2007; Carranza-Tamayo *et al.,* 2010). O número crescente de surtos e epidemias pode estar relacionado com a introdução do ser humano em regiões onde existem naturalmente os vetores dessas doenças (Aguiar & Medeiros, 2003). Cardoso *et al*. (2015) detectaram a circulação de *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais em unidades de conservação do Distrito Federal. Do mesmo modo, foi também detectada *Leishmania infantum* em cães domésticos em regiões próximas as unidades de conservação. Tais dados sugerem que está ocorrendo a movimentação do parasito entre ambientes silvestres e domiciliares, o que pode gerar um sério problema de saúde pública.

1.7 Justificativa

Estudar a circulação dos tripanossomatídeos em ambientes silvestres é de fundamental importância para a caracterização dos ciclos enzoóticos e as formas de transmissão desses parasitos. Cada táxon de mamífero hospedeiro responde unicamente a infecções causadas por tripanossomatídeos. Estudos que visam investigar a diversidade de parasitos em animais silvestres não podem ser negligenciados atualmente, pois trazem informações como: surgimento do parasito em determinada região, análises filogenéticas do parasito, condições de manutenção do parasito em ambiente silvestre e o potencial de transmissibilidade para outros hospedeiros, além do auxilio na elaboração de estratégias de controle do parasito, caso esse apresente algum interesse médico.

Os morcegos são hospedeiros de várias espécies de parasitos. Conhecer a diversidade de tripanossomatídeos nesses mamíferos pode auxiliar em análises filogenéticas mais precisas e sustentar hipóteses sobre a origem do *T. cruzi* a partir de uma linhagem de tripanossomas proveniente de morcegos

(ver item 1.3.1). Após mais de 100 anos da descoberta de tripanossomatídeos similares a *T. cruzi* em morcegos, ainda existem muitas questões taxonômicas não resolvidas, pois as formas sanguíneas são morfologicamente semelhantes e pouco se sabe a respeito do desenvolvimento desses parasitos em morcegos e seus potenciais vetores. Além disso, o aparecimento de parasitos de importância médica como as *Leishmania* spp. e o *T. cruzi* fazem desses mamíferos um importante alvo de vigilância epidemiológica.

O Cerrado, em toda a sua complexidade de fitofisionomias, já contém relatos de uma fauna importante de insetos vetores como flebotomíneos e triatomíneos, além de evidências de circulação de *T. cruz* e *Leishmania* spp. em ciclos silvestres. Entretanto, não há dados referentes à infecção desses parasitos em morcegos em matas de galeria na região Centro-Oeste. Da mesma forma, existem poucas informações da ocorrência de outras espécies de tripanossomas dos subgêneros *Megatrypanum* e *Herpetosoma* no Cerrado.

O Distrito Federal tem passado por um amplo crescimento do entorno. A aproximação do ser humano com áreas remanescentes de Cerrado pode influenciar o surgimento de zoonoses. Um exemplo é o recente aparecimento de casos de leishmanioses em cães domésticos de Brasília. Pela sua alta capacidade de dispersão e adaptabilidade em ambientes domésticos, estudar a participação dos morcegos na manutenção dos ciclos de vida desses parasitos é de grande interesse. Estudos de morcegos como possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em diferentes áreas do DF são importantes para a elaboração de estratégias de vigilância sanitária e controle de zoonoses. Uma vez identificada a infecção, o papel desses mamíferos na manutenção do ciclo epidemiológico desses parasitos ficará mais claro.

1.8 Objetivos.

Objetivo Geral: Analisar a ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos do Distrito Federal.

Objetivos específicos.

(1) Verificar quais as espécies de tripanossomatídeos que estão infectando os morcegos no DF.

(2) Verificar se os morcegos do DF podem atuar como potenciais reservatórios para esses parasitos.

(3) Verificar em quais áreas amostradas no Distrito Federal os morcegos apresentam maior taxa de infecção por tripanossomatídeos.

(4) Analisar se há associação específica entre as espécies de tripanossomatídeos e as espécies de morcegos.

(5) Analisar se há associação entre a taxa de infecção por parasitos e o hábito alimentar dos morcegos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1 Áreas de Estudo.

As coletas dos quirópteros foram realizadas no Distrito Federal, no: Arboreto do Campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília, UnB (ARB), Fazenda Água Limpa da UnB (FAL), Jardim Botânico de Brasília (JBB), Reserva Biológica da Contagem (REBIO), gruta da Fazenda Sarah em Brazlândia (BRAZ) e Região Administrativa da Fercal (FERCAL) (Figura 8).

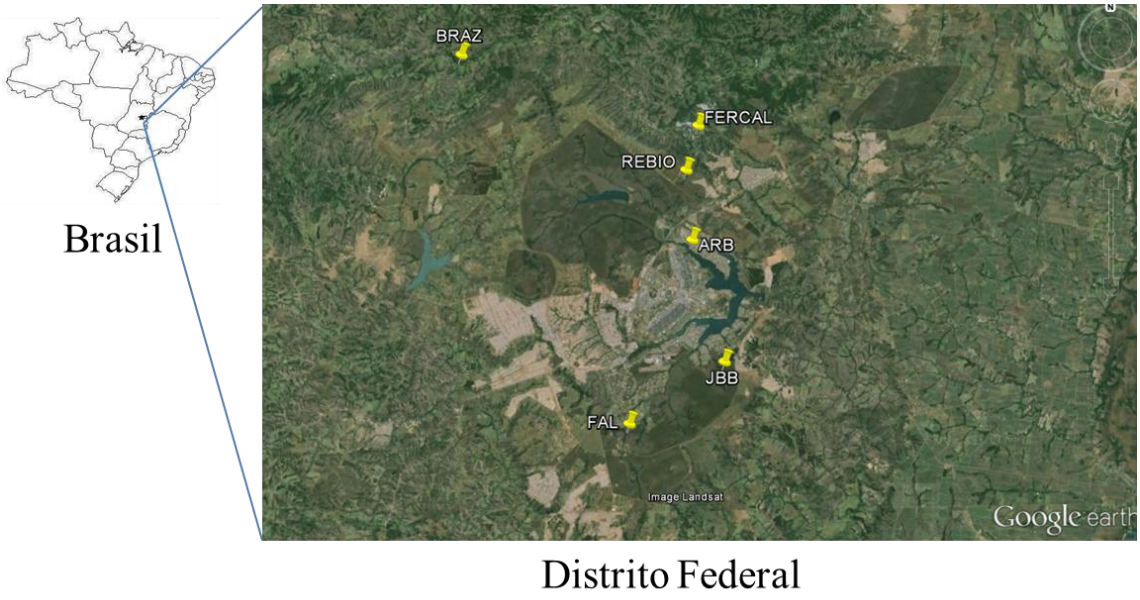


Figura 8. Locais de amostragem dos morcegos no Distrito Federal, Brasil. BRAZ (Fazenda Sarah, Brazlândia), FERCAL (Fercal, ao norte de Sobradinho), REBIO (Reserva Biológica da Contagem, Sobradinho), ARB (Arboreto da UnB, Asa Norte), JBB (Jardim Botânico de Brasília) e FAL (Fazenda Água Limpa da UnB, Park Way). (Fonte: Google Earth)

O Arboreto é uma área de proteção ambiental e de estudos da Universidade de Brasília. Está localizado no final da L2 Norte, em frente ao Parque Olhos D'água e próximo à CAESB. O Arboreto consiste em uma área de Cerrado degradada que hoje é utilizada como depósito de lixo por alguns cidadãos e também como abrigo para moradores de rua. Entretanto, o Arboreto apresenta grande abundância de plantas da família Piperaceae, que são utilizadas como fonte de alimento por alguns morcegos. As coletas no Arboreto foram realizadas nos meses de abril e junho em uma área localizada nas coordenadas geográficas do 15° 44' 15.29'' S, 047° 52' 42.14'' W.

A FAL está localizada no bairro Park Way, distante 28 km do Campus Universitário Darcy Ribeiro. A FAL faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA), Bacia do Gama, Cabeça de Veado e possui uma área de aproximadamente 4.340 hectares, dos quais 2.340 são destinados à preservação, 800 à conservação e 1.200 à produção. A FAL abriga diversos tipos de fitofisionomias do Cerrado, sendo as mais comuns: Matas de Galeria e Cerrado *sensu stricto*. Os morcegos foram coletados em abril em uma Mata de Galeria próxima à entrada da fazenda, localizada em 15° 57' 23.29'' S, 047° 57' 38.63'' W.

O JBB é uma área protegida, vinculada à Secretaria de Meio Ambiente do Distrito Federal - SEMA/DF, cujas atividades são a constituição e manutenção de coleções de plantas, desenvolvimento de pesquisa, educação ambiental e lazer orientado para a conservação da biodiversidade. A região do JBB é rica em fitofisionomias de Cerrado em excelente estado de conservação. As coletas na região do JBB foram realizadas em maio numa Mata de Galeria, situada em 15° 53' 03.93'' S, 047° 50' 26.32'' W.

A REBIO possui uma área aproximada de 3.460 hectares e está situada na Região Administrativa de Sobradinho. A REBIO apresenta como fitofisionomias: Matas de Galeria, Cerrado *sensu stricto*, e principalmente formações campestres como Campo Sujo e Campo Limpo. As coletas na REBIO foram realizadas em maio e junho em uma mata de galeria localizada em 15° 39' 12.08'' S, 047° 53' 04.20'' W.

A gruta da Fazenda Sarah em Brazlândia localiza-se em 15° 30' 30.21'' S, 048° 09' 56.12'' W. É uma gruta de aproximamente 432m² e nove metros de desnível (<http://www.sbe.com.br/>), circundada por uma mata de galeria. As redes de neblina foram postas na abertura da gruta. As coletas foram realizadas no mês de julho.

A FERCAL é uma Região Administrativa localizada ao norte de Sobradinho. A região da FERCAL é conhecida pelas suas trilhas ecológicas e formações rochosas. Os morcegos foram coletados em julho e em um fragmento rochoso localizado em 15°35'59.64''S, 47°52'6.85''W.

2.2 Amostragem e identificação dos morcegos.

Morcegos foram coletados entre janeiro e julho de 2015, em seis áreas do Distrito Federal. As redes de neblina mediam 5m de altura x 3m de largura, formando quatro bolsões pelo seu comprimento. As sete redes de neblina para captura dos morcegos eram abertas das 18h às 23h. As redes foram dispostas em forma sequencial, em bordas de mata e corredores de mata, locais de maior facilidade para a captura dos

morcegos. As redes eram vistoriadas a cada quinze minutos. Morcegos capturados foram retirados das redes para os procedimentos de identificação e coleta de material biológico (Figura 9).

Os morcegos foram identificados por meio de chaves de identificação taxonômica (Reis *et al*., 2013) e de comparação com exemplares da coleção de quirópteros do departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da UnB. Todos os procedimentos de coleta de material biológico foram realizados em campo. Após a realização de todos os procedimentos, os morcegos foram anilhados e soltos no local de captura.

Figura 9. Montagem das redes de neblina (A) e captura dos quirópteros (B)

2.3 Coleta de material biológico

Os morcegos capturados nas redes de neblina foram colocados em uma câmara contendo algodão embebido com anestésico inalatório Isoflurano (Abbott Laboratórios do Brasil, Ltda) por alguns segundos até a comprovação do efeito no animal. Após a anestesia, foi realizada a coleta do material biológico. Um pequeno corte de um fragmento de asa do plagiopatágio foi feito e colocado em um tubo de eppendorf (Figura 10, A). Em seguida, realizou-se a coleta das células da mucosa bucal com o auxílio de um swab molhado com água destilada (Figura 10, B). As amostras de swab e de fragmento da asa foram congeladas a -20ºC. Para a coleta de sangue, primeiramente limpava-se a área do antebraço com álcool etílico e em seguida inseria-se uma agulha fina de insulina em umas das veias do antebraço para a punção de sangue (Figura 10, C). Uma gota do sangue coletado era utilizada para a realização do esfregaço sanguíneo. Em seguida, o restante do sangue era inserido em tubo de hemocultura e colocado em papel de filtro (Figura 10, D).

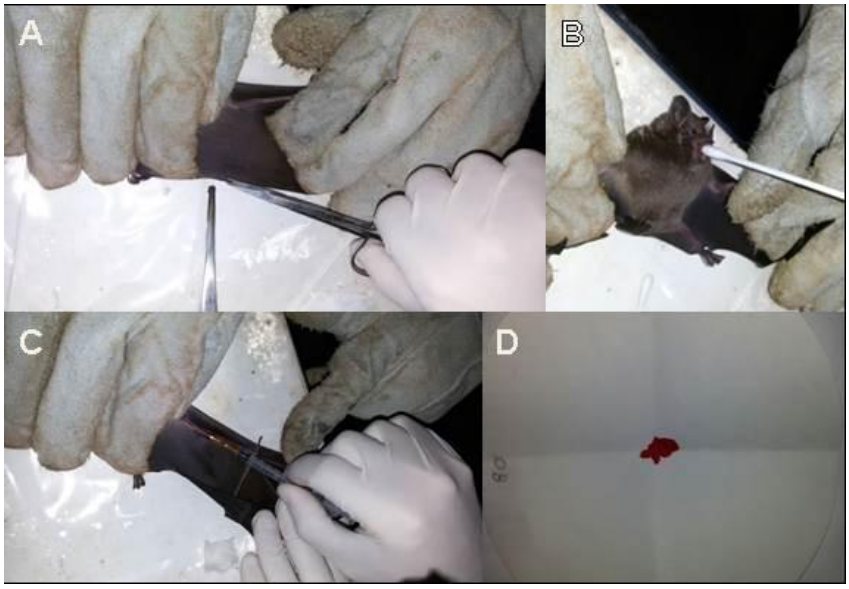


Figura 10. Coleta de sangue do antebraço (A). Realização do swab (B). Coleta de sangue do antebraço (C). Sangue no papel de filtro (D).

As hemoculturas foram mantidas em temperatura ambiente de 25ºC, em caso de positividade, eram feitos repliques de duas a três hemoculturas novas compostas por ágar-sangue e LIT (Liver Infusion Tryptose), tais meios foram escolhidos por serem altamente nutritivos para o crescimento de tripanossomatídeos. Os repliques eram feitos em câmara de fluxo laminar para evitar qualquer tipo de contaminação externa. Antibióticos (gentamicina) e antifúngicos foram adicionados para evitar contaminação. As culturas foram acompanhadas semanalmente por 180 dias. As amostras de culturas positivas foram utilizadas em esfregaços os quais foram fixados e corados com Giemsa para observação microscópica. As melhores lâminas foram selecionadas para registro fotográfico no Microscópio Olympus BX51 com luz UV e sistema de captação de imagem Olympus.

2.4 Análise parasitológica do material biológico.

Os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol, corados com Giemsa em laboratório e analisados no microscópio óptico no aumento de 1000x. As lâminas de esfregaço foram percorridas por completo em busca de formas tripomastigotas dos parasitos. Os meios de cultura foram analisados semanalmente sob o microscópio óptico invertido. Em caso de positividade da hemocultura, foram realizados repliques em hemoculturas novas, além da separação de parte do material obtido para extração de DNA e confecção de lâminas microscópicas para a análise morfológica do parasito (Figura 11 – Fluxograma).

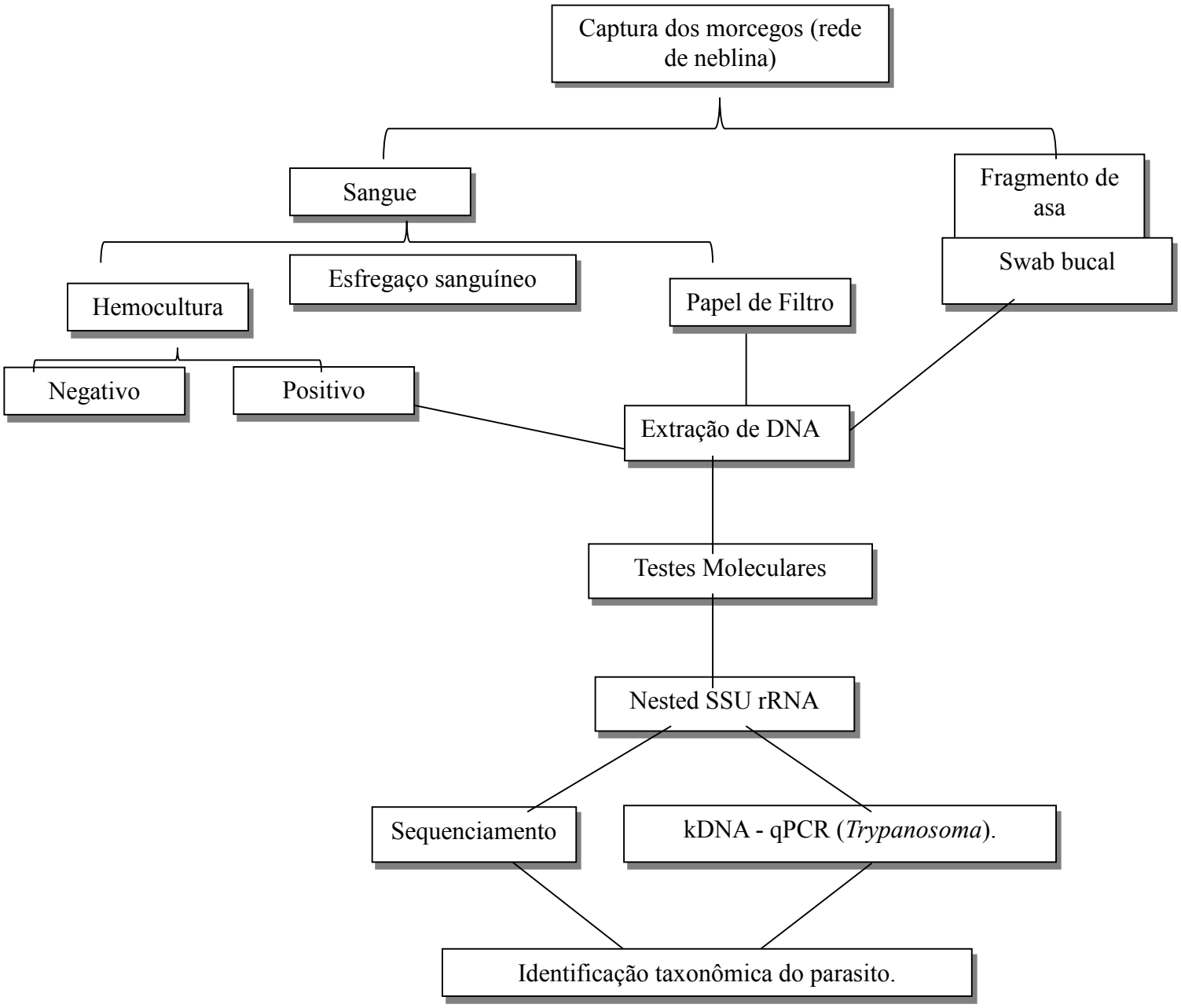


Figura 11. Fluxograma de processamento de amostras biológicas.

2.5 Análise molecular do material biológico.

Foi realizada a extração de DNA das amostras de swab, fragmento de asa, sangue no papel de filtro e hemoculturas positivas. A extração foi feita com o uso de kit de extrações de ácidos nucléicos conforme instruções dos fabricantes (BioPur e GE Healthcare Life Sciences). O DNA extraído foi congelado a -20ºC até a realização dos procedimentos de PCR.

Para a análise molecular foi realizada uma Nested PCR SSU rRNA. Primeiramente foi realizada uma amplificação de 520 bp com os primers S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC-3)' e S12 (5'-GGT TGA

TTC CGT CAA CGG AC-3') (Uliana *et al*., 1994). A reação da amplificação foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 2.5µl do tampão de reação da Invitrogen 10X (20mM Tris-HCL pH 8,4, 50mM KCl); 1.0µl $MgCl_2$, 0.2µl dNTP's (illustra™ GE), 0.75µl de cada *primer*, 0.3µl Taq Polimerase Platinum (Invitrogen, Life Technologies, Brazil), 14.5µl de H_20 Mili-Q e 5µl de DNA. Foram incluídos os controles negativos, positivos (*T. cruzi*, *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. infantum*) e branco (amostra sem DNA). As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler*™ e seguiram o seguinte programa: 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min, 72°C por 1min; e uma extensão final a 72°C por 7min. Os produtos amplificados dos controles positivos, negativos (*T. cruzi, T. rangeli* e *L. infantum*) e branco (sem amostra de DNA) foram separados por eletroforese em gel de agarose1% corado com brometo de etídeo para verificar a amplificação dos controles e se não houve nenhum tipo de contaminação.

Em seguida, 3µl do produto adquirido foi reamplificado em um seguimento de 480 bp com os primers S17 (5´-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3´) e S18 (5´-TCG GGC GGA TAA AAC CC-3´) (Uliana *et al.*, 1991). As mesmas condições das reações e ciclo foram mantidos na Nested PCR. Foram utilizados os mesmos controles negativos e controles positivos. Por último, os produtos de amplificação foram analisados mediante eletroforese em um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Para a identificação do DNA de *T. cruzi* e *T. rangeli*, foi realizada uma PCR em tempo real (qPCR) direcionada aos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) utilizando *primers* S36 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G3') e S67 (5'GAA CCC CCC TCC CAA AAC C3') (Sturm *et al*., 1989) que amplificam regiões do kDNA de *T. cruzi* e *T. rangeli* e geram um produto de PCR com até de 280pb. Como molde para a qPCR foi usado 2µL de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 10µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp^R), em duplicata no termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação: 50ºC durante 2 minutos, 95ºC durante 10 minutos e 40 ciclos a 95ºC durante 15 segundos, 57ºC durante 1 min e 72 ° C durante 10 segundos. Foram incluídos controles negativos, positivos (*T. cruzi* e *T. rangeli*) e branco (sem DNA).

Os resultados foram analisados com o StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems) e foram calculados em função do número de ciclos necessários para que fluorescência da reação fosse detectada (fluorescência *versus* número de ciclos). Esse ponto é conhecido como *quantification cycle* (Cq). Em seguida, para confirmar a positividade para *T. rangeli* e *T. cruzi* foi observado o Multicomponente Plot (*Multicomponent Plot*) que observa quantidade de fluorescência emitida em cada ciclo da qPCR.

Também, foi realizada uma curva padrão para quantificação absoluta das amostras. A curva foi baseada em valores de Cq de diferentes concentrações de DNA de amostras positivas de *T. cruzi* e de *T. rangeli*, sendo que o eixo x corresponde ao log da concentração de DNA e o eixo y aos valores de Cq. Para tanto, foi realizada uma diluição seriada (1:5) de DNA do parasito em água Mili-Q.

As amostras que não foram positivas nas PCRs de kDNA passaram por um processo de seleção e foram preparadas para sequenciamento e identificação dos parasitos. Para seleção das amostras, deu-se preferência para as amostras de hemocultura, seguida por papel de filtro, swab e asa. Ou seja, caso um morcego tenha sido positivo para os quatro tipos de amostras, optou-se por sequenciar a hemocultura. Caso tenha sido positivo para o papel de filtro, swab e asa, optou-se por sequenciar o papel de filtro. O mesmo critério de escolha foi feito para swab e asa. Em caso de positividade em somente um tipo de amostra, essa foi selecionada para sequenciamento. A preferência pelo papel de filtro foi devido a maior circulação de tripanossomatídeos na corrente sanguínea. Além disso, evitou-se encaminhar vários indivíduos da mesma espécie de uma mesma área. Houve preferência para a seleção de indivíduos de espécies diferentes e de todas as áreas estudadas. Amostras representativas de todas as espécies de morcegos coletadas foram encaminhadas para o sequenciamento.

Em sequencia, as amostras positivas na PCR SSUrRNA foram purificadas conforme as orientações do kit de purificação dos fabricantes da GE Healthcare Life Sciences. Após a purificação, as amostras foram quantificadas, esperando-se uma concentração mínima de 30ng/µL. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP) para identificação dos tripanossomatídeos. As sequências obtidas foram editadas usando o software *Bioedit* e comparadas com o banco de dados depositado no GenBank, usando o algoritmo BLASTn/NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). As sequência editadas tiveram o comprimento aproximado de 380pb.

Por último, as sequências adquiridas foram comparadas com o banco de dados do GenBank e os parasitos puderam ser identificados considerando 99%-100% de identidade com as sequências depositadas o GenBank.

2.6. Autorização e aspectos éticos da pesquisa.

Para evitar qualquer tipo de acidente e exposição aos patógenos do meio silvestre, seja por contato direto (arranhaduras e mordidas) ou indireto (urina, fezes, sangue e saliva) toda a equipe de pesquisa passou inicialmente por um processo de imunização contra raiva e utilizou equipamentos de segurança (luvas e máscaras) durante os procedimentos de manuseio dos animais. Além da higienização de todo o equipamento após a realização dos procedimentos de coleta de material biológico.

Todos os animais utilizados foram contidos em sacos de algodão e anestesiados com o intuito de diminuir o estresse e a dor desses. Após a realização dos procedimentos, os morcegos foram soltos e reintegrados no ambiente natural. O estudo em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnBDOC nº21793/2014) (Anexo 1).

As capturas dos morcegos nas regiões elucidadas acima foram realizadas mediante autorização para atividades de finalidade científica, nº 36808-6, emitida pelo órgão responsável, Instituto Chico Medes de Biodiversidade (ICMBio) e também de autorizações próprias das Unidades de Conservação (Anexos 2 a 4).

2.7 Análise estatística.

A frequência de morcegos positivos e negativos para tripanossomatídeos foi comparada por área, sexo, categorias de massa corporal, hábitos alimentares e espécie usando o teste exato de Fisher, considerando um nível de significância de 5%. ($\alpha = 0.05$)

3. RESULTADOS.

3.1 Amostragem.

Com um esforço de captura de 119 redes-noite, foram capturados 146 morcegos de duas famílias e 14 espécies (Tabela 2, Figuras 12 e 13). 72 (49%) dos indivíduos coletados foram fêmeas e 74 (51%) eram machos. As espécies mais frequentes foram *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium* nas áreas da Fazenda Água Limpa (FAL) e Jardim Botânico de Brasília (JBB), respectivamente. As espécies *Chiroderma doriae, Chiroderma villosum, Lasiurus blossevillii*, *Myotis nigricans* e *Myotis riparius* foram capturadas em menor proporção, ambas na Reserva Biológica da Contagem (REBIO).

Tabela 2. Relação de famílias, subfamílias e espécies encontradas em seis áreas de estudo no Distrito Federal entre janeiro e julho de 2015. Proporção de machos e fêmeas encontrada e frequência (Fr.) das espécies encontradas.

Família	Subfamília	Espécie	Arboreto	BRAZ	FAL	FERCAL	JBB	REBIO	Fêmeas	Machos	Total	Fr. (%)
Phyllostomidae	Carolliinae	*Carollia perspicillata*	1	0	25	2	10	3	17	24	41	28
	Desmodontinae	*Desmodus rotundus*	0	6	0	0	0	0	2	4	6	4
		Diphylla ecaudata	0	18	0	0	0	0	16	2	18	12
	Glossophaginae	*Glossophaga soricina*	1	3	0	0	2	0	4	2	6	4
	Stenodermatinae	*Artibeus lituratus*	10	0	3	0	3	3	8	11	19	13
		Artibeus planirostris	11	0	0	0	0	0	5	6	11	8
		Chiroderma doriae	0	0	0	0	2	1	1	2	3	2
		Chiroderma villosum	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
		Platyrrhinus lineatus	0	0	0	0	0	10	4	6	10	7
		Sturnira lilium	0	0	4	0	13	5	14	8	22	15
	Phyllostominae	*Phyllostomus hastatus*	0	5	0	0	0	0	0	5	5	3
Vespertilionidae	-	*Lasiurus blossevillii*	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	-	*Myotis nigricans*	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	-	*Myotis riparius*	0	0	0	0	0	2	1	1	2	1
Total			23	32	32	2	30	27	72	74	146	100
Nº redes/noite			28	14	14	7	21	35				
Nº morcegos/rede/noite			0,82	2,29	2,28	0,28	1,42	0,77				

Figura 12: Espécies de morcegos da família Phyllostomidae capturadas: (A) *Carollia perspicillata*, (B) *Desmodus rotundus,* (C) *Diphylla ecaudata*, (D) *Glossophaga soricina*, (E) *Artibeus lituratus*, (F) *Artibeus planirostris*, (G) *Chiroderma doriae*, (H) *Chiroderma villosum*, (I) *Sturnira lilium*, (J) *Platyrrhinus lineatus*, (K) *Phyllostomus hastatus*. (Fontes A, C, D, F, H: Novaes, R.L.M. < http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>) (Fonte G: Cláudio, V.C.< http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>) (Fonte I: Arboleda, D.T. <http://www.inaturalist.org>).

Figura 13. Espécies de morcegos da família Vespertillionidae capturadas: (A) *Lasiurus blossevillii*, (B) *Myotis riparius*, (C) *Myotis nigricans*. (Fonte: Novaes, R.L.M. < http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br>)

3.2. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos nas áreas.

Foi encontrado um total de 111 morcegos positivos, resultando em uma taxa de infecção de aproximadamente 76%. A maioria das infecções dos morcegos por tripanossomatídeos foi detectada a partir dos testes moleculares, principalmente pela PCR SSUrRNA (Figura 14). As maiores taxas de infecção dos morcegos por tripanossomatídeos foram observadas na Fercal (100%), JBB/REBIO (93%) e Brazlândia (79%), sendo que a FAL foi a área com menor taxa de infecção (44%). Uma maior quantidade de morcegos positivos para tripanossomatídeos foi encontrada no JBB, seguido da REBIO e Brazlândia (Figura 15).

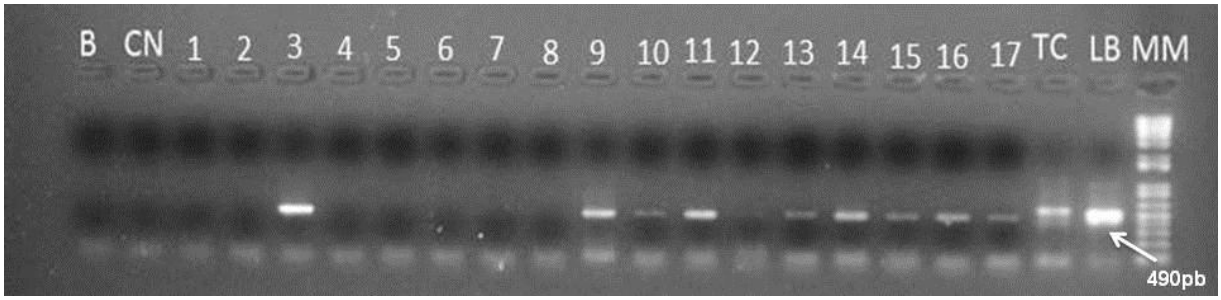


Figura 14. Gel de agarose a 1% mostrando resultado da PCR direcionada ao gene SSU rRNA, para tripanossomatídeos de amostras de morcegos (1 a 17). MM: marcador de peso molecular; Controles positivos: TC (*Trypanosoma cruzi*) – LB (*Leishmania braziliensis*) - Controle negativo: CN. - B: Branco.

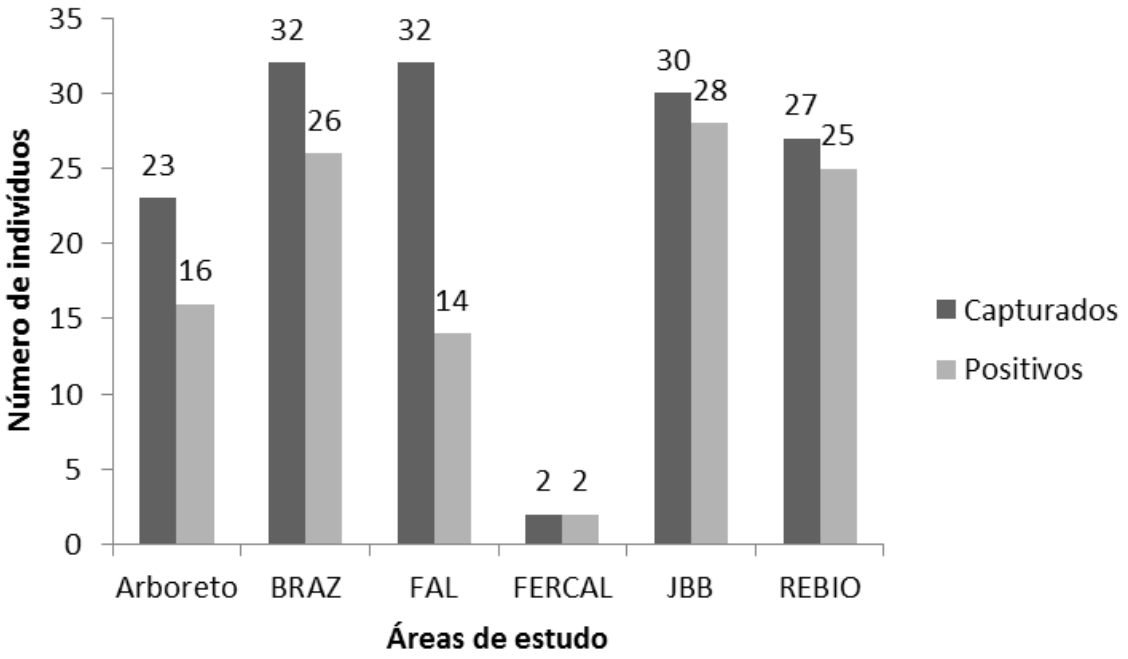


Figura 15. Número de morcegos capturados e positivos para tripanossomatídeos nas áreas de estudo no Distrito Federal entre janeiro e julho de 2015.

Ao comparar a proporção de morcegos infectados por área, com exceção da Fercal onde foram capturados somente dois indivíduos, foram encontradas diferenças significativas entre a FAL e as demais áreas ($p<0,01$).

3.3. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos entre sexos, categorias de massa corporal e entre espécies.

Dos morcegos infectados, 57 foram fêmeas (51%) e 54 foram machos (49% de infecção). As fêmeas apresentaram uma infecção relativa maior (79%) em relação aos machos (73%) (Figura 16), porém essa diferença não foi significativa ($p=0,44$).

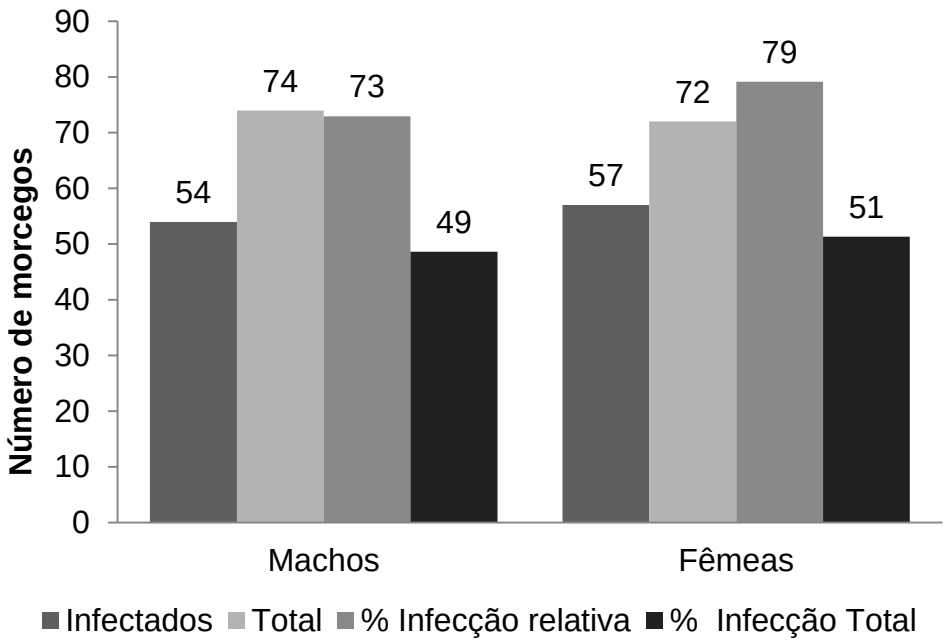


Figura 16. Relação entre machos e fêmeas infectados, número total de machos e fêmeas, infecção relativa e total desses.

A categoria de massa corporal mais frequente e em que a maioria dos morcegos estava infectada por tripanossomatídeos foi a de 21-40g, porém na categoria de 41-60 gramas, 92% dos morcegos estavam positivos (Figura 17). Também não foram observadas diferenças significativas comparando as taxas de infecção de cada categoria de massa corporal ($p>0,07$).

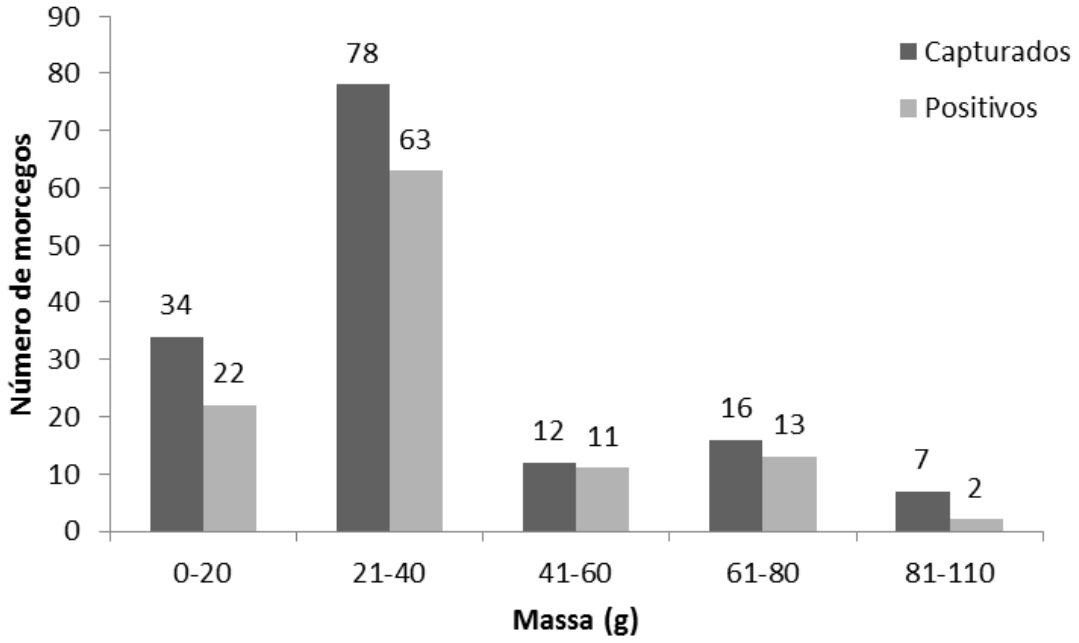


Figura 17. Número de morcegos capturados e positivos para tripanossomatídeos de acordo com as categorias de massa corporal.

As espécies com maior percentual de infecção foram: *Chiroderma viillosum*, *Desmodus rotundus*, *Lasiurus blossevillii. Myotis nigricans* e *Myotis riparius* com 100% de positividade para tripanossomatídeos. As espécies com menor taxa de infecção foram: *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus hastatus* (Tabela 3). Considerando somente as seis espécies com mais de dez indivíduos capturados, não foram observadas diferenças significativas ao comparar as proporções de morcegos infectados por tripanossomatídeos entre as espécies ($p>0,15$).

Tabela 3. Espécies de morcegos encontradas, total de indivíduos capturados por espécies, total de indivíduos positivos para tripanossomatídeos e frequência relativa de infecção para cada espécie.

Espécie	Positividade	Total	Fr (%)
Artibeus lituratus	15	19	78,9
Artibeus planirostris	8	11	72,7
Carollia perspicillata	26	41	63,4
Chiroderma doriae	3	3	100
Chiroderma villosum	1	1	100
Desmodus rotundus	6	6	100
Diphylla ecaudata	14	18	77,8
Glossophaga soricina	4	6	66,7
Lasiurus blossevillii	1	1	100
Myotis nigricans	1	1	100
Myotis riparius	2	2	100
Phyllostomus hastatus	3	5	60
Platyrrhinus lineatus	9	10	90
Sturnira lilium	18	22	81,8

3.4. Infecção dos morcegos por tripanossomatídeos de acordo com o hábito alimentar.

A maior taxa de infecção ocorreu em morcegos insetívoros, com 100% dos indivíduos positivos para tripanossomatídeos. A menor taxa de infecção encontrada foi a dos morcegos nectarívoros, com 67% dos morcegos positivos (Figura 18). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ao comparar as proporções de morcegos infectados por tripanossomatídeos entre os diferentes hábitos alimentares ($p>0,43$).

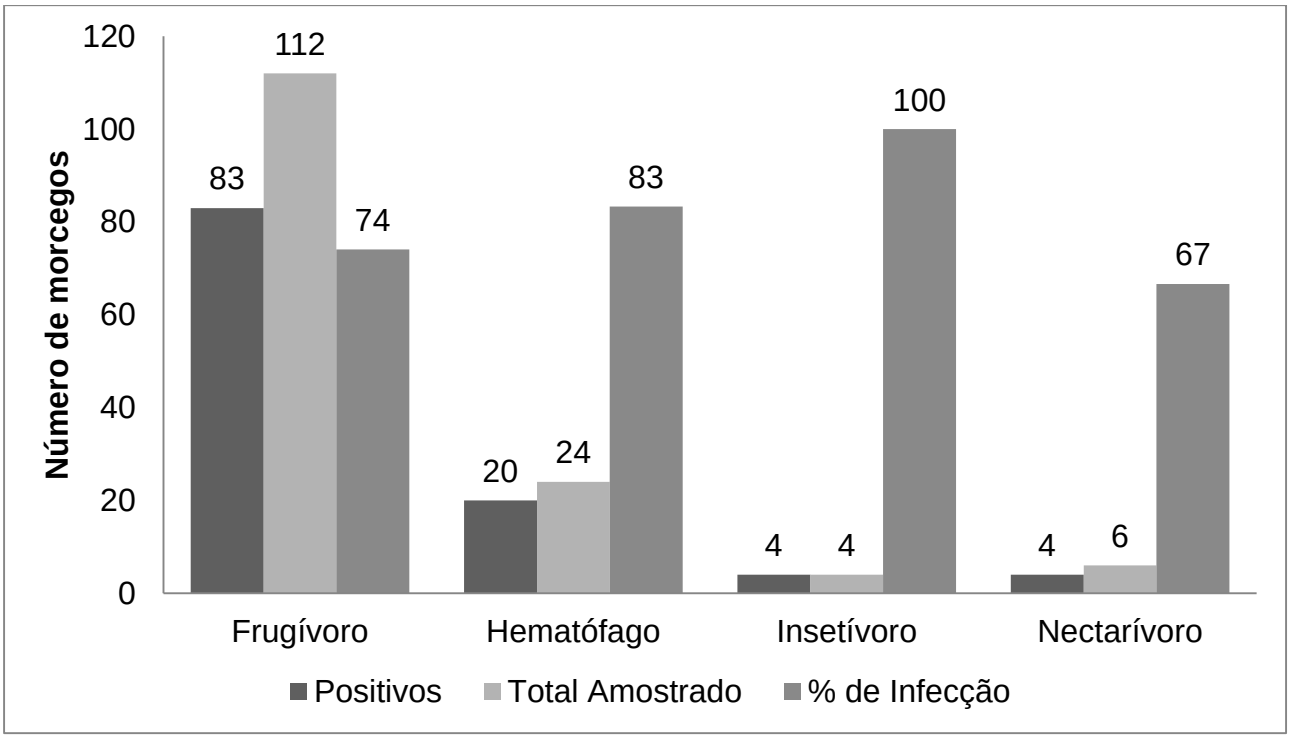


Figura 18. Número de morcegos positivos para tripanossomatídeos via PCR SSUrRNA, número de indivíduos no total por hábito alimentar e percentual de infecção (%) de acordo com o hábito alimentar.

3.5. Esfregaços sanguíneos e hemoculturas

Nenhum tripanossomatídeo foi encontrado nas lâminas de esfregaço sanguíneo. Das 138 hemoculturas obtidas, nove (5.8%) foram positivas: cinco hemoculturas provenientes de *Carollia perspicillata* capturados na FAL, duas hemoculturas de *Diphylla ecaudata* capturadas em Brazlândia, uma hemocultura de *Phyllostomus hastatus* proveniente de Brazlândia e uma hemocultura de *Artibeus planirostris* do Arboreto.

A análise morfológica dos parasitos dessas hemoculturas evidenciou formas promastigotas, epimastigotas e esferomastigotas, além de formas de vida realizando divisão celular (Figura 19). As lâminas coradas a partir de amostras das hemoculturas provindas de *D. ecaudata* de Brazlândia evidenciaram formas epimastigotas e tripomastigotas (Figura 20). As sequências obtidas das amostras dessas culturas foram identificadas como *Trypanosoma dionisii*. A hemocultura de *A. planirostris* evidenciou formas flagelares similares a *T. rangeli*, que foi detectado na qPCR de amostra de sangue do morcego (ver item 3.7.1).

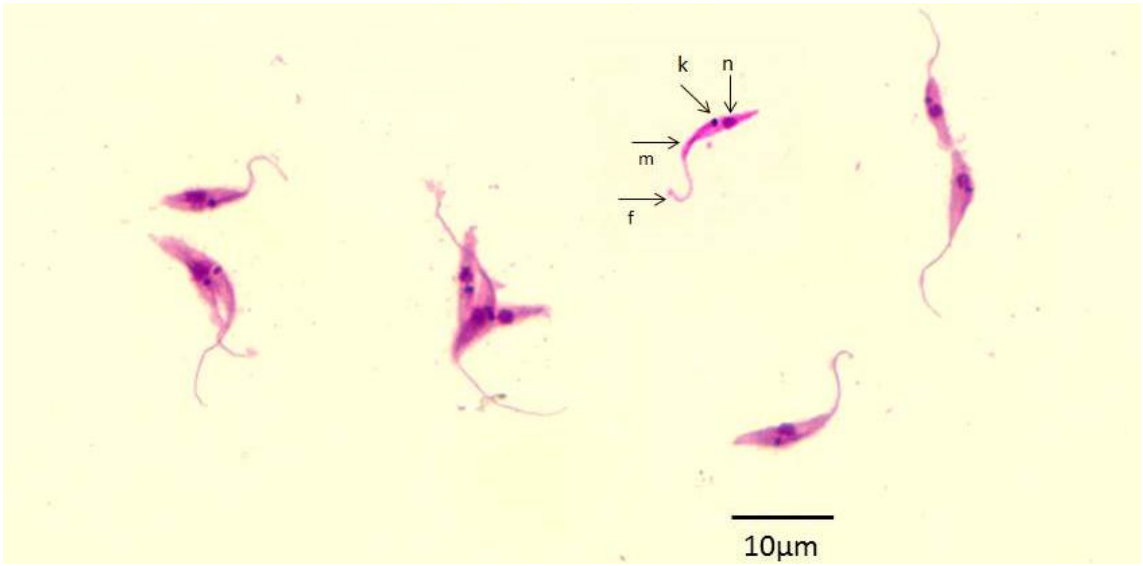


Figura 19. Formas epimastigotas de tripanossomatídeos encontrados nas hemoculturas de *Carollia perspicillata*. As setas indicam as estruturas observadas: (n) núcleo, (k) cinetoplasto, (m) membrana ondulante, (f) flagelo. Barra de escala: 10 micrômetros. As sequências obtidas das amostras dessas culturas foram identificadas como *Trypanosoma dionisii*.

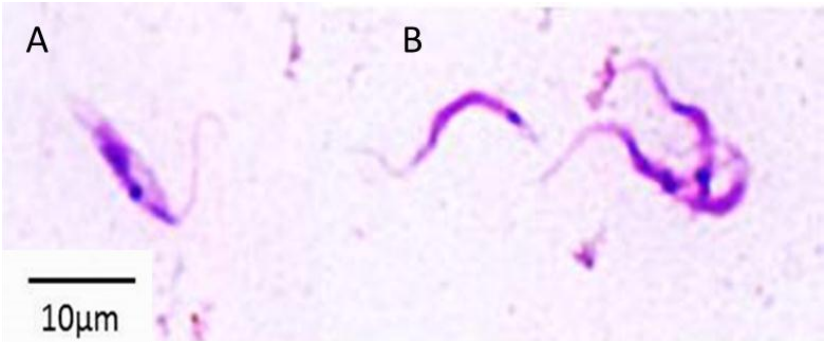


Figura 20. Formas celulares de tripanossomatídeos encontrados nas hemoculturas de *Diphylla ecaudata.* (A). Epimastigota (B). Tripomastigota. As sequências obtidas das amostras dessas culturas foram identificadas como *Trypanosoma dionisii*.

3.6. Detecção molecular de tripanossomatídeos em diferentes amostras biológicas de morcegos.

A maioria dos morcegos positivos para tripanossomatídeos foi detectada a partir de amostras de sangue em papel de filtro (71%). Amostras positivas de swab bucal (52%) foram mais frequentes que as de fragmento de asa (36%) (Tabela 4). Diferenças significativas foram detectadas comparando a proporção de

amostras positivas para tripanossomatídeos (papel de filtro x fragmento da asa: p<0,01; papel de filtro x swab bucal: p<0,01; swab bucal x fragmento da asa: p=0,03).

Somente 9% dos morcegos foram positivos para as três amostras biológicas coletadas. Além disso, 31 (21%) morcegos positivos foram detectados somente a partir de amostras de swab e fragmento de asa. A análise das amostras de swab revelou 25 indivíduos positivos que não foram detectados em amostras de papel de filtro, além de 38 indivíduos não identificados pelas amostras de asa. Por outro lado, seis amostras de fragmento de asa foram positivas em indivíduos não detectados pelo swab ou papel de filtro.

Tabela 4. Espécies e número de morcegos positivos nas amostras de sangue, asa e swab na PCR SSU rRNA.

	SSU rRNA		
Espécie	Sangue em papel de filtro	Fragmento de Asa	Swab bucal
Artibeus lituratus	12	2	7
Artibeus planirostris	8	3	2
Carollia perspicillata	15	13	8
Chiroderma doriae	2	1	2
Chiroderma villosum	1	0	1
Desmodus rotundus	6	0	3
Diphylla ecaudata	9	3	12
Glossophaga soricina	2	1	4
Lasiurus blossevillii	1	0	1
Myotis nigricans	0	0	1
Myotis riparius	1	1	1
Phyllostomus hastatus	1	0	2
Platyrrhinus lineatus	9	6	2
Sturnira lilium	12	10	12
Total	79	40	58

3.7. Identificação molecular das espécies de tripanossomatídeos nas amostras

3.7.1 qPCR – kDNA

Das 86 amostras (75 de papel de filtro e 11 de swab) analisadas na qPCR kDNA, uma amostra foi positiva para *T. cruzi* em *C. perspicillata* (taxa de infecção, TI = 2,4%) proveniente da FAL e seis amostras foram positivas para *T. rangeli* (Figuras 21 e 22). Os morcegos infectados por *T. rangeli* foram: *A. planirostris* (TI = 9,1%) no Arboreto, *C. perspicillata* (TI = 2,4%) na FAL, *D. rotundus* (TI = 16,6%) e *Diphylla ecaudata* (TI

= 11,1%) em Brazlândia e *Plathyrrhinus lineatus* (TI = 10,0%) na Rebio. Ressalta-se que o indivíduo *C. perspicillata* infectado por *T. cruzi* na FAL também apresentou infecção por *T. dionisii*, detectada na hemocultura e sequenciamento por SSU rRNA (ver item 3.7.2), o que demonstra que há coinfecção nos morcegos.

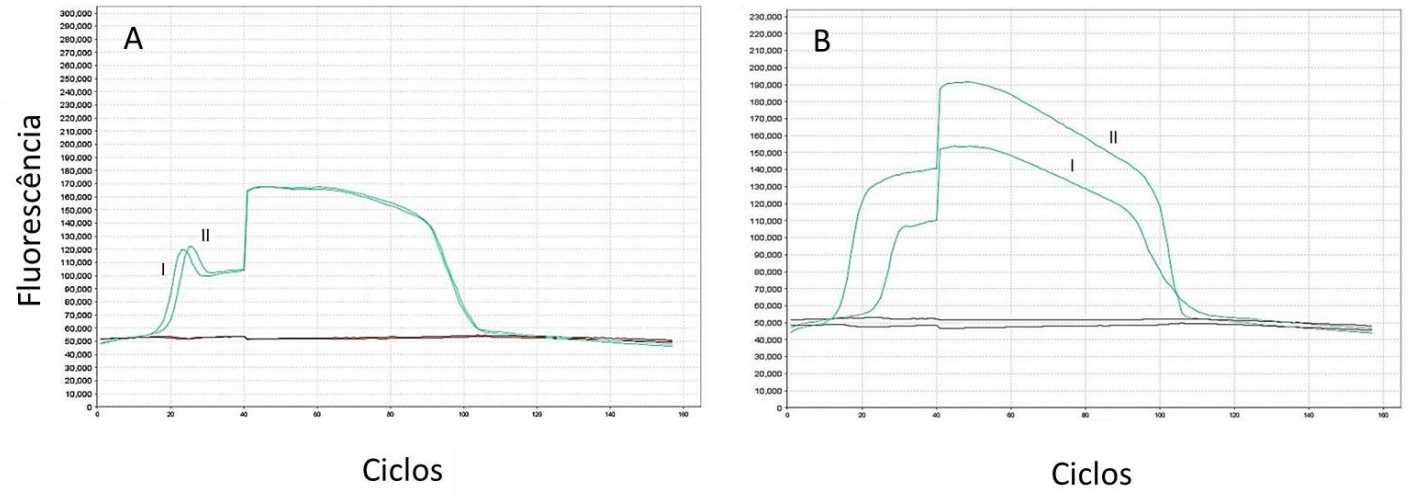


Figura 21. qPCR utilizando alvo kDNA que amplifica regiões do minicírculo de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli.* A *Melt curve* permite verificar a temperatura de dissociação de bases e cada espécie tem uma temperatura diferente. (A) *Melt curve* do controle positivo para *T. cruzi* (I) e amostra positiva para *T. cruzi* (II) do morcego *C. perspicillata* da área da FAL. (B). *Melt curve* do controle positivo para *T. rangeli*. (I) Amostra positiva para *T. rangeli* do morcego *A. planirostris* da área do Arboreto (II)

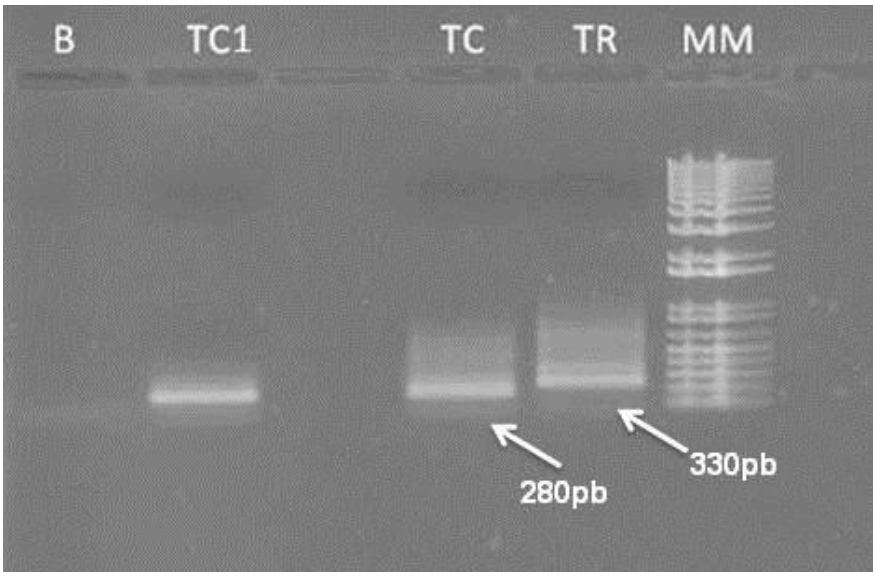


Figura 22. Gel de agarose a 1% da qPCR – kDNA realizada. São apresentadas as diferenças de alturas e pares de bases encontradas em TC (*T. cruzi*) e TR (*T. rangeli*) (amostras). B (Branco) – MM (Marcador molecular). – TC1 (Controle positivo para *T. cruzi).*

3.7.2. Sequenciamento dos amplicons SSU rRNA

Das 62 amostras sequenciadas, 31 foram descartadas pela má qualidade das sequências. O sequenciamento dos amplicons SSU rRNA (480 bp) revelou que a maioria das amostras positivas para tripanossomatídeos era do gênero *Leishmania*, o qual foi detectado em todos os locais de estudo (Tabela 5). Não foi possível realizar a identificação das espécies de *Leishmania* pois as sequências foram obtidas de uma região altamente conservada para o gênero *Leishmania*.

A FAL foi o local de coleta com o maior número de espécies de tripanossomatídeos registradas (*T. cruzi, T. rangeli, T. dionisii, T. lewisi e Leishmania* spp.). Pelo menos cinco espécies de tripanossomatídeos foram detectadas em *C. perspicillata* enquanto que outras espécies (p. ex: *A. lituratus* e *S. lillium*) apresentaram infecção somente *Leishmania* spp. As taxas de infecção das espécies de morcegos por *Leishmania* variaram de 3,3 a 20%. Dos 30 morcegos positivos para *Leishmania* spp. a espécie que apresentou o maior percentual de infecção foi *C. perspicillata* (20%), seguida por *A. lituratus* (16.7%). Entretanto, não foi detectada diferença significativa de infecção nas espécies de morcegos (Tabela 5).

Tabela 5. Número de indivíduos infectados e percentuais de infecção por *Leishmania* spp. encontrados para as espécies de morcegos em relação às áreas de estudo.

Espécie	Arboreto	Brazlândia	FAL	Fercal	JBB	REBIO	Total	% Infec.
Artibeus lituratus	2	0	2	0	1	0	5	16,7
Artibeus planirostris	1	0	0	0	0	0	1	3,3
Carollia perspicillata	0	1	0	1	3	1	6	20,0
Chiroderma doriae	0	0	0	0	0	1	1	3,3
Chiroderma villosum	0	0	0	0	0	1	1	3,3
Desmodus rotundus	0	3	0	0	0	0	3	10,0
Diphylla ecaudata	0	4	0	0	0	0	4	13,3
Glossophaga soricina	0	2	0	0	1	0	3	10,0
Lasiurus blossevillii	0	0	0	0	0	1	1	3,3
Myotis riparius	0	0	0	0	0	1	1	3,3
Platyrrhinus lineatus	0	0	0	0	0	1	1	3,3
Sturnira lilium	0	1	0	0	2	0	3	10,0
Total (%)	3 (10,0)	11 (36,7)	2 (6,7)	1 (3,3)	7 (23,3)	6 (20,0)	30	

Em relação às áreas de estudo, o local com o maior percentual de infecção por *Leishmania* spp. foi Brazlândia, principalmente entre os morcegos hematófagos (Tabela 5). Das amostras positivas para *Leishmania* spp. 70% eram de papel de filtro (sangue), 26.7% de swab e 3.3% de fragmento de asa. (Tabela 6).

Tabela 6. Espécies de morcegos e parasitos identificados a partir do sequenciamento com SSU rRNA. (*) Amostras de parasitos identificadas somente pela qPCR – kDNA.

* Número de acesso da sequência correspondente do GenBank usada para comparação com a sequência obtida no presente estudo**.**

Local	Amostra	Espécie	Blast	Amostra	PCR	Número de Acesso*
Arboreto	1	*Artibeus lituratus*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	CP009396.1
FAL	8	*Artibeus lituratus*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	JX030135.1
FAL	11	*Carollia perspicillata*	*T. lewisi*	Sangue	SSU rRNA	GU252209.1
FAL	17	*Carollia perspicillata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
FAL	21	*Sturnira lilium*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	XR_001203206.1
FAL	23	*Carollia perspicillata*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA*	-
FAL	24	*Artibeus lituratus*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	CP009396.1
FAL	27	*Carollia perspicillata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
FAL	31	*Carollia perspicillata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
FAL	36	*Carollia perspicillata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
FAL	39	*Carollia perspicillata*	*T. cruzi**	Sangue	qPCR - kDNA	-
FAL	39	*Carollia perspicillata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
JBB	40	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	CP009396.1
JBB	42	*Artibeus lituratus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
JBB	47	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
JBB	53	*Sturnira lilium*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	XR_001203206.1
JBB	60	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Asa	SSU rRNA	JX030135.1
JBB	63	*Glossophaga soricina*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	JX030135.1
JBB	65	*Sturnira lilium*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030083.1

REBIO	70	*Myotis riparius*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	XR_001203206.1
REBIO	72	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
REBIO	77	*Platyrrhinus lineatus*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA*	-
REBIO	78	*Chiroderma doriae*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	CP009396.1
REBIO	85	*Platyrrhinus lineatus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
REBIO	91	*Lasiurus blossevillii*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
REBIO	92	*Chiroderma villosum*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
Arboreto	97	*Artibeus planirostris*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
Arboreto	98	*Artibeus lituratus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	XR_001203206.1
Arboreto	100	*Artibeus planirostris*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA*	-
FERCAL	113	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	XR_001203206.1
Brazlândia	117	*Diphylla ecaudata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
Brazlândia	118	*Diphylla ecaudata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	XR_001203206.1
Brazlândia	119	*Diphylla ecaudata*	*T. dionisii*	Hemocultura	SSU rRNA	FJ001667.2
Brazlândia	120	*Diphylla ecaudata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	CP009396.1
Brazlândia	122	*Carollia perspicillata*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	CP009396.1
Brazlândia	125	*Glossophaga soricina*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
Brazlândia	127	*Diphylla ecaudata*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA*	-
Brazlândia	131	*Glossophaga soricina*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	JX030135.1
Brazlândia	132	*Diphylla ecaudata*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	JX030135.1
Brazlândia	135	*Desmodus rotundus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
Brazlândia	140	*Diphylla ecaudata*	*Leishmania* spp.	Swab	SSU rRNA	JX030083.1

Brazlândia	141	*Diphylla ecaudata*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA	-
Brazlândia	142	*Desmodus rotundus*	*T. rangeli**	Sangue	qPCR - kDNA	-
Brazlândia	144	*Desmodus rotundus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030135.1
Brazlândia	146	*Desmodus rotundus*	*Leishmania* spp.	Sangue	SSU rRNA	JX030083.1

4.0 DISCUSSÃO.

O presente estudo amplia o conhecimento das espécies de tripanossomatídeos encontradas em morcegos em matas de galeria do Cerrado. A maioria dos morcegos analisados (76%) estava infectada por tripanossomatídeos. As infecções ocorreram nas seis áreas estudadas no Distrito Federal em morcegos de 14 espécies e com diferentes hábitos alimentares. Pelo menos cinco espécies de tripanossomatídeos foram registradas, sendo o primeiro registro de *T. dionisii, T. rangeli* e *Leishmania* spp em morcegos da espécie *D. ecaudata,* e o primeiro registro de *T. lewisi* em morcegos da espécie *C. perspicillata*. Além disso, é inédita a detecção de *Leishmania* spp. em amostras de mucosa bucal de morcegos descrita nesse trabalho. A ausência ou baixa ocorrência desses parasitos em esfregaços sanguíneos e hemoculturas sugere que os morcegos, apesar de apresentarem altas taxas de infecção, são animais com baixa parasitemia. Entretanto, não podem ser excluídos como potenciais hospedeiros para tripanossomatídeos, visto que a possibilidade de interação entre os insetos vetores e um morcego infectado é alta, facilitando assim, a transmissão desses parasitos.

Dentre as espécies de tripanossomatídeos detectadas, *T. lewisi*, *T. rangeli* e *T. dionisii* não são consideradas patogênicas para o homem. Porém, o encontro de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. nos morcegos analisados indica que esses mamíferos também participam dos ciclos enzoóticos de parasitos de interesse médico, como já demonstrado para outros grupos de mamíferos no DF (Cardoso *et al*., 2015; Minuzzi-Souza *et al*., 2016). O presente estudo contribui para a análise da diversidade de tripanossomatídeos em morcegos do Cerrado, 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; Shapiro *et al*., 2013, Roque & Jansen, 2014; Jansen *et al*., 2015). Além disso, foram coletadas 14 espécies de aproximadamente 46 já registradas no DF (Reis *et al*., 2013), o que representa 30% da fauna de quirópteros nesta região.

Houve diferença na positividade das amostras biológicas coletadas de um mesmo indivíduo, conforme também encontrado em outros estudos (Savani *et al.,* 2010; Acosta *et al*., 2014, Berzunza-Cruz *et al*., 2015), o que demonstra a importância de analisar diferentes tipos de amostras biológicas para cada indivíduo. Neste trabalho notou-se uma maior positividade de tripanossomatídeos em amostras de sangue impregnadas em papel de filtro. Entretanto, algumas amostras de swab e de fragmento de asa foram positivas para tripanossomatídeos onde não houve positividade pelas amostras de papel de filtro, indicando a importância de coletar diferentes amostras biológicas nesses tipos de estudos. Um dos motivos que pode explicar a diferença de positividade encontrada entre as amostras é a qualidade e o método de extração de DNA. A utilização de kits de extrações de boa qualidade acarreta em maiores quantidades e qualidade de DNA obtido.

A positividade para tripanossomatídeos em amostras de swab e também a identificação de *Leishmania* spp. em pelo menos quatro espécies diferentes de morcegos (*A. lituratus*, *C. perspicillata*, *D. ecaudata* e *G. soricina*), corrobora a validade deste teste para diagnóstico desses parasitos. Tal método de estudo levanta questões sobre a substituição de métodos invasivos e de abate como; remoção do coração, fígado e baço para realização de macerados de órgãos e futuras análises moleculares para identificação de parasitos. Além disso, métodos mais invasivos e de remoção de órgãos não demonstraram diferença significativa de positividade para *Leishmania* spp. em relação a outros métodos menos invasivos (Savani *et al*, 2010*;* Shapiro *et al*., 2013; Berzunza-Cruz *et al*., 2015). A coleta de amostras de swab é um método viável, prático e não invasivo para diagnóstico molecular de *Leishmania* spp, tendo em vista que a frequência de positividade desse tipo de amostra é equivalente a de amostras de biópsias de tecidos (Ferreira *et al*., 2013).

A ausência dos estágios de desenvolvimento dos tripanossomatídeos nas lâminas de esfregaço sanguíneo em indivíduos positivos nas amostras de sangue impregnadas em papel de filtro pode ser explicada pela baixa parasitemia encontrada nesses mamíferos (Hoare, 1973; Marcili, 2008; Lima, 2011), onde apenas uma gota de sangue não é o suficiente para a detecção nas lâminas. A alta positividade de parasitos encontrados somente após amplificação do DNA a partir de técnicas de PCR pode ser explicada pela baixa parasitemia encontrada nos morcegos. Apesar da baixa detecção de parasitos pelas amostras de hemocultura, não há justificativa para a não utilização deste método. Tais dados apresentados coincidem com outros estudos (Marcili, 2008; Barros et al., 2008), onde a taxa de positividade para hemoculturas também foi baixa, o que demonstra a dificuldade de isolamento de tripanossomatídeos neste meio. Alguns dos tripanosomatideos 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 tripanossomatídeos em morcegos são necessários para avaliar a real importância do uso deste método de isolamento. O baixo sucesso de isolamento impede estudos comportamentais desses tripanossomatideos como, por exemplo, a avaliação da suscetibilidade de triatomíneos, cimicídeos e flebotomíneos frente a esses parasitos. Futuros estudos incluindo outros métodos parasitológicos como o xenodiagnóstico usando triatomíneos (Cuba Cuba *et al*., 1979; Gurgel-Gonçalves *et al*., 2004), cimicídeos (Bower & Woo, 1981) e flebotomíneos (Mol *et al*., 2015) poderão avaliar melhor o papel dos morcegos como fontes de infecção de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. dionisii* e espécies de *Leishmania* para seus vetores, assim como revelar aspectos do desenvolvimento desses isolados provenientes de morcegos nos insetos hospedeiros.

O isolamento de parasitos em hemoculturas permite verificar o crescimento e desenvolvimento do parasito. Além do mais, a hemocultura pode identificar parasitos que não foram identificados em outros tipos de testes, como demonstrado nos resultados deste trabalho onde um mesmo morcego (*C. perspicillata)* mostrou positividade para *T. dionisii* em hemocultura e *T. cruzi* em amostras de sangue. Hoje as únicas espécies de *Trypanosoma* isoladas e exclusivas de morcegos são: *T. dionisii* (Cavazzana *et al*., 2010) e *T.c.marinkellei* (Acosta *et al*., 2014). A análise das formas celulares por hemocultura evidenciou a dificuldade taxonômica que existe na identificação morfologica de tripanossomatídeos pouco conhecidos. A proximidade morfológica entre as espécies e a falta de chaves de identificação para tripanossomatídeos presentes em hospedeiros silvestres dificulta o processo de identificação taxonômica (Hoare, 1972). Sendo assim, são necessários outros métodos para o diagnóstico preciso desses parasitos (Wheeler *et al*., 2013).

O sequenciamento por SSU rRNA demonstrou que essa região do RNA é altamente conservada e a utilização desses genes nucleares ribossomais pode dificultar na designação específica de espécies (Machida & Knowlton, 2012). A diferença em apenas alguns pares de nucleotídeos pode ser determinante na identificação precisa dos parasitos. Sendo assim, é necessária a obtenção de uma sequência de DNA limpa, sem muitos *gaps*, e também a utilização de outros alvos (gGAPDH, V75V8 SSU rRNA) que amplifiquem segmentos maiores do DNA (Cavazzana *et al*., 2010; Marcili *et al*., 2014).

Em relação à *Leishmania* spp. verificou-se a presença do parasito em todas as áreas de estudo no DF, o que demonstra a circulação desse em ambientes silvestres e urbanos. Os resultados encontrados neste trabalho indicam que os morcegos não devem ser excluídos como potenciais reservatórios para tripanossomatídeos de interesse médico e que também participam do ciclo enzoótico desses parasitos. A possibilidade desses mamíferos servirem como fonte de infecção por insetos vetores não deve ser ignorada.

Carollia perspicillata foi a espécie que apresentou a maior diversidade de tripanossomatídeos encontrada (*T. lewisi*, *T. dionisi*, *T. rangeli*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp.), contudo essa diversidade pode estar relacionada ao maior número de indivíduos capturados dessa espécie (28.1% de todos os morcegos capturados). Essas espécies de tripanossomatídeos também foram encontradas em *C. perspicillata* em outro trabalho (Acosta *et al.,* 2014). Apesar de *C. perspicillata* ser uma espécie de ampla distribuição no Brasil (Reis *et al.*, 2013), somente há um registro de *Leishmania* sp. infectando esta espécie de morcego na região Sudoeste do país (Shapiro *et al*., 2013), no estado do Mato Grosso do Sul, mostrando como faltam esses estudos de tripanossomatídeos em morcegos.

Esse trabalho apresenta os primeiros registros de circulação de *Leishmania* spp. em morcegos hematófagos da espécie *Diphylla ecaudata.* Dados semelhantes foram encontrados no México, onde *D.rotundus* foi encontrado infectado por *Leishmania (L.) mexicana* (Berzunza-Cruz *et al*., 2015) e no Brasil, no estado de São Paulo, com *D. rotundus* infectado por *L. infantum* e *L. amazonensis* (Oliveira *et al*., 2015).

Além dos morcegos hematófagos, são também novos os registros de ocorrência de *Leishmania* spp. em morcegos insetívoros das espécies *Myotis riparius* e *Lasiurus blossevillii*, assim como nas espécies de morcegos frugívoros *Chiroderma doriae*, *Chiroderma villosum* e *Platyrrhinus lineatus*. Mais uma vez, tais dados demonstram que ainda são escassos os estudos realizados de identificação de espécies de *Leishmania* em morcegos.

Adicionalmente, este é o primeiro registro de *T. dionisii* em *D. ecaudata*. Curiosamente, um mesmo indivíduo *C. perspicillata* foi encontrado infectado por *T. dionisii* e *T. cruzi*. Todavia, na hemocultura deste morcego foi possível isolar somente *T. dionisii*, o que pode estar relacionado à baixa parasitemia de *T. cruzi* neste morcego ou a dificuldade de isolar este parasito. O desenvolvimento de *T. dionisii* nos morcegos e na hemocultura é semelhante ao de *T. cruzi*, ou seja, as formas amastigotas desenvolvem-se nos músculos cardíacos, estriados e do estômago (Hoare, 1972; Lima, 2011). Contudo, *T. dionisii* produz pseudocistos de formas epimastigotas no coração, diafragma, músculos do esterno, na mucosa intestinal e no ovário, além de ninhos de formas amastigotas (Molyneux, 1991). Ressalta-se que *T. dionisii* não é patogênico para os morcegos.

Quanto ao *T. rangeli*, foram encontradas infecções em *C. perspicillata*, *P. lineatus*, *A. planirostris*, *D. rotundus* e *D. ecaudata*. Com exceção de *D. ecaudata*, onde não há registros de infecções por *T. rangeli*, todas as outras espécies de morcegos citadas já foram encontradas infectadas por *T. rangeli*. (Lima, 2011; Ramírez *et al*., 2014; Acosta *et al*., 2014; Pinto *et al*., 2015). Apesar de não apresentar importância médica, o *T. rangeli* é a segunda espécie mais frequente de tripanossoma que infecta humanos, mamíferos silvestres e domésticos na América do Sul e Central (Guhl e Vallejo, 2003). Alem do mais, este parasito apresenta uma distribuição geográfica sobreposta com o *T. cruzi*, possibilitando a ocorrência de infecções mistas tanto nos hospedeiros vertebrados quanto no triatomíneo (Cuba-Cuba, 1998).

Não foi observada diferença significativa entre a proporção de morcegos infectados entre diferentes classes de massa corporal. Nenhum dos morcegos parasitados apresentou diferenças na massa corporal

devido à infecção por tripanossomatídeos, pois os valores de massa corporal estavam todos dentro do padrão de média da espécie (Reis *et al*., 2007). A baixa parasitemia nesses mamíferos, conforme indicado nas análises de hemocultura, pode ser uma das justificativas para a não verificação de alterações significativas nas massas corporais.

Apenas um dos morcegos infectados apresentou uma lesão sugestiva de *Leishmania*, a qual não pode ser confirmada por bióspia. Entretanto, alguns estudos (Shapiro *et al*., 2013; Berzunza-Cruz *et al*., 2015) já identificaram lesões dermatológicas em *G. soricina* e *A. lituratus* associadas com *L. braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, respectivamente. Contudo, somente um morcego em cada um dos estudos elucidados demonstrou as lesões na pele, indicando que os morcegos são possíveis reservatórios de *Leishmania* spp. sem sofrerem as consequências da doença (Berzunza-Cruz *et al*., 2015). Além disso, há a possibilidade de sintomas inaparentes ou lesões não características de *Leishmania* em morcegos. Em roedores parasitados por *Leishmania* sp. frequentemente não se detectam lesões aparentes, porém observa-se nos animais áreas sem pêlo e nas caudas e orelhas quando pesquisadas minuciosamente (Lainson, 2010). Adicionalmente espécies de roedores silvestres (*Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*) são infecciosos para flebotomíneos mesmo quando assintomáticos e aparentemente não há associação entre infecciosidade para flebotomíneos e parasitemia de *Leishmania* nos tecidos dos roedores (Andrade et al., 2015). A ausência de manifestações clínicas nos morcegos detectados com DNA de espécies de *Leishmania* poderia ser explicada devido ao fato dos morcegos terem sido expostos ao parasito acidentalmente em algum momento de sua vida sem desenvolver necessariamente infecções persistentes ou altas parasitemias. Entretanto, a infecciosidade dos morcegos para flebotomíneos pode ocorrer sem necessariamente apresentarem alta carga parasitária, assim como já observado para roedores infectados por *Leishmania* (Andrade *et al*., 2015). Estudos avaliando infecção experimental de *Leishmania* e *Trypanosoma* em morcegos e a infecciosidade dos mesmos para flebotomíneos e triatomíneos respectivamente poderão revelar o papel deles na transmissão enzoótica desses tripanossomatídeos. Finalmente, as manifestações clínicas de doenças causadas por tripanossomatídeos em morcegos podem estar associadas com o aparecimento de outros tipos de doenças e coinfecções por outros tipos de parasitos.

A espécie insetívora *Lasiurus blossevillii* foi diagnosticada com *Leishmania* spp., o que levanta a hipótese de que a infecção desses morcegos possa estar não só ocorrendo por meio da picada dos flebotomíneos (Lampo *et al.,* 2000; Berzunza-Cruz *et al*., 2015) como também pela ingestão de insetos já infectados pelo parasito. O aparecimento de *T. dionisii* em *C. perspicillata* e *D. ecaudata* pode ser explicada

pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de cimicídeos (Lima, 2011), visto que tais morcegos se alimentam de frutos e sangue, respectivamente. No caso dos morcegos hematófagos, surge a hipótese de que, pela proximidade evolutiva de *T. dionisii* e *T. cruzi* (Hoare, 1973; Lima, 2011), a transmissão de *T. dionisii* possa ocorrer entre os próprios morcegos a partir de repasto sanguíneo e situações de altruísmo recíproco (Wilkinson, 1988), onde há a regurgitação sanguínea de um indivíduo para o outro.

A infecção de *Leishmania* spp. em morcegos hematófagos, frugívoros e nectarívoros ainda é melhor explicada a partir da picada do flebotomíneo infectado (Berzuna-Cruz *et al.*, 2015). A sobreposição de habitats de flebotomíneos com morcegos pode favorecer a transmissão por espécies de *Leishmania*. Muitas espécies de morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros habitam bordas de matas e locais úmidos, sombreados, escuros e ricos em detritos orgânicos que acabam sendo ótimos sítios de reprodução de flebotomíneos e alimentação de larvas desses. Já foram identificados flebotomíneos habitando cavernas e fendas colonizadas por morcegos hematófagos, possibilitando o contanto dos morcegos com os flebotomíneos e também providenciando uma fonte de sangue alternativa para as fêmeas de flebotomíneos (Berzunza-Cruz *et al*.*,* 2009). Contudo, ainda são necessários mais estudos para compreender de que forma os morcegos são infectados por *Leishmania* spp assim como sua capacidade de infectar flebotomíneos experimentalmente e na natureza

Futuramente, espera-se identificar todas as outras amostras biológicas que também foram positivas, mas que não foram encaminhadas para o sequenciamento. Inicialmente pretende-se realizar uma PCR-ITS1 para verificar quais dessas amostras são positivas para *Leishmania*. Em caso de positividade, essas amostras serão purificadas e encaminhadas para o sequenciamento para identificação das espécies (Schoönian *et al.* 2003). Em caso de negatividade para *Leishmania*, as amostras serão submetidas à PCR com os primers V7V8 SSU rRNA e gGAPDH, que amplificam 900bp e 850bp respectivamente (Ferreira *et al*., 2003; Hamilton *et al*. 2007) para posterior sequenciamento. Tais *primers* já são utilizados em análises filogenéticas de tripanossomatídeos e permitem uma análise mais precisa e confiável (Marcili *et al*., 2014). Finalmente, espera-se verificar a tipificação das linhagens de *T. cruzi* e *T. rangeli* encontradas. Para isso, serão realizadas PCRs para amplificar o fragmento de 652pb do gene nuclear de glucose-6-fosfato-isomerase (GPI) e do espaçador SL, que a partir do sequenciamento permitirá a identificação das linhagens de *T. cruzi* e *T. rangeli*, respectivamente (Breniere *et al*., 2010; Maia da Silva *et al*., 2009).

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.

1. Foram identificados tripanossomatídeos em todas as áreas de estudo e em todas as 14 das espécies de morcegos amostradas. A Fazenda Água Limpa da UnB (FAL) foi o local com a maior riqueza de espécies de tripanossomatídeos encontrada (*Leishmania* spp., *T. cruzi*, *T. dionisii*, *T. rangeli* e *T. lewisi*).

2. Todas as áreas de estudo apresentaram morcegos infectados por *Leishmania* spp. o que demonstra ampla circulação do parasito no Distrito Federal e a participação desse grupo de mamíferos nos ciclos silvestres desses parasitos.

3. Foi observada uma alta taxa de infecção natural de morcegos por tripanossomatídeos no DF. A positividade das amostras foi maior no papel de filtro, seguida pelo swab, asa e hemocultura.

4. A coleta de swab bucal mostrou ser um bom método de diagnóstico de tripanossomatídeos em morcegos por ser pouco invasivo, prático e confiável. Esse método permitiu identificar *Leishmania* spp. em morcegos em que as outras amostras biológicas eram negativas.

5. Não foram verificadas diferenças significativas entre machos e fêmeas infectados. Assim como também não foram verificadas diferenças significativas de infecção em morcegos de diferentes hábitos alimentares.

6. Este estudo apresenta o primeiro registro de circulação de *Leishmania* spp. em *Diphylla ecaudata*, *Myotis riparius, Lasiurus blossevillii*, *Chiroderma doriae*, *Chiroderma villosum* e *Platyrrhinus lineatus* no Brasil.

7. A nested PCR SSU rRNA demonstrou ser uma técnica promissora para o diagnóstico de tripanossomatídeos em morcegos, visto a alta positividade de amostras encontradas nestes mamíferos mesmo quando apresentam baixa parasitemia.

8. Os morcegos podem ser considerados como potenciais reservatórios para tripanossomatídeos de interesse médico e também na participação do ciclo enzoótico desses parasitos.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Acosta, I.C.L., Costa, A.P., Gennari, S.M. & Marcili, A. 2014. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic Rainforest fragment and surroundings in the state of Espírito Santo, Brazil.Journal of Medical Entomology, 51(3): 686-693.

Aguiar, G.M. de & Medeiros, WM de. 2003. Distribuição e Hábitats. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, pág. 297-255.

Aguiar, L.M.S, Bernard, E. & Machado, R.B. 2014. Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Neotropical savannah. Zoologia (Curitiba) 31(3): 223-229.

Alencar, J.E., Barros, N.N., Piccinini, R.S., Pinto, V.M. & Tomé, G.S. 1976. Estudo sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará V. Quirópteros infectados com tripanosomas tipo *cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 10: 311-312.

Andrade MS, Courtenay O, F. Brito ME, Carvalho FG, Carvalho AWS, Soares F, *et al.* 2015. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania* (Viannia) braziliensis. PLoS Neglected Tropical Disease 9(10): e0004137.

Aransay, A.M., Scoulica, E. & Tselentis, Y. 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology, 66(5): 1933-1938.

Ashford, R.W. 1996 Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clinical Dermatology, 14, 523-532.

Bernanrd, E. 2001. Species list of bats, mammalia, chiroptera of santaram area, Pará State, Brazil. Revista Brasileira Zoologia, 18: 455-463.

Berzunza-Cruz M., Bricaire G., Salaiza Suazo N., Pérez-Montfort Becker I. 2009. PCR for identification of species causing American cutaneous Leishmaniasis. Parasitology Research, 104(3): 691–699. doi: 10.1007/ s00436-008-1247-2 PMID: 19002715

Berzunza-Cruz M, Rodríguez-Moreno Á, Gutiérrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens CR, Hidalgo-Mihart M, Marina, C.F., Rebollar-Téllez, E.A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C.D., Ibarra-Cerdenã, C.L.,

Sánchez-Cordero, V & Becker, I. 2015. *Leishmania (L.) mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(1): e0003438

Bower, S. M.; Woo, P. T. K., 1981: Development of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *hedricki* in *Cimex brevis* (Hemiptera: Cimicidae). Canadian Journal of Zoology, 59(3): 546-554

Brasil. 2007. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 182 p.

Breniére SF, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, Tibayrenc M, Noireau F. 2012. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(5): e1650. doi: 10.1371/journal.pntd.0001650.

Camargo, E.P. 1998. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. Advances in Parasitology, 42: 29-112

Carvacalho R.U, Rodríguez M.E.F, Salvatella R, *et al*. 1998.Habitats and related fauna. In: Carvalho RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H. ed. Atlas of Chagas disease vectors in Americas. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, (2): 561-600.

Cardoso R.M., Nitz N., Romero G.A.S., & Minuzzi T.T.C, Dietrich A. G, Mendes J.D., Reis M.L. *et al*. Expanding the knowledge about Leishmania species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. Parasites & Vectors 2015; 8: 171.

Carranza-Tamayo C.O., Carvalho M.S.L., Bredt A., Bofil M.I.R., Rodrigues R.M.B., Silva A.D., Cortez, S.M.F.C. & Romero, G.A.S. 2010. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, 43(4): 396-399.

Cavalier-Smith. 1993. T Kingdom protoza and its 18 phyla. Microbiology Reviews, 57(4): 953-994

Cavazzana, M. Jr., A. Marcili, L. Lima, F. M. Da Silva, A. C.Junqueira, H. H. Veludo, L. B. Viola, M. Campaner, V. L.Nunes, F. Paiva, *et al*. 2010. 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 for Parasitology, 40: 345Ð355.

Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Meira Cda S, Motoie G, Gava R, Hiramoto RM, de Almeida ME, da Silva AJ, Cutolo AA, Menz I. 2015. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a *L. (L.) infantum* hypothetical protein as target in canine samples. Experimental Parasitology, 57:156-62. doi: 10.1016/j.exppara.2015.08.014. Epub

Coura JR, Viñas PA. 2010. Chagas disease: a New Worldwide Challenge. Nature. 465: S6-S7. doi: 10.1038/nature09221.

Cottontail, V.K., Kalko, E.K.V., Cottontail, I., Wellinghausen, N., Tschapka, M., Perkins, S.L. & Pinto, C.M. 2014. High Local Diversity of *Trypanosoma cruzi* in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* clade. Plos One, September (9): 1-6.

Cuba CC, Alvarenga NJ, Barreto AC, Marsden PD, Macedo V, Gama MP. 1979. *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera, Triatominae) for xenodiagnosis of patients with serologically detectable *Trypanosoma cruzi* infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,73(5):524-7.

Cuba-Cuba C.A. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31 (2): 207-220. doi: 10.1590/S0037-86821998000200007.

da Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, Mesquita ET, Gennari SM & Marcili A. 2015. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* Infection in wild mammals from Maranhão State, Brazil. Vector Borne and Zoonotic Diseases, 15(11):656-66. doi: 10.1089/vbz.2015.1771. Epub.

de Lima H., Rodríguez N., Barrios M.A., Avila A., Cañizales I. & Gutiérrez S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103: 412-414.

de Oliveira FM, Costa LH, de Barros TL, Ito PK, Colombo FA, de Carvalho C, Pedro WA, Queiroz LH & Nunes CM. 2015. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. Acta Tropica, 150: 176-81. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.010.

de 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 Negl Trop Dis. Jan 25;10(1):e0004378. doi: 10.1371/journal.pntd.0004378.

Diane, L. 1961. Tripanossomatídeos de mamíferos da Região Amazônica. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Para. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 3: 15p.

Dietz, M. & Kalko, E. 2006. Seasonal changes in daily torpor patterns of free-ranging female and male Daubenton's bats, *Myotis daubentonii*. Journal of Comarative. Physiology, 176: 223-231.

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, 104(1):59-69, 31. doi: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4766201410415

Ferreira SdA, Almeida GG, Silva SdO, Vogas GP, Fujiwara RT, Andrade, ASR. & Melo, MN. 2013. Nasal, oral and ear Swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches fordetection of *Leishmania infantum* DNA. PLoS Neglected Tropical Disease, 7(4): e2150. doi:10.1371/journal.pntd.0002150

Ferreira, R.C., De Souza, A.A., Freitas, R.A., Campaner, M. Takata, C.S., Barrett, T.V., Shaw, J.J & Texeira, M.M. 2008. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidade, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. Journal of Eurakryotic. Microbiology, 55; 427-435.

Fox I, Thillet CJ. 1962. Incidence of Trypanosoma lewisi in Puerto Rican bats. Journal of Parasitology, 48: 123.

Gardner, R.A. & Molyneus, D.H. 1988. *Schizotrypanum* in British bats. Parasitology, 97: 43-50.

Gardner, A. L. 1977. Feeding habits. - In: Baker, R. J., Knox Jones, J Jr. and Carter, D. C. (eds). Biology of bats of the New World family Phyllostomidae. Part II. Special Publications,. Museum ofTexas Technical University., pp. 293-350

Giannini, N.P. & Kalko, E.K.V. 2004. Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. Oikos, 105: 209-220.

Guhl F & Vallejo GA. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 98 (4): 435-442. doi: 10.1590/S0074-02762003000400001.

Gurgel-Gonçalves, R., Ramalho, R.E.D., Duarte, M.A., Palma, A.R.T., Abad-Franch, F. & Carranza, J.C. 2004 Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal Distric of Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 46: 323-330.

Gurgel-Gonçalves R., Galvão C., Costa J, & Peterson A.T. 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. J Trop Med; ID 705326: 1-15.

Guyatt, K.J., Twin, J., Davis, P., Holmes, E.C., Smith, G.A., Smith, I.L., Mackenzie, J.S. & Young, P.L. 2003. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. Journal of General Virology, 84: 485-496.

Hamilton, P.B., Gibson, W.C. & Stevens, J.R. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44 (1): 15-25.

Halmiton, P.B., Cruickshank, C., Stevens, J.R., Texeira, M.M. & Matthews, F. 2012. Parasites reveal movement of bats between the new and old worlds. Molecular Phylogenetics and Evolution, 63: 521-526.

Hamilton, P.B., Texeira, M.M.G & Stevens, J.R. 2012. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. Trends in Parasitology, 28: 136-141.

Halpin, K., Young, P.L., Field, H.E. & Mackenzie, J.S. 2000. Isolation of Hedra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra Virus. Journal of General Virology, 81: 1927-1932.

Herrera H.M, Davila, A.M, Norek, A., Abreu, U.G, Sousa, S.S, D'Andrea, P.S. & Jansen, A.M. 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. Veterinary Parasitology, 10: 263-275

Hernández, R., Rios, P., Valdés, A.M. & Piñero, D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribossomal RNA coding region: comparision with other trypanosomatids. Molecular Biochemestry Parasitology, 41 (2): 207-212.

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

Jansen, A.M. & Roque, A.L.R. 2010. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: Telleria, J. Tibyarenc, M. (Eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease. 1st ed. Elsevier, London, pp. 249-276.

Jansen, A.M., Xavier, S.C.C. & Roque, A.L.R. 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Tropica, 151: 1-15.

Jennings, Y. L.; de Souza, A. A. A.; Ishikawa, E. A.; Shaw, J.; Lainson, R.; Silveira, F. 2014. "Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* × *Leishmania (Viannia) shawi shawi*". Parasite 21: 39. doi:10.1051/parasite/2014039.

Jones, K.E., Purvis, A., Maclarnon, A., Bininda-Emonds, O.R. & Simmons, N.B. 2002. A phylogenetic supertreer of the bats (Mammalia:Chiroptera). Biological Reviews Cam Phylogenetics Society, 77 (2): 223-259. doi: 10.1017/S1464793101005899

Kassahun A, Sadlova J, Benda P, Kostalova T, Warburg A, Hailu A, Baneth G, Volf P & Votypka J. 2015. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. Acta Tropica, 150: 166-70. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.024. Epub

Kunz, T.H. 1982. Roosting ecology of bats. In: Kunz, T.H. (Ed.). Ecology of Bats. Plenum Press, New York: 1-55.

Kunz, T.H., Arnett, E.B., Cooper, B.M., Erickson, W.P., Larkin. R. P, Mabee, T., Morrison, M.L., Strickland, M.D. & Szewczak, J.E. 2007. Assessing impacts of wind-energy development on nocturnally active birds and bats: a guidance document. Journal of Wildlife Management, 71: 2449-2486.

Lainson R & Shaw JJ. 1970 Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated form man and forest animals. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 64 (5): 654-667.

Lainson R. 2010 The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 1(2):13-32

Lampo, M., Feliciangeli M.D, Márquez L.M, Bastidas C. & Lau P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62 (6): 719-719.r

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

Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. Dec 1; 438(7068):575-6.

Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S. & Wang LF. 2005. Bats are natural reservoirs of sars-like coronaviruses. Science, 310: 676-679.

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. 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Tropica, 151: 166-17. doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.015

Lima, L. 2011. Morphological, biological and genetic diversity, and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from Brazil and Mozambique (Africa). Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Herrera, H.M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. & Jansen, A.M. 2008. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. Veterinary Parasitology, 156(3-4):314-318.

Machida, R.J. & Knowlton, N. 2012. PCR Primers for Metazoan Nuclear 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences. PLoS ONE 7(9): e46180. doi:10.1371/ journal.pone.0046180

Maeda, M.H. 2011. Triatomíneos sinantrópicos no Distrto Federal Brasil: Ocorrência espaço-temporal e conhecimento dos moradores em relação à Doença de Chagas e seus vetores. Tese de mestrado. Instituto de Medicina Tropical. Universidade de Brasília, Brasília.

Maeda M.H,. Knox M.B. & Gurgel-Gonçalves R. 2012. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. Jan/Fev; 45(1): 71-76.

Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP & Teixeira MM. 2009. *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, 109 (3): 199-207. doi: 10.1016/j.actatropica.11.005. Epub.

Marcili, A. 2008. *Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenética e padrões ecogeográficos de isolados silvestres. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédias. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL & Teixeira MM. 2009. 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,136(6):641-655. doi: 10.1017/S0031182009005861.

Arlei Marcili, Andrea P. da Costa, Herbert S. Soares, Igor da C. L. Acosta, Julia T. R. de Lima, Antonio H. H. Minervino, Andréia T. L. Melo, Daniel M. Aguiar, Richard C. Pacheco, and Solange M. Gennari. Isolation and Phylogenetic Relationships of Bat Trypanosomes from Different Biomes in Mato Grosso, Brazil. Journal of Parasitology, 99(6):1071-1076.

Marcili A., Sperança M.A., da Costa A.P., Madeira Mde F., Soares H.S., Sanches Cde , Acosta Ida C., Girotto A., Minervino A.H., Horta M.C., Shaw JJ &Gennari S.M. 2014; Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.)infantum chagasi* in South America. Infections, Genetics and Evolution, 25: 44-51.

Marinkelle, C.J. 1976. The Biology of the Trypanosomes of Non-Human Primates. In: Lumsden WHR, Evans, DA. Biology of kinetoplastida. London: Academic Press, pp: 218-248

Maudlin I, Eisler MC & Welburn SC. 2009. Neglected and endemic zoonoses. Philosophical Transactions of the Royal Society B., 364: 2777-2787

Menachery V.D., Yount, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L.E., Plante J.A., Graham R.L., Scobey, T., Xing-Yi G., Donaldson, E.F., Randell, S.H., Lanzavecchia, A., Marasco W.A., Zhengli-Li S. & Baric, R.S.. 2015 A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. Nature Medicine; doi: 10.1038/nm.3985

Menezes-Jr., L.F., Duarte, A.C., Novaes, R.L.M., Façanha, A.C., Peracchi, A.L., Costa, L.M.,Prata, A.F.D. & Esbérard, C.E.L. 2008. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Biota Neotropica, 8 (2): 243-245.

Ministério da Saúde. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed. Editora do Ministério da Saúde. Brasília.

Mol JP, Soave SA, Turchetti AP, Pinheiro GR, Pessanha AT, Malta MC, Tinoco HP, Figueiredo LA, Gontijo NF, Paixão TA, Fujiwara RT, Santos RL. 2015. Transmissibility of *Leishmania infantum* from maned wolves (Chrysocyon brachyurus) and bush dogs (Speothos venaticus) to Lutzomyia longipalpis. Veterinary Parasitology,, 212(3-4):86-91. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.08.024. Epub

Molyneux, D.H. 1991. Trypanosomes of Bats. Parasic Protozoa. 2end ed. London: Academic Press, pp: 195-223.

Morsy TA, Salama MM, Abdel Hamid MY. 1987. Detection of Leishmania antibodies in bats. Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 17(2):797-8.

Moser D R., Kirchhoff L V & Donelson J E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, (7): 1477-1482

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.

Nowak, M.R. Walker's Mammals of the World. 1991. The Johns Hopkins Press Ltd. 5ed. 642pp

Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, & Pena SDJ. 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Mar; 95: 3776-3780.

Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Lemos ERS. 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. Viruses, 6: 1929–73.

Oprea, M.; Mendes, P.; Vieira, T. B. & Ditchfield, A. D. 2009. Do wooded streets provide connectivity for bats in an urban landscape? Biodiversity and Conservation 18:2361-2371.

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.

Paiva-Cavalcanti, M. Felinto de Brito, M.E., de Souza W.V., Miranda Goes, Y & Abath, F.G. 2009. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. The Veterinary Journal, 189: 356-358.

Pinto C.M., Ocaña-Mayorga S., Tapia E.E., Lobos S.E., Zurita A.P., Aguirre-Villacís F., MacDonald A., Villacís A.G., Lima L., Teixeira M.M., Grijalva M.J. & Perkins S.L. 2015. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. PLoS ONE 10(10): e0139999. doi:10.1371/journal.pone.0139999

Pinto, A.S. & Bento, D.N. 1986. *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the State of Piauí, Northeastern Brazil. Revista daSociedade Brasileira deMedicina Tropical, 19: 31-34.

Porto, C. 2004. Autoctonia da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal: estudo em seres humanos e cães na cidade de São Sebastião. Dissertação de Mestrado em Dermatologia. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 86pp.

Quaresma P.F., Rêgo F.D., Botelho H.A., da Silva S.R., Moura Júnior A.J., Teixeira Neto R.G., Madeira F.M., Carvalho M.B., Paglia A.P., Melo M.N. & Gontijo C.M. 2011. Wild synamthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais, State Brazil. Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene, 105: 579-585.

Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E & Cucunubá ZM. 2014. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. Zoonoses Public Health, 61(7):477-9. doi: 10.1111/zph.12094. Epub.

Rajendran P, Chatterjee SN, Dhanda V & Dhiman RC. 1985. Observations on the role of vespertilionid bats in relation to non-human vertebrate reservoir in Indian kala-azar. Indian Journal Pathology Microbiology. Apr;28(2):153-8.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, & Guhl F. 2014. *Trypanosome* species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. Infection Genetics & Evolution; 22:250-6. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.022. Epub

Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, Marcos da Matta Guedes P, Peneau J,

Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martínez M, Martínez NE, Villarroel R, Villarroel S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, Maria da Cunha Galvão L, Jácome da Câmara AC, Espinoza B, Alarcón de Noya B, Puerta , Riarte, Diosque, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE & Schijman AG. 2015. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas Disease patients. Journal of Molecular Diagnosis, 17(5):605-15. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.

Reis, N.R., Fregonezi, M.N., Peracchi, A.L. & Shibatta, O.A. 2013. Morcegos do Brasil – Guia de Campo. 1ed. Techinical Books, Rio de Janeiro. 252p.

Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A & de Lima, I.P. 2007. Morcegos do Brasil. Universidade de Londrina, Londrina. 253p.

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

Shapiro JT, da Costa Lima Junior MS, Dorval ME, de Oliveira França A, Cepa Matos Mde F, Bordignon MO. 2013. First record of *Leishmania brasiliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. Actra Tropica, 128: 171-174.

Savani E.S.M.N., Nunes V.L.B, Galati E.A.B, Castilho T.M, de Araujo F.S, Ilha I.M.N, Camargo M.C.G.O, D'Auria, S.R.N., Floeter-Winter L.M. Ocurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and Tr*ypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 100(7): 739-741. doi: 10.1590/S0074-02762005000700011.

Savani ES, de Almeida MF, de Oliveira Camargo MC, D'Auria SR, Silva MM, de Oliveira ML, & Sacramento D. 2010. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian Bats. Veterinary Parasitology 168: 5-10

Schoönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Resber W, Jaffe C. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 47:349–35

Silveira A.C & Dias J.C.P. 2011. O controle da transmissão vetorial. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44 (2): 52-63. doi: 10.1590/S0037-86822011000800009.

Simmons, Chiroptera pp 2005. in Wilson, D.E. & Reeder, D.M. 2005. Mammals Species of the World. Baltimore Johns Hopkins University Press, 2181pp.

Simmons, N.B. & Geisler, J.H. 1998. Phylogenetic relationships of *Icronycteris*, *Archaeonycterix*, *Hassianycterix* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments of the evolution of echolocating and foraging strategies in Microchiroptera. Bulletin of the American Museum of Natural History 235 (1): 1-182

Sociedade Brasileira de Espeleologia. Disponível em < http://www.sbe.com.br/>. Acesso em 02 de março de 2016.

Sogin, M.L., Elwood, H.J. & Gunderson, J.H. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 83 (5): 1383-87.

Steindel, M., Grisard E.C., Carvalho Pinto, C.J., Cordeiro, F.D., Ribeiro-Rodrigues, R. & Romanha, A.J. 1998. Characterization of trypanosomes from the Subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. Journal of Parasitology, 84:601-608.

Stevens, J.R. 2008. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes.Parasite, 15 (3): 226-232.

Sturm N.R, Degrave W., Morel C., Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 1989 Mar; 33 (3): 205-214

Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Arevalo J & Adaui V. 2015. Quantification of *Leishmania (Viannia*) Kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and inter-sampling variability in parasite load. PLoS Neglected Tropical Diseases,9(7):e0003936. doi: 10.1371/journal.pntd.0003936. eCollection.

Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S.J.& Murphy, W.J. 2005. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and Fossil Record. Science, 307: 580-584

Teeling, E.C. 2009. Chiroptera, in: S.B. Hedges & S. Kumar, Editors, The Time Tree of Life, Oxford University Press, 499-503

Teixeira, M.M., 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. 2011. 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. 2011 Jul; 162(3):503-24. doi: 10.1016/j.protis.2011.01.001. Epub

Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD & Johnson KM. 1971. Natural host preferences of Panamanian Phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 20: 1-5.

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.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A & Ayala FJ. 1986 Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 83(1): 115–119.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. 1994 Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. Journal of Eukaryotic Microbiology41: 324–330. doi: 10.1111/j.1550-7408.1994.tb06085.x.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O & Grisard EC. 2002 Parity between kinetoplast DNA and mini exon gene sequences support either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rang*eli strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. Infection Genetics & Evolution, 67: 1-7.

Villela M.M., Souza J.M.B.S., Melo V.P. & Dias J.C.P. 2009. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública [online], vol.25, n.4, pp. 907-917. ISSN 1678-4464. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000400022.

Westenberger, S.J., Cerqueira, G.C., El-Sayed, N.M., Zingales, B., Campbell, D.A. & Sturm, N.R. 2006. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species and strain specific variation and conserved element in the non-coding region. BMC Genomics, 7: 60. doi:10.1186/1471-2164-7-60

Wheeler, R.J., Gluenz, E. & Gull, K. 2013. The Limits of Trypanossomatid Morphological Diversity. PLoS One, 8(11): e79581 doi:10.1371/journal.pone.0079581

Wilkinson G. 1988 Reciprocal altruism in bats and other mammals. Ethology. Sociobiology. 9, 85–100. doi:10.1016/0162-3095(88)90015-5

Wilson, D.E. & Reeder, D.M. 2005. Mammals Species of the World. Baltimore Johns Hopkins University Press, 2181pp.

World Health Organization (WHO). 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/. Acesso em: 03 de fevereiro de 2016.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA & Chiari E. 2009. A new consensus for *Trypanosoma c*ruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Nov; 104(7): 1051–1054. doi: 10.1590/S0074-02762009000700021.

ANEXO 1

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de abril de 2014.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UnB

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS SOBRE A INFECÇÃO NATURAL DE VETORES E RESERVATÓRIOS DE LEISHMANIA SPP. NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**", UnBDOC n.º 21793/2014, sob responsabilidade do Professor Rodrigo Gurgel Gonçalves foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA Comitê de Ética no Uso Animal UnB

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO 2

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36808-7	Data da Emissão: 13/04/2015 11:21	Data para Revalidação*: 12/05/2016

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rodrigo Gurgel Gonçalves	CPF: 864.037.531-34
Título do Projeto: Biologia de tripanosomatídeos e seus vetores no Brasil Central	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de flebotomíneos	10/2012	10/2015
2	Captura de Mamíferos	04/2014	05/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As armadilhas deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido a hipo ou hipertermia. As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos.
2	Entrar em contato com a equipe da Rebio da Contagem, (61) 3233-4553 / 3233-6897, para apresentar cronograma e locais de atividade, antes do início da pesquisa.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Douglas de Almeida Rocha	Pesquisador	025.319.461-01	-	Brasileira
2	Andrey José de Andrade	Pesquisador	042.450.886-99	M9163430 PC-MG	Brasileira
3	JONATAS BARBOSA CAVALCANTE FERREIRA	pesquisador	714.867.201-53	2087016 SSP-DF	Brasileira
4	Marcos Takashi Obara	Pesquisador	260.281.688-40	25469831-1 IFP-DF	Brasileira
5	Aline Machado Rapello do Nascimento	Pesquisadora	874.167.351-49	1789791 SSP-DF	Brasileira
6	João Lucas M. Lourenço	Pesquisador	034.399.561-13	2956378 SSP-DF	Brasileira
7	Larissa Rodrigues da Silva	estagiária	029.496.551-30	3046586 SSP-DF	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12312335

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36808-7	Data da Emissão: 13/04/2015 11:21	Data para Revalidação*: 12/05/2016

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rodrigo Gurgel Gonçalves	CPF: 864.037.531-34
Título do Projeto: Biologia de tripanosomatídeos e seus vetores no Brasil Central	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

8	amanda campelo de oliveira	estagiária	042.783.881-95	2963282 ssp-DF	Brasileira
9	VAGNER JOSÉ MENDONÇA	Pesquisador	287.242.958-17	292327936 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		DF	RESERVA BIOLÓGICA DA CONTAGEM	UC Federal
2	BRASILIA	DF	Fazenda Agua Limpa UnB	Fora de UC Federal
3		DF	PARQUE NACIONAL DE BRASÍLIA	UC Federal
4	BRASILIA	DF	Jardim Botânico de Brasília	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Oryzomys, Oligoryzomys, Chiroptera, Necromys lasiurus, Rhipidomys macrurus, Proechimys, Gracilinanus, Psychodidae, Didelphidae, Nectomys rattus, Oecomys bicolor, Akodon, Calomys
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Gracilinanus, Oryzomys, Rhipidomys macrurus, Didelphidae, Oecomys bicolor, Nectomys rattus, Proechimys, Necromys lasiurus, Chiroptera, Akodon, Calomys, Oligoryzomys
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Psychodidae (*Qtde: 600)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Chiroptera, Proechimys, Gracilinanus, Oryzomys, Akodon, Calomys, Necromys lasiurus, Oecomys bicolor, Oligoryzomys, Didelphidae, Nectomys rattus, Rhipidomys macrurus

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Outros métodos de captura/coleta(Shannon)
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
4	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12312335

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36808-7	Data da Emissão: 13/04/2015 11:21	Data para Revalidação*: 12/05/2016

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rodrigo Gurgel Gonçalves	CPF: 864.037.531-34
Título do Projeto: Biologia de tripanosomatídeos e seus vetores no Brasil Central	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

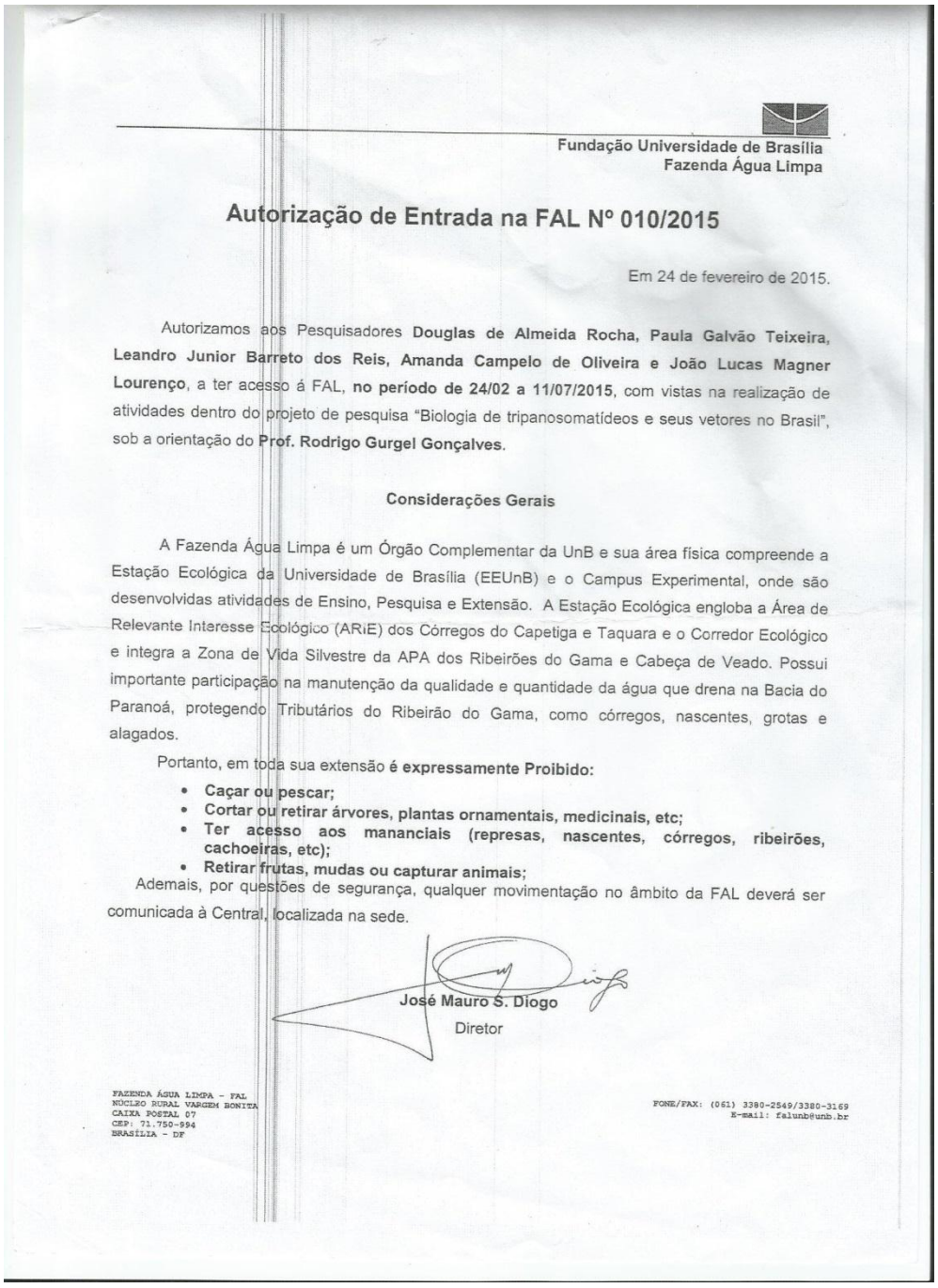
* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 3/3

Código de autenticação: 12312335

ANEXO 3



Fundação Universidade de Brasília
Fazenda Água Limpa

Autorização de Entrada na FAL Nº 010/2015

Em 24 de fevereiro de 2015.

Autorizamos aos Pesquisadores **Douglas de Almeida Rocha, Paula Galvão Teixeira, Leandro Junior Barreto dos Reis, Amanda Campelo de Oliveira e João Lucas Magner Lourenço**, a ter acesso á FAL, **no período de 24/02 a 11/07/2015**, com vistas na realização de atividades dentro do projeto de pesquisa "Biologia de tripanosomatídeos e seus vetores no Brasil", sob a orientação do **Prof. Rodrigo Gurgel Gonçalves**.

Considerações Gerais

A Fazenda Água Limpa é um Órgão Complementar da UnB e sua área física compreende a Estação Ecológica da Universidade de Brasília (EEUnB) e o Campus Experimental, onde são desenvolvidas atividades de Ensino, Pesquisa e Extensão. A Estação Ecológica engloba a Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) dos Córregos do Capetiga e Taquara e o Corredor Ecológico e integra a Zona de Vida Silvestre da APA dos Ribeirões do Gama e Cabeça de Veado. Possui importante participação na manutenção da qualidade e quantidade da água que drena na Bacia do Paranoá, protegendo Tributários do Ribeirão do Gama, como córregos, nascentes, grotas e alagados.

Portanto, em toda sua extensão **é expressamente Proibido:**

- **Caçar ou pescar;**
- **Cortar ou retirar árvores, plantas ornamentais, medicinais, etc;**
- **Ter acesso aos mananciais (represas, nascentes, córregos, ribeirões, cachoeiras, etc);**
- **Retirar frutas, mudas ou capturar animais;**

Ademais, por questões de segurança, qualquer movimentação no âmbito da FAL deverá ser comunicada à Central, localizada na sede.

José Mauro S. Diogo
Diretor

FAZENDA ÁGUA LIMPA - FAL
NÚCLEO RURAL VARGEM BONITA
CAIXA POSTAL 07
CEP: 71.750-994
BRASÍLIA - DF

FONE/FAX: (061) 3380-2549/3380-3169
E-mail: falunb@unb.br

ANEXO 4

Governo do Distrito Federal - GDF
Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Jardim Botânico de Brasília – JBB

AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA 005/2014_ Renovação _1_2015

Responsável: Rodrigo Gurgel Gonçalves

Equipe: Rodrigo Gurgel Gonçalves RG1749898 SSP DF; Aline Machado Rapello do Nascimento, RG 178979 SSP DF; Grégoire Saint Gal de Pons, RG: 366989; Marcos Takashi Obara, RG: 25469831-1; Tâmela Stéfany Lopes Silva, RG: 3.088.448 ssp/df; Jadson José Gomes da Silva, RG: 1.374.998 df; Rubens Geraldo de Souza, RG:1.284.787 df; Renê Cunha de Castro, RG:2.229.569 ssp/df; Saemis Ferreira de Sousa, RG:3073374 ssp/df; Natália de Macedo Fiuza, RG:2.871.282 df; Douglas de Almeida Rocha, RG:2244437; Andrey José de Andrade, RG: 9163430 SSP MG; Ana Izabel Passarella Teixeira, RG: 2267778 SSPDF, João Lucas Magner Lourenço, RG: 2.956.378 SSP/DF; Paula Galvão Teixeira; RG: 8.932.696 SSP/MG.

Projeto: Efeitos da fragmentação de habitats sobre a infecção natural de vetores e reservatórios de *Leishmania* spp. no Distrito Federal, Brasil.

Instituições: Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores/ Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília.

Observação: Levantamentos iniciam às 06 da manhã e encerram 22h, durante a semana. As atividades incluem montagem de mini laboratório dentro da Estação Ecológica, junto à área de estudo Não está autorizado o pernoite dentro da Estação aos finais de semana.

Validade: 30/08/2015

A equipe está isenta de pagamento de taxa de visitação pública.

JBB

NORMAS DE CONDUTA

1. As pesquisas deverão ser realizadas de segunda a sexta-feira no horário de 8h30 às 17h30, exceto nos casos específicos que necessitem de autorização especial.
2. Não é permitido perseguir, caçar, pescar ou capturar animais da fauna silvestre nas dependências do JBB e EEJJ.
3. Estudos e pesquisas que, por sua natureza, considerem imprescindíveis quaisquer desses procedimentos, necessariamente, deverão fazer menção no corpo do projeto apresentado para avaliação e autorização por parte do Diretor do JBB, devendo também estar autorizado pelo IBAMA.
4. A extração de madeira, coleta de plantas, frutos, sementes, ou qualquer tipo de material botânico nas dependências do JBB e EEJBB apenas será possível mediante autorização expressa da Direção do JBB, nos casos permitidos em lei.
5. Não é permitida a deposição de entulhos ou lixo, de qualquer natureza, nas dependências do JBB e EEJBB, e o material utilizado na pesquisa deverá ser retirado ao final do projeto.

6. Não é permitida a entrada e circulação de animais domésticos dentro das dependências do JBB e EEJBB.
7. A circulação de pessoas nas dependências do JBB fora do horário de serviço, somente será admitida nas condições previstas na lei nº 9 985/2000, em situação de emergência, ou quando expressamente autorizado pela Diretoria.
8. A velocidade máxima permitida em circulação nas vias internas do JBB está limitada a 40km/h. A utilização dos acessos especiais às áreas do JBB e EEJBB será permitida somente nos casos de necessidade de serviços, situações de emergências ou pesquisa mediante a autorização da unidade responsável pela fiscalização ou pela direção do JBB
9. Não é permitido acender fogueiras ou provocar qualquer tipo de combustão na área do JBB e EEJBB.
10. Para fins desta norma, a área da EEJBB está classificada como de uso restrito, visando a preservação da natureza e a realização de pesquisa científica (Decreto nº 14.422/92; alterado pelo Decreto nº 17.277/96).
11. Intervenções nos ecossistemas presentes na área da EEJBB serão admitidas somente nos casos previstos na legislação específica.
12. Ao pesquisador cadastrado e autorizado a realizar a atividade de pesquisa, é permitido o acesso às áreas de uso restrito, respeitadas a legislação ambiental e as condições impostas na autorização de pesquisa.

Os casos omissos serão analisados pela Diretoria. Fonte: Ordem de serviço nº 47 de 17 de outubro de 2003.

Orientações Gerais:
Manter as cancelas fechadas;
Não ultrapassar a velocidade permitida de 40 km/h na área do Jardim e Estação Ecológica;
Para sua segurança registre sua estrada na portaria e deixe um telefone de contato para qualquer eventualidade;
Comunique a direção ou a fiscalização do JBB qualquer ocorrência de atitude ou evento suspeito que identificar (animais mortos, matilha de cães, lançamento de lixo, ciclistas, queima de podas nas propriedades vizinhas, etc);
Trazer uma foto 3x4 para facilitar sua identificação.
Verifique a data de vencimento de sua autorização para não ser abordado pela fiscalização
Ao finalizar seus experimentos retire todo o material, sinalização e equipamento utilizado em seus estudos.