



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM CAPIVARAS
(*Hydrochoerus hydrochaeris*) DE VIDA LIVRE DO DISTRITO FEDERAL**

GEORGE MAGNO SOUSA DO REGO

Brasília – DF
Fevereiro de 2020

GEORGE MAGNO SOUSA DO REGO

Pesquisa de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Orientadora: Prof. Dr.^a Giane Regina Paludo

PUBLICAÇÃO 221/2020

Brasília – DF
Fevereiro de 2020

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

REGO, G.M.S. **Pesquisa de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019 61p.

Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

REGO, G.M.S. **Pesquisa de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2019, 78p

Dissertação (Mestrado em ciências animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020.

1. *Tripanossoma* sp. 2. Capivaras. 3. RIFI. 4. PCR. 5. Carrapatos

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REGO, George Magno Sousa do

Título: Pesquisa de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Data 21/02/2020

Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Giane Regina Paludo

Presidente/Orientadora

PPGCA/UnB



Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro

Membro Titular

PPGCA/UnB



Prof.^a Dr.^a Luciana Hagström-Bex

Membro Titular

FEF/UnB

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo carinho, amor e cuidado.

À minha família, que sempre esteve comigo.

A memória de Olga Maciel, pelo exemplo de amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que Ele tem feito e por tudo o que Ele ainda fará, por que sempre me tem dado o melhor, sou grato a Ele pela benção da aprovação na residência em Patologia Clínica na UnB e mais ainda, pela benção diária da vida.

Deixo aqui também registrado meu total reconhecimento à minha família, minha mãe Vanda, meu pai Magno, meus irmãos Felipe e Lucas que sempre estiveram comigo, pois sem seu apoio seria impossível chegar até aqui.

A Murilo o meu agradecimento por ser minha rocha em todos os momentos nessa minha caminhada.

Respeito e admiro a Prof.^a Giane Regina Paludo que aceitou me orientar, sem falar do incansável suporte e apoio dado durante o desenvolvimento do projeto.

A Paulo Mattos o meu agradecimento pela orientação nos manejos e durante todo o processo.

Agradeço de maneira especial aos Residentes Thais, Thalita, Jailsa a filha mais velha, Janaína, Stephanie e a Tia Thaís pelo suporte durante o processamento dos materiais.

A Ana Paula e Thamiris pelo apoio, amizade construída junto desses dois anos. Muito obrigado. A Adriana P. Furtado, Sandy Honorato, Izabelle Carvalho pela constante presença na minha vida.

Agradeço a Família Quadros, por me receberem em sua casa tão bem, e sempre estarem disponíveis para me ajudar.

Agradeço também à Marcela Scalon pelo auxílio no Laboratório de Biologia Molecular e também pela amizade.

Agradeço ao Jardim Zoológico de Brasília, na pessoa da Ana Raquel e Marisa pelo apoio e suporte para utilização dos ambientes do zoo.

Agradeço também ao LABZOO-CCZSP pelo apoio na realização das sorologias e pela disponibilidade em receber-me durante uma semana.

Agradeço também aos meus amigos e companheiros de manejo Jéssica, Camila, Luiz, Rafael, Júlia, Jussara, José Moreira e Letícia pelas experiências compartilhadas e amizade durante os manejos.

Sou grato também aos componentes da banca examinadora pela atenção e contribuição empregadas a esta dissertação

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
CAPÍTULO 1	10
1. Introdução.....	11
1.1. <i>Objetivo geral</i>	11
1.2. <i>Objetivos específicos</i>	11
2. Revisão de literatura	13
2.1. Biologia da capivara (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>).....	13
2.2. Família <i>Trypanosomatidae</i>	14
2.3. <i>Trypanosoma spp.</i>	16
2.3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.3.2. <i>Trypanosoma evansi</i>	21
2.3.3. <i>Trypanosoma brucei</i>	22
2.4. <i>Leishmania spp.</i>	23
2.5. Diagnóstico das doenças causadas por tripanossomatídeos	26
2.6. Carrapatos e família <i>Trypanosomatidae</i>	27
3. Referências bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT	44
1. Introdução.....	45
2. Materiais e métodos	46

3. Resultados	54
4. Discussão	60
5. Conclusão	63
6. Referências Bibliográficas	64
ANEXOS.....	70
Anexo A. Aprovação Comissão de Ética no Uso Animal	70
Anexo B. Protocolo de extração pelo método de isotiocianato de guanidina e fenol clorofórmio	71

RESUMO

Os tripanossomatídeos são uma família de diversos organismos caracterizados por possuírem um único axonema e cinetoplasto rico em DNA localizado na base do flagelo. Dos 13 gêneros reconhecidos, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são conhecidos por serem patogênicos aos humanos e animais e causarem um grupo de doenças negligenciadas. A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) assume papel importante na epidemiologia das mais diversas patologias de caráter zoonótico como a febre maculosa, leptospirose, salmonelose, leishmaniose e tripanossomíase. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de sangue total e carrapatos de capivaras de vida livre do Distrito Federal (DF) por meio de ensaios moleculares (cPCR) e sorológicos (reação de imunofluorescência indireta - RIFI) e analisar as possíveis alterações laboratoriais (hemograma e bioquímicos) decorrentes destas infecções. Das 57 amostras de sangue total testadas por meio da cPCR para o gene 24S α -rDNA, 39 (68,4%) foram positivas. Todas as amostras foram negativas para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na cPCR e na RIFI. Houve diferença significativa entre os grupos de animais infectados e não infectados para os níveis de aspartato aminotransferase (AST), número de hemácias e leucócitos totais. Dos 60 carrapatos testados, sete foram positivos para o gene 24S α -rDNA. Os resultados mostram que as capivaras de vida livre do DF estão infectadas por *Trypanosoma* sp. e bem como os carrapatos coletados, indicando que estes artrópodes podem, de alguma forma, participar como vetores de espécies de tripanossomatídeos nas populações de capivaras, e que estes animais não oferecem riscos à saúde pública quando se trata de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Palavras chave: 1. Tripanossomíases. 2. *Hydrochoerus hydrochaeris*. 3. Vetores artrópodes. 4. *Trypanosoma* sp.

ABSTRACT

Trypanosomatids are a family of diverse organisms characterized by having a single axoneme and kinetoplast rich in DNA located at the base of the flagellum. Of the 13 recognized genera, the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera are known to be pathogenic to humans and animals and to cause a group of neglected diseases. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) plays an important role in the epidemiology of the most diverse pathologies of a zoonotic character such as spotted fever, leptospirosis, salmonellosis, leishmaniasis and trypanosomiasis. Thus, the objectives of the present study were to evaluate the presence of agents of the Trypanosomatidae family in samples of whole blood and ticks of free-ranging capybaras in the Federal District (DF) through molecular (cPCR) and serological tests (indirect immunofluorescence reaction - RIFI) and analyze possible laboratory changes (blood count and biochemicals) resulting from these infections. Of the 57 whole blood samples tested using the cPCR for the 24S α -rDNA gene, 39 (68.4%) were positive. All samples were negative for *Leishmania* spp. and *T. cruzi* at cPCR and RIFI. There was a significant difference between the groups of infected and uninfected animals for the levels of aspartate aminotransferase (AST), the number of red blood cells and total leukocyte. Of the 60 ticks tested, seven were positive for the 24S α -rDNA gene. The results show that the free-ranging capybaras of the DF are infected with *Trypanosoma* sp. and as well as the collected ticks, indicating that these arthropods may, in some way, participate as vectors of trypanosomatid species in capybaras populations, and that these animals do not pose risks to public health when it comes to infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp.

Key words: 1. Trypanosomiasis. 2. *Hydrochoerus hydrochaeris*. 3. Arthropod vectors.
4. *Trypanosoma* sp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Principais classes morfológicas dos tripanossomatídeos. A. Formas morfológicas com o flagelo ligado lateralmente ao corpo celular. B. Formas morfológicas com flagelo livre (sem inserção lateral ao corpo celular). C. Forma amastigota, que não possui flagelo. D. Estruturas associadas com o flagelo (corpúsculo basal (CB), bolsa flagelar (BF), axonema (Ax) e bastão paraflagelar (BF). Parâmetros utilizados para classificar forma celular (Comprimento do corpo celular (CCC), comprimento do flagelo livre (CFG) distância posterior do núcleo (NP) e distância posterior do cinetoplasto). Fonte: Adaptado Wheeler; Gluenz; Gull (2013).....16
- Figura 2-** Classificação dos principais tripanossomas de mamíferos. A: Gênero; B: Subgênero; C: Espécie; D: Subespécie. Fonte: BAKER, 1983.....17
- Figura 3-** Ciclo *Trypanosoma cruzi*.
 Fonte: Adaptado <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acessado em 31/01/2020.....19
- Figura 4-** Ciclo de vida *Trypanosoma brucei*. Fonte: Adaptado de Büscher et al., 2017.....23
- Figura 5-** Ciclo de vida da leishmaniose visceral. Inseto vetor se alimenta de sangue infectado e formas amastigotas se transformam em promastigotas. No intestino médio se multiplicam e migram para a probóscide de onde é inoculada por vetor fêmea nos mamíferos. No sítio de inoculação, formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou outros fagócitos e se transformam em amastigotas que se multiplicam rompendo a célula infectada e infetam outras células. Fonte: Adaptado de <<https://upload.wikimedia.org/leishmania>>. Acessado em 01/02/2020.....26

CAPÍTULO 2

Figura 1. Georreferenciamento do ponto de colheita do Campo Experimental Fazenda Sucupira Lat:15° 55' 31" S, Lon:048° 02' 59" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....46

Figura 2. Georreferenciamento dos pontos de colheita da Fundação Zoológico de Brasília Ponto A: Lat:15° 50' 48" S, Long: 047° 56' 27" W; Ponto B: Lat:15° 51' 03" S, Lon: 047° 56' 17" W e Ponto C: Lat:15° 51' 00" S, Long: 047° 55' 57" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....47

Figura 3. Georreferenciamento do ponto de colheita da região do lago Paranoá-DF Lat:15° 47' 30" S, Long: 047° 47' 49" W; Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....47

Figura 4. A: Animais já condicionados a entrarem no brete. B: Administração de fármacos anestésicos via intramuscular em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Fonte: Arquivo pessoal.....48

Figura 5. Colheita de sangue de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) por venopunção da veia femoral. Fonte: Arquivo pessoal.....49

Figura 6- Resultado de ensaio de PCR em gel de eletroforese para Família Trypanosomatidae, utilizando oligonucleotídeos D75/D76. Fragmentos DNA amplificados em duplicata a partir da extração de sangue total. Poços 1/2- controles negativos; Poços 3 ao 12- amostras testadas; Poços 7 ao 12- amostras positivas (270pb). Poços 13/14- Controle positivo (T. cruzi). Poço 15- Ladder.....56

Figura 7 : Relação de amostras de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) positivos na PCR testadas para o gene 24Sα-rDNA utilizando os oligonucleotídeos D75/D76.....57

Figura 8. Resultado de ensaio de PCR em gel de eletroforese para Família Trypanosomatidae, utilizando oligonucleotídeos D75/D76. Fragmentos DNA amplificados em duplicata a partir da

extração carrapatos. Poços 1/2- controles negativos; Poços 3/4/5/6- amostras positivas; Poços 8/9- amostra negativa; Poço 10- controle positivo; Poços 12/13/14/15- vazios.....58

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

- Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para detecção de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e carrapatos do Distrito Federal.....53
- Tabela 2.** Valores obtidos no hemograma de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.....55
- Tabela 3.** Valores obtidos na bioquímica sérica de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.55
- Tabela 4.** Quantidade de carrapatos total de nas capivaras e utilizados nos ensaios de PCR de acordo com estágio, sexo e classificação taxonômica.....57
- Tabela 5.** Relação dos carrapatos, suas espécies e estágio de desenvolvimento relacionado com os animais de origem positivos na PCR para o gene 24S α -rDNA.....59
- Tabela 6.** Média e desvio padrão dos valores hematológicos dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR.....59
- Tabela 7.** Média e desvio padrão da bioquímica sérica dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosídeos
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FA – Fosfatase Alcalina
FAV - Faculdade de Agronomia e Veterinária
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GGT – Gamma-glutamilttransferase
mM – Milimol
pb – Pares de base
cPCR – Reação de Polimerase em Cadeia convencional
PCR – Reação de Polimerase em Cadeia
pMol – Picomol
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA – Ácido Ribonucleico
VCM – Volume Corpuscular Médio
VG – Volume Globular
°C – Graus Celsius de Temperatura
µL – Microlitros
% - Porcentagem

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução

Os animais silvestres são fontes de diversas e importantes doenças de caráter zoonótico. Assim, entender os fatores que levam a transmissão de doenças a partir da vida silvestre, bem como monitorar a saúde de espécies antropizadas, como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), é primordial, uma vez que o contato íntimo entre homem-animal aumenta o risco à vida humana (THOMPSON, 2013; CHIACCHIO et al., 2014).

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é o maior roedor conhecido, pertencente à subordem Caviomorphae, família Hydrochoridae e subfamília Cavioidae. Está presente em quase toda a América Latina, ocorrendo desde a Venezuela até a Argentina, com exceção do Chile, único território da América do Sul em que não há ocorrência de capivaras (MOREIRA et al., 2013a).

Este animal assume papel importante na epidemiologia das mais diversas patologias de caráter zoonótico como a febre maculosa, a leptospirose, a salmonelose, as leishmanioses e as tripanossomíases (FONSECA; ESTON, 2007; VALADAS et al., 2010; CHIACCHIO et al., 2014; EBERHARDT et al., 2014b; RICHINI-PEREIRA et al., 2014; DE ALBUQUERQUE et al., 2017; COSTA et al., 2019; FARIKOSKI et al., 2019; LUZ et al., 2019a).

Os tripanossomatídeos são protozoários pertencentes ao filo Euglenozoa e classe Kinetoplastea e podem parasitar uma gama de organismos, dentre estes, os mamíferos. As espécies de tripanossomatídeos com importância médica pertencem ao gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* e são responsáveis por patologias como Leishmaniose e doença de Chagas, respectivamente (HOARE, 1966; VOTÝPKA et al., 2015; CAVALIER-SMITH, 2016).

No Distrito Federal (DF), diversos grupos de capivaras coexistem com humanos em ambientes recreativos e esse relacionamento íntimo pode favorecer a transmissão de doenças de cunho zoonótico. Assim, estes animais tem potencial para serem reservatórios das mais diversas zoonoses representando risco à saúde humana.

1.1. Objetivo geral

Avaliar presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

1.2. Objetivos específicos

-Realizar detecção de tripanossomatídeos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR).

- Realizar prova sorológica para *T. cruzi* e *Leishmania* spp. e determinar soroprevalência.
- Relacionar possíveis alterações laboratoriais nos animais positivos para os agentes do estudo.
- Detectar presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em carrapatos coletados nos animais amostrados.

2. Revisão de literatura

2.1. Biologia da capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é o maior roedor conhecido, pertencente à subordem Caviomorphae, família Hydrochoridae e subfamília Cavioidae. Está presente em quase toda a América Latina, ocorrendo desde a Venezuela até a Argentina, com exceção do Chile, único território da América do Sul em que não há ocorrência de capivaras (MOREIRA et al., 2013a).

Indivíduos desta espécie são herbívoros semiaquáticos que costumam pastar sempre próximos à corpos de água e podem chegar a 70kg. Os mesmos são providos de adaptações fisiológicas e morfológicas que permitem a obtenção de energia mesmo quando alimento disponível é rico em fibras e de baixo teor nutricional. Por ser um herbívoro monogástrico, o ceco é bem desenvolvido e é colonizado por microrganismos (protozoários, bactérias celulolíticas e não celulolíticas) que desempenham papel importante na fermentação anaeróbica de alimento (MONES; OJASTI, 1986; FERRAZ et al., 2003; BARRETO; QUINTANA, 2013). Assim como os coelhos, a capivara também produz dois tipos de fezes, uma de coloração verde oliva, de formato ovalado e individualizada em *pellets* e um segundo tipo de fezes pastosas e mais claras que são ingeridas (cecofagia). A cecofagia é um mecanismo de aproveitamento de proteína advindo dos microrganismos usados na fermentação da fibra vegetal, principalmente em períodos de seca, em que há diminuição da oferta e qualidade dos alimentos. Este comportamento é observado logo pela manhã, os animais ingerem fezes produzidas na tarde/noite anterior (BORGES; DOMINGUEZ-BELLO; HERRERA, 1996; MENDES et al., 2000; FERREIRA et al., 2012).

Quanto à escolha dos alimentos, a capivara se mostra um animal seletivo. Durante o período chuvoso, por exemplo, em há aumento da oferta e da qualidade de alimento disponível, ingerem aquele que tenha maior qualidade nutricional em termos de proteína e fibras (BARRETO; HERRERA, 1998). Entretanto, estes animais apresentam grande plasticidade alimentar, podendo se alimentar de milho, arroz, feijão, cana-de-açúcar e outros, fato este que facilita a adaptação em ambientes antropizados (MOREIRA et al., 2013b).

A capivara é um animal sociável e vive em grupos coesos que podem variar de dois a mais de 50 indivíduos. A estrutura social é marcada por dominância e hierarquia, composto por um macho dominante, diversas fêmeas e seus filhotes, bem como os machos subordinados e

animais satélites. Outra característica inerente ao comportamento social entre fêmeas-filhotes é o cuidado aloparental, no qual forma-se um sistema de creche, observado principalmente no comportamento de amamentação (MACDONALD, 1981; BARRETO; HERRERA, 1998; SIQUEIRA et al., 2000).

Apesar de ser uma espécie que não possui dimorfismo sexual, pois os órgãos genitais são muito semelhantes externamente entre os sexos, o tamanho da glândula nasal auxilia nesta diferenciação, uma vez que machos normalmente possuem uma glândula nasal mais proeminente quando comparado as fêmeas. As fêmeas de vida livre atingem maturidade entre 6 e 12 meses de idade, seu estro se repete a cada 7,5 dias com período de receptividade ao macho durando 8 horas. A gestação dura em média 150 dias com uma taxa de fertilidade de 6 filhotes/fêmea/ano. Essas características fazem da capivara uma espécie com alta prolificidade e com potencial para se tornarem reservatórios eficientes de vários patógenos (MOREIRA; MACDONALD, 1996; MIGLINO et al., 2013; PAULA; WALKER, 2013).

A baixa pressão de caça em conjunto com a dieta ampla das capivaras e a alta capacidade de reprodução, modificam a dinâmica populacional destes indivíduos favorecendo, assim, a permanência e adaptação destes animais em ambientes antrópicos, nos quais assumem papéis importantes na epidemiologia das mais diversas patologias de caráter zoonótico como da febre maculosa, leptospirose, salmonelose, leishmaniose e tripanossomíase (FONSECA; ESTON, 2007; VALADAS et al., 2010; CHIACCHIO et al., 2014; EBERHARDT et al., 2014b; RICHINI-PEREIRA et al., 2014; DE ALBUQUERQUE et al., 2017; COSTA et al., 2019; FARIKOSKI et al., 2019; LUZ et al., 2019a).

2.2. Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos são protozoários pertencentes ao filo Euglenozoa e classe Kinetoplastea e podem parasitar uma gama de organismos, dentre estes, os mamíferos. Dentro da família Trypanosomatidae temos os seguintes gêneros: *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Wallacemonas*, *Blechomonas*, *Angomonas*, *Strigomonas*, and *Kentomonas*. Contudo, somente *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum* acometem mamíferos (HOARE, 1972; LUKEŠ et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2014; SADLOVA et al., 2019).

No que diz respeito ao número de hospedeiros, o ciclo da família *Trypanosomatidae* pode ser monoxeno ou dioxeno. A maioria das espécies desta família possuem ciclo monoxeno

(somente um hospedeiro) e infectam principalmente invertebrados. Já as espécies que possuem ciclo díoxeno, como *Leishmania* e *Trypanosoma*, são capazes de infectar dois hospedeiros, tanto insetos quanto vertebrados, e são tradicionalmente transmitidos por um inseto vetor (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013; LUKEŠ et al., 2018). O ciclo de vida destes protozoários possui particularidades, em que os mesmos, seja na fase proliferativa ou de transmissão, passam por adaptações morfológicas e bioquímicas ao ambiente dentro do organismo do hospedeiro em que se encontram (fase proliferativa) ou uma espécie de pré-adaptação ao próximo ambiente do hospedeiro ou durante a transmissão (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

A classificação morfológica dos tripanossomatídeos é baseada na posição e profundidade do bolso flagelar, extensão do flagelo e fixação lateral do flagelo ao corpo da célula. Hoare e colaboradores (1966) descreveram seis estágios: amastigota, coanomastigota, promastigota, opistomastigota, epimastigota e tripomastigota. Contudo, Wheeler e colaboradores (2013) propuseram uma classificação em superclasses que não só considera as diversas transições morfológicas sofridas por esses protozoários durante seu ciclo de vida, mas também uma perspectiva mais biológica, baseada no estudo filogenético dos tripanossomatídeos, grupos estes que receberam o nome de “juxtaform” e “liberform”. No primeiro estão inclusos as formas ou estágios que possuem um flagelo ligado lateralmente, como tripomastigotas e epimastigotas. O segundo grupo é formado por aqueles que possuem flagelos livres sem ligação lateral e incluem opistomastigota, coanomastigota e promastigota. A forma amastigota é um morfotipo comum às duas superclasses (Figura 1) (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

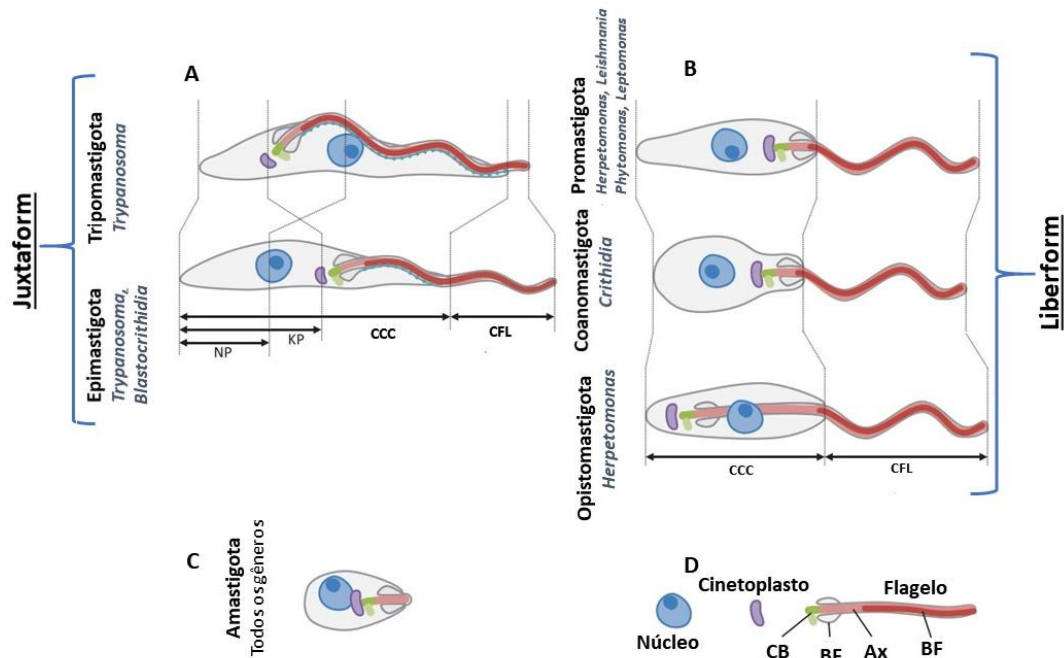


Figura 1- Principais classes morfológicas dos tripanossomatídeos. A. Formas morfológicas com o flagelo ligado lateralmente ao corpo celular. B. Formas morfológicas com flagelo livre (sem inserção lateral ao corpo celular). C. Forma amastigota, que não possui flagelo. D. Estruturas associadas com o flagelo (corpúsculo basal [CB], bolsa flagelar [BF], axonema [Ax] e bastão paraflagelar [BF]). Parâmetros utilizados para classificar a forma celular (Comprimento do corpo celular [CCC], comprimento do flagelo livre [CFG] distância posterior do núcleo [NP] e distância posterior do cinetoplasto [(KP)]. Fonte: Adaptado de Wheeler; Gluenz; Gull (2013).

2.3. *Trypanosoma* spp.

Muitas são as espécies de *Trypanosoma* que têm importância tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Dentre elas, as espécies que mais se destacam são as *T. cruzi* e *T. brucei* por causarem a doença de Chagas e doença do sono, respectivamente. Baseado no modo de transmissão, as espécies de *Trypanosoma* são divididas em duas classes: estercoreária e salivária (Figura 2) (HOARE, 1972).

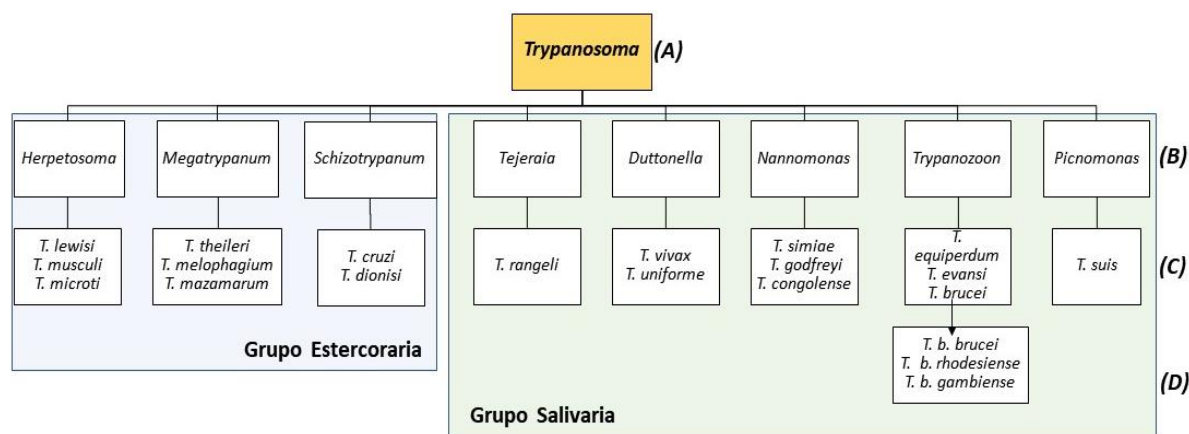


Figura 2- Classificação dos principais tripanossomas de mamíferos. A:Gênero; B: Subgênero; C: Espécie; D: Subespécie. Fonte: BAKER, 1983.

2.3.1. *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, teve sua primeira descrição feita por Carlos Chagas em 1909 e está entre as doenças tropicais negligenciadas. Já são quase sete milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo a América Latina o local com maior número de casos. Somente no Brasil, segundo dados de 2010, há mais de 1.156.821 casos (WHO, 2010; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

A migração humana para regiões não endêmicas tem tornado a doença de Chagas um problema global, uma vez que 94-96% dos imigrantes infectados com *T. cruzi* não são diagnosticados. Os Estados Unidos e Europa são os destinos mais comuns de imigrantes advindos da América Latina (área endêmica) e estima-se que 68.000 a 123.000 mil pessoas infectadas pelo *T. cruzi* vivam na Europa, especialmente na Espanha. Em países não endêmicos, o padrão de transmissão se altera, uma vez que não há a presença de vetor, assim, o transplante de órgãos de doadores infectados, transfusão de sangue e a transmissão vertical (mãe para filho) são as formas de transmissão envolvidas (BASILE et al., 2011; PINAZO; GASCON, 2015).

Dados publicados pelo Ministério da Saúde demonstram que em 2018 foram notificados 4.685 indivíduos suspeitos com doença de Chagas em fase aguda no Brasil e destes, 8,1% (380) foram confirmados. A maior proporção está concentrada na região Norte, responsável por 92,1% dos casos. No mesmo ano, três óbitos por doença de Chagas ocorreram, 2 no estado do Pará e outro em Tocantins. Quanto a forma de transmissão, dos 380 casos confirmados, 330 tiveram a forma oral como provável modo de transmissão (BRASIL, 2019).

O principal meio de transmissão em áreas endêmicas ocorre por meio de insetos hematófagos triatomíneos. Porém, em áreas não endêmicas, outros meios de transmissão ganham importância como transfusão de sangue, transplante de órgãos, contaminação oral, acidentes laboratoriais e transmissão vertical e sexual, esta última, comprovada somente em estudo utilizando roedores. Apesar de grande esforço, a real extensão de infecção pelo *T. cruzi*, seja em área endêmica ou não, não é totalmente conhecida, já que muitas infecções são assintomáticas e não diagnosticadas. Outro agravante, é que pacientes assintomáticos e animais infectados funcionam como reservatórios do agente, perpetuando a sua disseminação (RIBEIRO et al., 2016; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; GUARNER, 2019).

Na transmissão em que há o envolvimento do vetor, formas tripomastigotas metacíclicas que estão presentes nas excretas do inseto, penetram através do pequeno ferimento causado no momento da picada ou via membranas mucosas. Uma vez no organismo, o parasito invade órgãos como fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central e músculo cardíaco e esquelético, onde o protozoário se diferencia em amastigotas passando por multiplicação. Em seguida, quando o tecido está repleto por formas amastigotas, estas se transformam em tripomastigotas e rompem a célula invadindo tecidos adjacentes, sistema linfático e circulação sanguínea (CÓRDOVA; MAIOLO; CORTI, 2010; de DE OLIVEIRA et al., 2018). O triatomíneo, no momento do repasto sanguíneo em hospedeiro infectado pelo *T. cruzi*, ingere juntamente com o sangue formas tripomastigotas. No trato digestivo do vetor, as formas tripomastigotas se tornam epimastigotas, as quais se multiplicam retornando à forma tripomastigota metacíclica no terço final do trato digestivo, podendo reiniciar o ciclo em caso de novo repasto sanguíneo (Figura 3) (DE OLIVEIRA et al., 2018).

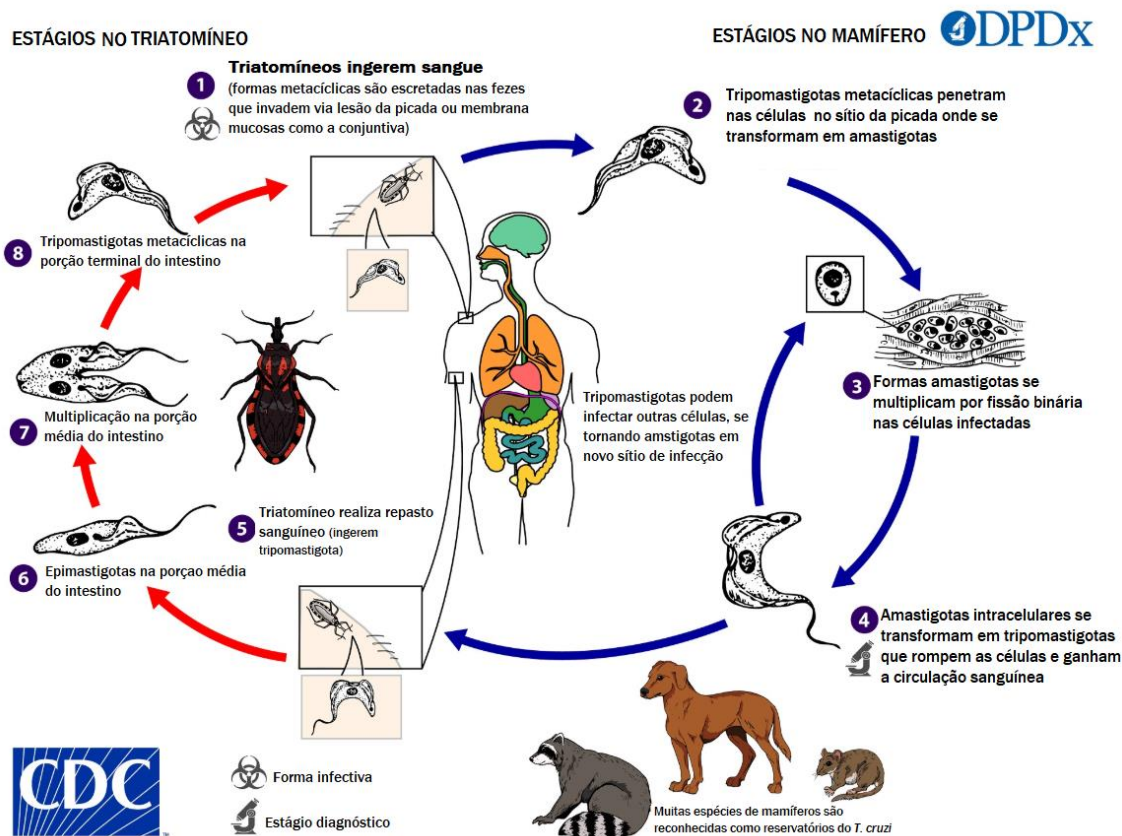


Figura 3- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acessado em 31/01/2020.

O comportamento do vetor, bem como dos hospedeiros, tem mudado ao longo dos anos devido a interferência do homem por meio da ocupação desordenada do meio ambiente. Esse comportamento humano, resulta na diminuição da oferta alimentar (hematofagia) para os triatomíneos, que se deslocam para novas áreas em busca de alimento, uma vez que a fauna nativa desapareceu. Assim, pela pressão da menor oferta alimentar, o triatomíneo passa a se alimentar das mais variadas espécies de mamíferos, que em sua maioria são sabidamente excelentes reservatórios do *T. cruzi*, principalmente marsupiais e roedores (OPS, 2009).

A invasão do homem no meio ambiente e o deslocamento do inseto vetor em busca de alimento, faz com que estes dividam o mesmo ambiente que humanos, e com isso a transmissão oral torna-se importante. Os vetores ao estarem em lugares em que há manuseio e processamento de alimentos, podem contaminar pessoas, seja pela ingestão do inseto, que acidentalmente foi triturado, ou pela ingestão das excretas em preparações de alimentos. Os principais alimentos associados a essa modalidade de transmissão são sucos *in natura* de açaí, bacaba e caldo de cana-de-açúcar. (OPS, 2009; DE SOUZA-LIMA et al., 2013). A transmissão por ingestão de carnes de caças cruas ou malcozidas, apesar de rara, também oferece riscos à

saúde humana. Após a ingestão, as formas tripomastigotas invadem o epitélio gástrico para então ganharem a circulação sanguínea e se multiplicarem nos tecidos como amastigotas (ABAD-FRANCH et al., 2009; RUEDA et al., 2014; SANGENIS et al., 2016)

A doença de Chagas possui duas apresentações clínicas, fase aguda e fase crônica. A fase aguda, na maioria dos casos, é assintomática e progride para fase crônica se não for tratada. A maioria dos infectados não apresentam sintomas ou envolvimento visceral cardíaco e digestivo e são chamados de casos indeterminados, porém são soro reagentes para *T. cruzi*. O prognóstico é considerado bom para estes pacientes que permanecem a vida toda na forma indeterminada da doença (DIAS, 1989). Entretanto, décadas após a infecção inicial, 20 a 30% dos pacientes apresentarão alteração cardíaca e ou digestiva (principalmente cardiopatia, megacólon e/ou megaesôfago) (BILDER; GOIN, 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; OLIVEIRA; SILVEIRA; LUQUETTI, 2019).

Animais domésticos e silvestres são sabidamente reservatórios para *T. cruzi*. Na literatura, já é bem relatado infecção pelo *T. cruzi* em cães e gatos, os quais oferecem risco a saúde humana. Infecção em outros animais domésticos como suínos, pequenos e grandes ruminantes e equinos também já foi relatada (GÜRTLER et al., 2007; BEZERRA et al., 2014; BRYAN et al., 2016).

Além das formas metacíclicas contidas nas fezes dos triatomíneos presentes em ninhos/abrigos de animais silvestres, há também transmissão ligada à cadeia trófica. Todas as ordens de mamíferos (Artiodactyla, Chiroptera, Primata, Carnivora, Rodentia, Cingulata, Pilosa e Didelphimorfia) estão envolvidas em menor ou maior grau na transmissão do *T. cruzi*. Jansen e colaboradores (2018) mostraram que no Brasil espécies de marsupiais (*Philander spp* e *Didelphis spp*), coati (*Nasua nasua*) e primaras (*Sapajus libidinosus* e *Leontopithecus rosalia*) podem funcionar como reservatórios do parasito (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2015).

Estudos realizados com mamíferos silvestres dos seis biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pampa e Pantanal) utilizando como métodos diagnósticos hemocultura e sorologia (imunofluorescência indireta), verificaram dentre os animais testados que o cerrado possui o menor número de mamíferos infectados enquanto que no bioma amazônico a taxa de infecção foi a maior (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

2.3.2. *Trypanosoma evansi*

O *T. evansi* foi a primeira espécie de tripanossoma patogênica para mamíferos a ser descrita na literatura. Nos animais domésticos ele causa a doença conhecida como surra, mal das cadeiras ou derrengueira, tendo grande importância econômica em países da África, Ásia e América do Sul.(HOARE, 1972; DESQUESNES et al., 2013a).

O *T. evansi* tem como característica genética singular a perda do maxicirculo cinetoplástico. Isso resulta na incapacidade do agente etiológico em realizar mudanças morfológicas, como ocorrem em outras espécies em que há transmissão cíclica. Por esta razão, sua transmissão ocorre de forma mecânica por insetos do gênero *Tabanus* e *Stomoxys*, o que leva alguns autores a optarem por descrever os insetos envolvidos na transmissão do *T. evansi* como inoculadores mecânicos (BRUN; HECKER; LUN, 1998).

A transmissão mecânica é um processo inespecífico que acontece quando o inseto se alimenta em hospedeiros infectados. No início do repasto sanguíneo, o inseto é interrompido por movimentos defensivos do hospedeiro e se desloca de um animal para outro, para iniciar um novo repasto. Contudo, o aparato bucal do inseto pode conter pequena quantidade de sangue oriundo do primeiro hospedeiro que ascendeu por capilaridade. Desta forma, o sangue residual do aparato bucal é inoculado no animal seguinte logo no início da alimentação quando o inseto inocula saliva contendo propriedades anticoagulantes. Outras formas de transmissão mecânica podem ocorrer por meio de uso de instrumentos cirúrgicos não estéreis, principalmente em campanhas de vacinação e também por contaminação de feridas (DESQUESNES et al., 2013b).

Carnívoros podem se infectar por via oral ao ingerirem uma presa infectada. Esta forma de infecção ocorre mais facilmente se houver lesões na mucosa oral. Cães e gatos residentes próximos a abatedouros podem se infectar ao ingerirem restos de carne, sangue e/ou vísceras de animais infectados (BAZOLLI et al., 2002; SIVAJOTHI; SUDHAKARA REDDY, 2018).

Morcegos hematófagos também tem papel importante na transmissão, principalmente para equídeos e bovinos. Estes vetores biológicos se infectam por via oral ao consumir sangue infectado e como hospedeiros podem morrer na fase inicial. Nos indivíduos que sobrevivem, o parasita se multiplica no sangue chegando às glândulas salivares caracterizando a infecção crônica nos morcegos. Nas colônias, morcegos contaminam uns aos outros por lambedura/mordedura e se tornam vetores permanentes auxiliando na manutenção do agente (BRUN; HECKER; LUN, 1998).

Na América Latina, estudos já reportaram infecção por *T. evansi* em equinos, bovinos, cães, capivaras, morcegos e quatis. A infecção em capivaras já foi relatada e, apesar de serem consideradas resistentes ao patógeno e não apresentarem sinais clínicos, estudo realizado com 60 capivaras na Argentina, encontraram diferenças entre os grupos de animais infectados e sadios na condição corpórea e também nos níveis séricos de albumina e gama-globulinas. Os animais infectados apresentaram menor condição corpórea e maiores níveis de gama-globulinas (EBERHARDT et al., 2017a; FILGUEIRAS et al., 2019).

2.3.3. *Trypanosoma brucei*

A doença do sono ou tripanossomíase africana humana (HAT), é uma doença humana transmitida por insetos hematófagos do gênero *Glossina* (BÜSCHER et al., 2017). Existem duas formas da doença a depender da subespécie envolvida. A forma de lenta progressão é causada pelo *T. brucei gambiense* e ocorre na África ocidental e central (HAT gambiense). Já a forma de rápida progressão, está relacionada a infecções pelo *T. brucei rhodesiense*, ocorrendo na África oriental e do Sul (HAT rhodesiense) (WHO, 2019).

Os vetores ocupam uma ampla área e, apesar disso, a HAT tem uma distribuição focal, o que dificulta o entendimento da complexa interação entre parasita, vetor, hospedeiro e ambiente. Normalmente, é uma doença rural, e o comportamento de realizar atividades de pesca, caça, busca de água em corpos d'água é um fator de risco, uma vez que, se os humanos se expõem ao vetor (WHO, 2019).

Ambos os sexos de moscas são capazes de transmitir tripanossomas. Elas se infectam quando ingerem sangue de um hospedeiro infectado. Ao se alimentarem, inoculam formas metacíclicas na pele do mamífero, e permanecem alguns dias até ganharem os linfonodos e, em seguida, a circulação sanguínea. No sangue passam por transformação alongando o seu corpo como forma de adaptação ao novo ambiente passando também por multiplicação (fissão binária) podendo invadir órgãos, incluindo o parênquima cerebral. Outras sofrem mudança do corpo celular e se tornam compactas, sendo ingeridas pelas moscas tsé-tsé quando estas se alimentam em humanos ou outros mamíferos infectados. No vetor, o *T. brucei* passa por diversas transformações ao longo do intestino até chegar na glândula salivar produzindo formas metacíclicas capazes de serem transmitidas para o próximo hospedeiro, reiniciando o ciclo (Figura 4) (HOLMES, 2013; BÜSCHER et al., 2017).

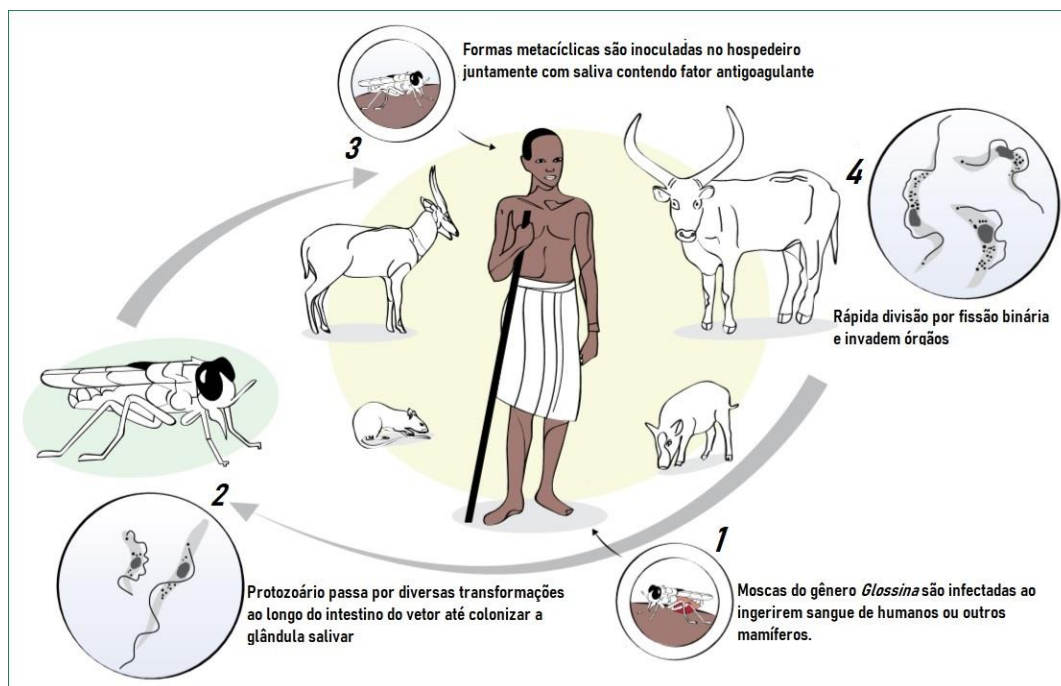


Figura 4- Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. Fonte: Adaptado de Büscher et al., 2017.

A subespécie *T. brucei brucei* que acomete animais e juntamente com *T. vivax* e *T. congolense* causam uma doença chamada de Nagana, que tem grande impacto na pecuária na África. Os seres humanos não são infectados por esses agentes devido a incapacidade deles em sobreviver ao fator lítico de tripanossoma, presentes no soro humano (KENNEDY, 2013).

2.4. *Leishmania* spp.

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitido aos mamíferos por insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, ocorrendo em 88 países de quatro continentes. Cerca de 1,6 milhões de novos casos humanos ocorrem anualmente (WHO, 2010; HANDLER et al., 2015).

Classicamente, as leishmanioses são classificadas pelo critério geográfico, sendo divididos em dois grupos: leishmanioses do velho mundo e do novo mundo. Contudo, classificações mais atuais têm sido fundamentadas no estudo filogenético das espécies (AKHOUNDI et al., 2016).

As espécies do novo mundo são agrupadas em dois complexos formados pelo complexo *L. mexicana* que engloba também a espécie *L. amazonenses*; e o complexo *L. braziliensis* englobando *L. panamensis* e *L. guyanensis*. Já no velho mundo, composta também por dois

complexos, temos complexo *L. major* que engloba *L. tropica*; e complexo *L. donovani* que engloba *L. infantum* (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012).

São seis as formas clínicas de apresentação das leishmanioses, definidas de acordo com localização do parasita no organismo do hospedeiro. São elas: visceral, dermal, cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e leishmaniose de mucosa. A forma mais comum é a leishmaniose visceral, que afeta principalmente indivíduos de países como Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Iran, Algéria, Tunísia, Brasil e Peru, os quais concentram mais de 90% dos casos (ALVAR et al., 2012).

Dentre as apresentações clínicas, a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais agressiva. É uma doença sistêmica causada por espécies do complexo *L. donovani* (*L. donovani sensu stricto*- responsável pela LV no subcontinente Indiano; *L. donovani sensu lato*- responsável pela LV no leste da África e *L. infantum* (*syn. L. Chagase*), responsável pela LV no litoral do Mediterrâneo, África, China e nas Américas, afetando um grande número de pessoas. Somente nas américas, 12 países são considerados endêmicos. Entre os anos de 2001 e 2018 foram registrados 63.331 novos casos de leishmaniose visceral nestes países. Só no ano de 2018 foram registrados 3.562 novos casos em toda América. Deste total, o Brasil reportou 3.466, correspondendo a 97% dos casos (OPAS, 2019; ARONSON; MAGILL, 2020). A LV é considerada um problema de saúde pública grave no território brasileiro devido a sua magnitude, expansão geográfica e controle complexo, sendo registrada em 21 estados (ANVERSA et al., 2018).

O Distrito Federal (DF) é considerado uma região endêmica para LV. No ano de 2019 foram notificados 107 casos em humanos no Brasil. Destes, 27 foram confirmados, sendo 11 residentes no DF e 16 residentes em outras unidades federativas. Um caso autóctone foi registrado na Asa Norte, com local de possível infecção o Jardim Botânico de Brasília e um caso oriundo da cidade de Guanambi (BA) veio a óbito (DISTRITO FEDERAL, 2019).

Ao redor do mundo, as espécies de reservatórios de LV são diferentes. Na Índia, o inseto vetor se alimenta estritamente de humanos e, por esse motivo, somente o homem é considerado reservatório. Já no Brasil, além dos humanos, cães e gatos são os principais reservatórios, ao passo que na África não se tem o completo entendimento de qual espécie funciona como reservatório, e estudos sugerem envolvimento humano e de roedores (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; ARONSON; MAGILL, 2020).

Nos vertebrados, a transmissão ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas pelo protozoário. Espécies de canídeos, marsupiais, roedores e morcegos

desempenham um papel importante de reservatório, atuando na manutenção do agente no meio silvestre (STAUCH et al., 2014; AKHOUNDI et al., 2017).

No meio urbano, os componentes da malha de transmissão são complexos. O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório do parasito causador da LV, tendo papel importante na transmissão, manutenção e epidemiologia da doença. Isso se deve principalmente à movimentação indiscriminada de cães, o estabelecimento de populações de flebotomíneos em regiões que eram livres da presença de inseto vetor, bem como a ineficiência do programa de controle. Estudo recente realizado em área periurbana no DF relatou uma taxa de infecção de 55% nos cães amostrados (DANTAS-TORRES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019).

A transmissão ocorre quando o vetor fêmea ingere sangue de mamíferos infectados que contém formas amastigotas. No intestino do vetor, as formas amastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas, que se multiplicam e migram para a porção anterior do trato digestivo do vetor possibilitando a transmissão durante o repasto sanguíneo no hospedeiro seguinte, reiniciando o ciclo (KAMHAWI, 2006) (Figura 5).

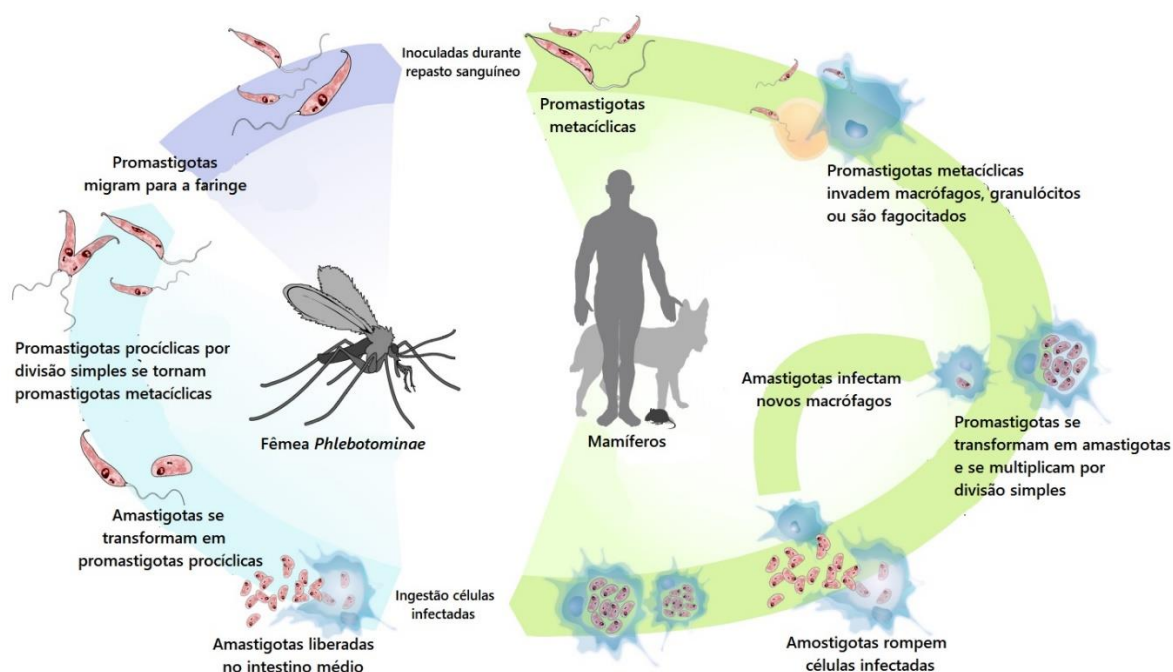


Figura 5- Ciclo de vida da leishmaniose visceral. Inseto vetor se alimenta de sangue infectado e formas amastigotas se transformam em promastigotas. No intestino médio se multiplicam e migram para a probóscide e é inoculada por vetor fêmea nos mamíferos. No sítio de inoculação, formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou outros fagócitos e se transformam em amastigotas que se multiplicam rompendo a célula infectada e infetam outras células. Fonte: Adaptado de <<https://upload.wikimedia.org/leishmania>>. Acessado em 01/02/2020.

2.5. Diagnóstico das doenças causadas por tripanossomatídeos

O diagnóstico das tripanossomíases pode ser realizado a partir de métodos parasitológicos, multiplicação, sorológicos e moleculares. Os métodos parasitológicos diretos têm boa eficiência na fase aguda, em que há alta parasitemia. Eles têm como princípio a visualização do parasita por meio de microscopia e são eles: lâmina úmida, esfregaço sanguíneo, método de Strout e microhematócrito. A lâmina úmida e esfregaço possuem sensibilidade de 34-85% e quando utilizado técnicas de concentração como a de microhematócrito e Strout, a sensibilidade pode ser superior a 95% (LUQUETTI; SCHIJMAN, 2019).

Os métodos de multiplicação são por vezes utilizados em baixas parasitemias para realizar testes farmacológicos em pacientes em fase crônica. Eles necessitam de equipamentos e mão de obra específicos que por vezes estão disponíveis apenas em instituições de pesquisa. As principais técnicas são hemocultura, xenodiagnóstico e inoculação animal (LUQUETTI; SCHIJMAN, 2019).

Os testes sorológicos mais comuns utilizados são imunofluorescência indireta (RIFI), hemaglutinação indireta e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que detectam anticorpos IgG anti *T. cruzi*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Organization for Health*), só são considerados reagentes amostras positivas que forem testadas em pelo menos duas técnicas sorológicas distintas (GUTIERREZ et al., 2004; FLORES-CHÁVEZ et al., 2010).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), método molecular de diagnóstico da tripanossomíase, é uma ferramenta importante por ter alta especificidade, quase 100%. Além disso, a PCR em tempo real possibilita a avaliação da carga parasitária. Para a fase crônica da doença a PCR tem sensibilidade que varia de 50% a 90%, e isso se deve a variações dos protocolos utilizados e região alvo do gene (BRASIL et al., 2010; MELO et al., 2015; SABINO et al., 2015; CURA et al., 2017).

A capacidade de amplo espectro, quando se trata de reservatórios envolvidos na transmissão da leishmaniose, faz com que o uso de técnicas diagnósticas eficientes sejam uma importante etapa no controle da doença. O diagnóstico da leishmaniose pode ser feito de maneira direta pela visualização do protozoário em aspirados de baço, medula óssea e linfonodos examinados por meio de microscopia óptica. Sua especificidade varia com o tipo de tecido. Esfregaços preparados a partir de baço, possuem maior sensibilidade (93,1 a 98,7%),

seguido dos esfregaços feitos de linfonodo e medula, cujas sensibilidades variam de 52 a 58% e 52 a 85% respectivamente. Este é um meio rápido e barato, porém invasivo que não permite diferenciar as espécies (HO; SOONG; LI, 1948; SIDDIG et al., 1988; AKHOUNDI et al., 2017).

A partir de aspirados de tecidos também pode ser feito isolamento em cultura, contudo, sua eficiência não passa de 70%. Além disso é um método que demanda um certo tempo e necessita de um aparato laboratorial. Já o xenodiagnóstico é um método que se baseia na exposição do vetor flebotomíneo competente a tecidos ou lesões possivelmente infectados. Após o repasto é realizada a pesquisa dos flagelados no intestino do inseto (SADLOVA et al., 2015).

Os testes sorológicos mais comuns utilizados são RIFI, hemaglutinação indireta e ELISA, que utilizam a detecção de anticorpos anti-leishmania em amostras de soro. Estes testes possuem alta sensibilidade podendo chegar a 90%, contudo, sua especificidade é baixa (ROMERO et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite amplificar o DNA ou RNA através de diversos ciclos *in vitro*. Por conseguir detectar o parasito, esta técnica se mostra superior a técnicas como o método direto e cultivo. Em amostra de sangue total, a PCR tem uma sensibilidade de 93% e especificidade de 95,6%. Além disso, permite quantificar o parasita e consequentemente avaliar a progressão da doença, bem como, estabelecer características como virulência e/ou resistência a drogas empregadas no tratamento da leishmaniose (ANTINORI et al., 2007; SCHONIAN; KUHL; MAURICIO, 2011; DE RUITER et al., 2014).

2.6. Carrapatos e família *Trypanosomatidae*

A maioria dos vetores conhecidos envolvidos no ciclo de transmissão de espécies de trypanosomas são invertebrados hematófagos da classe Insecta e Ordem Diptera, como no caso das moscas tsé-tsé, Hemiptera, representados pelos triatomíneos. Contudo, outros hematófagos são associados a transmissão de tripanossoma, como os carrapatos, principalmente com o advento de técnicas moleculares, que possibilitaram a detecção de DNA destes protozoários nesses artrópodes (MORZARIA et al., 1986; MAROTTA et al., 2018; KAULICH et al., 2019).

Da classe Ixodida, que possui 896 espécies de carrapatos, cerca de 10% estão implicados na transmissão de patógenos, principalmente relacionado aos do gênero *Rickettsia*. A transmissão de patógenos por meio do carrapato só é possível se o artrópode se alimentar em

hospedeiro vertebrado e adquirir o parasito durante o repasto sanguíneo, bem como, ter a capacidade de manter a infecção durante o seu ciclo de vida (transestadial, transovariana). Por fim, é necessário transferir o parasita para outro hospedeiro no momento do repasto sanguíneo (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; BARKER; REISEN, 2019; COSTA et al., 2019).

Espécies de trypanosoma já foram isoladas a partir de diferentes espécies de carrapatos em vários mamíferos hospedeiros. No estado do Rio de Janeiro, uma nova espécie de trypanosoma (*Trypanosoma amblyommi* sp. nov.) foi descrita a partir de carrapatos da espécie *A. brasiliense* que infestavam Queixadas (*Tayassu pecari*) (BARBOSA et al., 2017; MAROTTA et al., 2018).

As espécies de carrapatos que infestam capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) descritas na literatura são *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum* e um único relato de infestação por *A. triste* foi realizado. Não há estudos que verifiquem a presença de protozoários da Família *Trypanosomatidae* em *A. sculptum* e *A. dubitatum*, nem que verifiquem a importância deles na manutenção das espécies ou o provável envolvimento do artrópode no ciclo destes agentes (CANÇADO et al., 2017; LUZ et al., 2019b).

O estudo do carrapato como possível vetor de *Leishmania* se iniciou na década de 80, quando McKenzie (1984) concluiu que *Rhipicephalus sanguineus* era capaz de transmitir *Leishmania*. Desde então, estudos foram realizados buscando entender o envolvimento desse artrópode na transmissão de *Leishmania* (DANTAS-TORRES, 2011).

Formas amastigotas de *Leishmania* já foram identificadas no intestino, ovário e glândula salivar de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães sabidamente positivos para leishmaniose visceral canina (MEDEIROS-SILVA et al., 2015; VIOL et al., 2016). Dabaghmanesh e colaboradores (2016), por exemplo, demonstraram a ocorrência da transmissão transovariana e transestadial de *Leishmania infantum* em carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Apesar destas evidências, nenhum outro conseguiu comprovar que o *R. sanguineus* é capaz de transmitir *Leishmania* spp.

3. Referências bibliográficas

ABAD-FRANCH, F., MONTEIRO, F. A., JARAMILLO O., N., *et al.* "Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae)", **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 159–177, 2009. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.06.005. .

AKHOUNDI, M., DOWNING, T., VOTÝPKA, J., *et al.* **Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine.** [S.l.], Elsevier Ltd. , 1 out. 2017

AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., *et al.* **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Neglected Tropical Diseases.** [S.l.], Public Library of Science. , 3 mar. 2016

ALVAR, J., VÉLEZ, I. D., BERN, C., *et al.* "Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence", **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. Disponível em: www.plosone.org. Acesso em: 13 jan. 2020.

ANTINORI, S., CALATTINI, S., LONGHI, E., *et al.* "Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review ", **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 12, p. 1602–1610, 2007. DOI: 10.1086/518167. .

ANVERSA, L. s., TIBURCIO, M. G. S., RICHINI-PEREIRA, V. nia B., *et al.* "Human leishmaniasis in Brazil: A general review", **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018. DOI: 10.1590/1806-9282.64.03.281. .

ARONSON, N. E., MAGILL, A. J., "Leishmaniasis : General Principles". In: RYAN, E. T., HILL, D. R., SOLOMON, T., *et al.* (Org.), **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)**, 10th. ed. [S.l: s.n.], 2020. p. 776–798. DOI: 10.1016/B978-0-323-55512-8.00104-6. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323555128001046>.

ASFARAM, S., FAKHAR, M., TESHNIZI, S. H. "Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis", **Journal of Venomous**

Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 25, n. 0, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0012. .

BAKER, J. R. "The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1983. DOI: 10.1016/0035-9203(83)90208-0. .

BARBOSA, A. D., GOFTON, A. W., PAPARINI, A., *et al.* "Increased genetic diversity and prevalence of co-infection with Trypanosoma spp. in koalas (*Phascolarctos cinereus*) and their ticks identified using next-generation sequencing (NGS)", **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–20, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181279. .

BARKER, C. M., REISEN, W. K., "Epidemiology of Vector-Borne Diseases". In: MULLEN, G. R., DURDEN, L. A. (Org.), **Medical and Veterinary Entomology**, 3rd. ed. [S.l.], Elsevier Inc., 2019. p. 33–49. DOI: 10.1016/b978-0-12-814043-7.00004-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00004-2>.

BARRETO, G. R., HERRERA, E. A. "Foraging patterns of capybaras in a seasonally flooded savanna of Venezuela", **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 87–98, 1998. DOI: 10.1017/S0266467498000078. .

BARRETO, G. R., QUINTANA, R. D., "Foraging Strategies and Feeding Habits of Capybaras". In: MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., *et al.* (Org.), **Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species**, New York City, Springer, 2013. p. 83–96. DOI: 10.1007/978-1-4614-4000-0.

BASILE, L., JANSÀ, J. M., CARLIER, Y., *et al.* "Chagas disease in european countries: The challenge of a surveillance system", **Eurosurveillance**, v. 16, n. 37, p. 3, 2011. DOI: 10.2807/ese.16.37.19968-en. .

BAZOLLI, R. S., MARQUES, L. C., MACHADO, R. Z., *et al.* "TRANSMISSÃO ORAL DE Trypanosoma evansi EM CÃES (ORAL TRANSMISSION OF Trypanosoma evansi IN DOGS)", v. 18, p. 148–152, 2002. .

BEZERRA, C. M., DE GÓES CAVALCANTI, L. P., DE SOUZA, R. de C. M., *et al.* "Domestic, Peridomestic and wild hosts in the transmission of trypanosoma cruzi in the Caatinga area colonised by triatoma Brasiliensis", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.

109, n. 7, p. 887–898, 2014. DOI: 10.1590/0074-0276140048. .

BILDER, C. R., GOIN, J. C. "Gastrointestinal involvement in Chagas disease", **NeuroGastroLATAM Reviews**, v. 1, n. 4, p. 168–179, 2018. DOI: 10.24875/ngl.17000002. .

BORGES, P. A., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., HERRERA, E. A. **Digestive physiology of wild capybara**. **J Comp Physiol B**. [S.l.], Springer-Verlag, 1996.

BRASIL. "Sumário Panorama da doença de Chagas no Brasil", **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico**, v. 50, n. 36, p. 14, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/29/Boletim-epidemiologico-SVS-36-interativo.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2020.

BRASIL, P. E. A. A., DE CASTRO, L., HASSLOCHER-MORENO, A. M., *et al.* "ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis", **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010. DOI: 10.1186/1471-2334-10-337. .

BRUN, R., HECKER, H., LUN, Z. R. "Trypanosoma evansi and T. equiperdum: Distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review)", **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 95–107, 1998. DOI: 10.1016/S0304-4017(98)00146-0. .

BRYAN, L. K., HAMER, S. A., SHAW, S., *et al.* "Chagas disease in a Texan horse with neurologic deficits", **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 13–17, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.11.016. .

BÜSCHER, P., CECCHI, G., JAMONNEAU, V., *et al.* "Human African trypanosomiasis", **The Lancet**, v. 390, n. 10110, p. 2397–2409, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31510-6. .

CANÇADO, P. H. D., FACCINI, J. L. H., MOURÃO, G. de M., *et al.* "Estado atual dos carrapatos em relação a seus animais-hospedeiros domésticos e selvagens do Pantanal no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil", **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 107, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1590/1678-4766e2017110. .

CAVALIER-SMITH, T. "Higher classification and phylogeny of Euglenozoa", **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 250–276, 1 out. 2016. DOI: 10.1016/J.EJOP.2016.09.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0932473916300839?via%3Dihub>. Acesso em: 9 dez. 2019.

CHIACCHIO, R. G.-D., PRIOSTE, F. E. S., VANSTREELS, R. E. T., *et al.* "Health Evaluation and Survey of Zoonotic Pathogens in Free-Ranging Capybaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*)", **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 3, p. 496–504, 2014. DOI: 10.7589/2013-05-109. .

CÓRDOVA, E., MAIOLO, E., CORTI, M. "Neurological manifestations of Chagas ' disease", **Neurological Research**, v. 32, n. 3, p. 238–244, 2010. DOI: 10.1179/016164110X12644252260637. .

COSTA, F. B., GERARDI, M., BINDER, L. de C., *et al.* "Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil", **Journal of Medical Entomology**, v. 2018, n. X, p. 1–4, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjz141. .

CURA, C. I., RAMÍREZ, J. C., RODRÍGUEZ, M., *et al.* "Comparative Study and Analytical Verification of PCR Methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease", **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 5, p. 673–681, 2017. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.05.010>.

DABAGHMANESH, T., ASGARI, Q., MOEMENBELLAH-FARD, M. D., *et al.* "Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 408–413, 2016. DOI: 10.1093/trstmh/trw041. .

DANTAS-TORRES, F. "Ticks as vectors of *Leishmania* parasites", **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155–159, 2011. DOI: 10.1016/j.pt.2010.12.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.006>.

DANTAS-TORRES, F., MIRÓ, G., BOWMAN, D. D., *et al.* "Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change", **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, 2019. DOI: 10.1016/j.pt.2018.11.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>.

DE ALBUQUERQUE, N. F., MARTINS, G., MEDEIROS, L., *et al.* "The role of capybaras as carriers of leptospires in periurban and rural areas in the western Amazon", **Acta Tropica**, v. 169, p. 57–61, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.01.018. .

DE OLIVEIRA, A. B. B., CESAR, K., ALEVI, C., *et al.* "Review Article Parasite – Vector Interaction of Chagas Disease : A Mini-Review", **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 3, p. 653–655, 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0657. .

DE RUITER, C. M., VAN DER VEER, C., LEEFLANG, M. M. G., *et al.* "Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147–3155, 2014. DOI: 10.1128/JCM.00372-14. .

DE SOUZA-LIMA, R. de C., BARBOSA, M. das G. V., COURA, J. R., *et al.* "Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 510–514, 2013. DOI: 10.1590/0037-8682-1367-2013. .

DESQUESNES, M., DARGANTES, A., LAI, D. H., *et al.* "Trypanosoma evansi and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects", **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/321237. .

DESQUESNES, M., HOLZMULLER, P., LAI, D.-H., *et al.* "Trypanosoma evansi and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects ", **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–22, 2013. DOI: 10.1155/2013/194176. .

DIAS, J. C. P. "the Indeterminate Form of Human Chronic Chagas ' Disease", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 147–156, 1989. .

DISTRITO FEDERAL. "Comportamento epidemiológico das leishmanioses, no Distrito Federal-Informativo Epidemiológico.", v. 1, n. 4, p. 1–7, 2019. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/wp-conteudo/uploads/2018/05/Informativo-Epidemiológico-das-Leishmanioses-nº-4_2019_PUB_V.pdf.

EBERHARDT, A.T., MONJE, L. D., ZURVERA, D. A., *et al.* "Detection of Trypanosoma evansi infection in wild capybaras from Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays", **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 226–233, 28 maio 2014. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2014.02.043. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401714001307>. Acesso em: 9 dez. 2019.

EBERHARDT, Ayelen T., BELDOMENICO, P. M., MONJE, L. D., *et al.* "Biochemical and physiological parameters associated with trypanosoma evansi prevalence in wild capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)", **Canadian Journal of Zoology**, 2017. DOI: 10.1139/cjz-2016-0230. .

ECHEVERRIA, L. E., MORILLO, C. A. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infectious Disease Clinics of North America**. [S.l: s.n.]. , 2019

FARIKOSKI, I. O., MEDEIROS, L. S., CARVALHO, Y. K., *et al.* "The urban and rural capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as reservoir of Salmonella in the western Amazon, Brazil", **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 66–69, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5761. .

FERRAZ, K. M. P. M. D. B., PASCHOALETTO, LECHEVALIER, M.-A., *et al.* **DAMAGE CAUSED BY CAPYBARAS IN A CORN FIELD. Scientia Agricola**, v. [S.l: s.n.], 2003.

FERREIRA, D. N., MENDES, A., LUIZ, S., *et al.* **Nutritional value of some feedstuffs used in the diet of captive capybaras**. . [S.l: s.n.], 2012. Disponível em: www.sbz.org.br. Acesso em: 28 jan. 2020.

FILGUEIRAS, A., BARROS, J. H. da S., XAVIER, S. C. C., *et al.* "Natural Trypanosoma (Trypanozoon) evansi (Steel, 1885) infection among mammals from Brazilian Amazon", **Acta Tropica**, v. 190, p. 92–98, 1 fev. 2019. DOI: 10.1016/J.ACTATROPICA.2018.11.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18309653>. Acesso em: 9 dez. 2019.

FLORES-CHÁVEZ, M., CRUZ, I., RODRÍGUEZ, M., *et al.* "Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España", **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 5, p. 284–293, 2010. DOI: 10.1016/j.eimc.2009.07.005. .

FONSECA, H. P., ESTON, R. D. M. "Biologia e manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Parque Estadual Alberto Löfren, São Paulo, Brasil", **Revista do Instituto Florestal**, v. v. 19, n. 1, p. 55–64, 2007. Disponível em: [http://www.conhecer.org.br/download/CONTENCAO E CAPTURA DE ANIMAIS SELVAGENS/LEITURA ANEXA 1.pdf](http://www.conhecer.org.br/download/CONTENCAO_E_CAPTURA_DE_ANIMAIS_SELVAGENS/LEITURA_ANEXA_1.pdf).

GUARNER, J. **Chagas disease as example of a reemerging parasite. Seminars in Diagnostic Pathology.** [S.l.], W.B. Saunders. , 1 maio 2019

GÜRTLER, R. E., CECERE, M. C., LAURICELLA, M. A., *et al.* "Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina", **Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 69–82, 2007. DOI: 10.1017/S0031182006001259. .

GUTIERREZ, R., ANGULO, V. M., TARAZONA, Z., *et al.* "Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area", **Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 439–444, 2004. DOI: 10.1017/S0031182004005785. .

HANDLER, M. Z., PATEL, P. A., KAPILA, R., *et al.* "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management", **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015. DOI: 10.1016/j.jaad.2014.09.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>.

HO, E. A., SOONG, T. H., LI, Y. "Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 5, p. 629–636, 1948. DOI: 10.1016/S0035-9203(48)90458-1. .

HOARE, Cecil A., "The classification of mammalian trypanosomes". **Ergebnisse der Mikrobiologie Immunitätsforschung und Experimentellen Therapie**, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1966. p. 43–57. DOI: 10.1007/978-3-662-38353-7_3. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-38353-7_3. Acesso em: 3 dez. 2019.

HOARE, Cecil Arthur. "The trypanosomes of mammals : a zoological monograph", **Oxford : Blackwell Scientific Publications**, v. 2, n. July 1971, p. 1971, 1972. .

HOLMES, P. "Tsetse-transmitted trypanosomes - Their biology, disease impact and control", **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. SUPPL.1, p. S11–S14, 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2012.07.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.014>.

JANSEN, A. M., XAVIER, S. C. C., ROQUE, A. L. R. "The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment", **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.07.018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>.

JANSEN, A. M., XAVIER, S. C. D. C., ROQUE, A. L. R. **Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. Parasites and Vectors.** [S.l.: s.n.], 2018

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. "The global importance of ticks", **Parasitology**, v. 129, n. SUPPL., 2004. DOI: 10.1017/S0031182004005967. .

KAMHAWI, S. "Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?", **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.06.012. .

KAULICH, Y., RIBEIRO, C. M., DE ALMEIDA VALIM, J. R., *et al.* "Transovarial transmission and finding of Trypanosoma rhipicephalis in the hemolymph of Rhipicephalus sanguineus sensu latoa", **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 41, p. 1–6, 2019. DOI: 10.29374/2527-2179.bjvm106819. .

KENNEDY, P. G. E. "Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)", **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70296-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X).

KOBETS, T., GREKOV, I., LIPOLDOVÁ, M. "Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment", **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1443–1474, 2012. .

LUKEŠ, J., BUTENKO, A., HASHIMI, H., *et al.* "Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree", **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 466–480, 1 jun. 2018. DOI: 10.1016/J.PT.2018.03.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492218300345>. Acesso em: 3 dez. 2019.

LUKEŠ, J., SKALICKÝ, T., TÝČ, J., *et al.* "Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates", **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, 2014. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.05.007. .

LUQUETTI, A. O., SCHIJMAN, G. A., "Diagnosis of Chagas Disease". In: ALTICHEH, J. M., FREILIJ, H. (Org.), **Chagas Diseases A clinical approach**, Birkhäuser ed. [S.l.], Springer Nature Switzerland AG, 2019. p. 141–158.

LUZ, H. R., COSTA, F. B., BENATTI, H. R., RAMOS, V. N., CAROLINA DE SERPA, M. A., *et al.* "Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever", 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007734. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>. Acesso em: 28 jan. 2020.

LUZ, H. R., COSTA, F. B., BENATTI, H. R., RAMOS, V. N., DE A. SERPA, M. C., *et al.* "Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007734, 6 set. 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007734. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007734>. Acesso em: 28 jan. 2020.

MACDONALD, D. W. "Dwindling resources and the social behaviour of Capybaras, (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Mammalia)", **Journal of Zoology**, v. 194, n. 3, p. 371–391, 1981. DOI: 10.1111/j.1469-7998.1981.tb04588.x. .

MAROTTA, C. R., DOS SANTOS, P. N., CORDEIRO, M. D., *et al.* "Trypanosoma amblyommi sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from Amblyomma brasiliense (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil", **Parasitology Open**, v. 4, 2018. DOI: 10.1017/pao.2018.6. .

MCKENZIE KK. **A study of the transmission of canine leishmaniasis by the tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille), and an ultrastructural comparison of the promastigotas.** 1984. Oklahoma State University, 1984.

MEDEIROS-SILVA, V., GURGEL-GONÇALVES, R., NITZ, N., *et al.* "Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) collected from naturally infected dogs", **BMC Veterinary Research**, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1186/s12917-015-0576-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0576-5>.

MELO, M. F., MOREIRA, O. C., TENÓRIO, P., *et al.* "Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients", **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0770-0. .

MENDES, A., NOGUEIRA, S. S. D. C., LAVORENTI, A., *et al.* "A note on the cecotrophy behavior in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*)", **Applied Animal Behaviour Science**, v. 66, n. 1–2, p. 161–167, 2000. DOI: 10.1016/S0168-1591(99)00080-5. .

MIGLINO, M. A., SANTOS, T. C., KANASHIRO, C., *et al.*, "Morphology and Reproductive

Physiology of Female Capybaras Maria". In: MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., *et al.* (Org.), **Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species**, New York City, Springer, 2013. p. 131–146. DOI: 10.1007/978-1-4614-4000-0.

MONES, A., OJASTI, J. "Hydrochoerus hydrochaeris", **Mammalian Species. American Society of Mammologists**, v. 264, p. 1–7, 1986. .

MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., *et al.* **Capybara: Biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. New York City, Springer, 2013a.

MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., *et al.*, "Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybara". **Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species**, [S.l.: s.n.], 2013b. p. 3–37. DOI: 10.1007/978-1-4614-4000-0.

MOREIRA, J. R., MACDONALD, D. W., "Capybara use and conservation in South America". In: TAYLOR, V. J., DUNSTONE, N. (Org.), **The Exploitation of Mammal Populations**, [S.l.], Springer, Dordrecht, 1996. p. 88–101. DOI: 10.1007/978-94-009-1525-1_7.

MORZARIA, S. ., LATIF, A. A., JONGEJAN, F., *et al.* "TRANSMISSION OF A TRYPANOSOMA SP. TO CATTLE BY THE TICK HYALOMMA ANA TOLICUM ANATOLICUM", **Veterinary Parasitology**, v. 19, p. 13–21, 1986. .

OLIVEIRA, Ê. C., SILVEIRA, A. B. M., LUQUETTI, A. O., "Gastrointestinal Chagas Disease". In: ALTICHEH, JAIME M., FREILIJ, H. (Org.), **Chagas Diseases A clinical approach**, [S.l.], Springer Nature Switzerland AG, 2019. v. 1. p. 243–264. DOI: 10.1038/465S3a.

OPAS. **Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas 2018. Informe de Leishmanioses**. Washington, DC, [s.n.], 2019. Disponível em: www.paho.org.

OPS. **GUIA PARA VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO, CONTROLE E MANEJO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS 2009. PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS**. Rio de Janeiro, [s.n.], 2009.

PAULA, T. A. R., WALKER, N. J., "Reproductive Morphology and Physiology of the Male Capybara". In: MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., *et al.* (Org.),

Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species, New York City, Springer, 2013. p. 107–129. DOI: 10.1007/978-1-4614-4000-0.

PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. "Chagas disease", **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. .

PINAZO, M.-J., GASCON, J. "The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health)", **Acta Tropica**, v. 151, p. 16–20, 1 nov. 2015. DOI: 10.1016/J.ACTATROPICA.2015.06.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X15300358?via%3Dihub>. Acesso em: 1 fev. 2020.

RIBEIRO, C. R., GONÇALVES, C. A., CRUZ, L. M., *et al.* "Prevalence of visceral canine leishmaniosis and co-infections in periurban region in the Federal district - Brazil", **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1590/1089-6891v20e-49589. .

RIBEIRO, M., NITZ, N., SANTANA, C., *et al.* "Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model", **Experimental Parasitology**, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.12.017. .

RICHINI-PEREIRA, V. B., MARSON, P. M., HAYASAKA, Y., *et al.* **Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil.** . [S.l: s.n.], 2014. Disponível em: <http://www.jvat.org/content/20/1/27>. Acesso em: 28 jan. 2020.

ROMERO, H. D., SILVA, L. D. A., SILVA-VERGARA, M. L., *et al.* "Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area", **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 27–33, 2009. .

RUEDA, K., TRUJILLO, J. E., CARRANZA, J. C., *et al.* "Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: A new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries", **Biomedica**, v. 34, n. 4, p. 631–641, 2014. DOI: 10.7705/biomedica.v34i4.2204. .

SABINO, E. C., RIBEIRO, A. L., LEE, T. H., *et al.* "Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity", **European Journal of Heart Failure**, v. 17, n. 4, p. 416–423, 2015. DOI: 10.1002/ejhf.220. .

SADLOVA, J., SEBLOVA, V., VOTYPKA, J., *et al.* "Xenodiagnosis of *Leishmania donovani*

in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model", **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 158, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0765-x. .

SADLOVA, J., VOJTKOVA, B., HRNCIROVA, K., *et al.* "Host competence of African rodents *Arvicanthis neumanni*, *A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania major*", 2019. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.01.004>. Acesso em: 17 jan. 2020.

SANGENIS, L. H. C., NIELEBOCK, M. A. P., DA SILVA SANTOS, C., *et al.* "Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: Revisão sistemática", **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 4, p. 803–811, 2016. DOI: 10.1590/1980-5497201600040010. .

SCHONIAN, G., KUHL, K., MAURICIO, I. L. "Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*", **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 405–425, 2011. DOI: 10.1017/S0031182010001538. .

SIDDIG, M., GHALIB, H., SHILLINGTON, D. C., *et al.* "Visceral leishmaniasis in the Sudan: Comparative parasitological methods of diagnosis", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 66–68, 1988. DOI: 10.1016/0035-9203(88)90265-9. .

SIQUEIRA, S., CUNHA NOGUEIRA, D. A., OTTA, E., *et al.* "Alloparental Behavior in the Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)", **Revista de Etologia**, v. 2, p. 17–21, 2000. Disponível em: http://www.etologiabrasil.org.br/media/upload/publicacoes_revista/vol2_1_17.pdf.

SIVAJOTHI, S., SUDHAKARA REDDY, B. "*Trypanosoma evansi* infection in a cat—a rare case", **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 115–116, 2018. DOI: 10.1007/s00580-017-2560-x. .

STAUCH, A., DUERR, H. P., PICADO, A., *et al.* "Model-Based Investigations of Different Vector-Related Intervention Strategies to Eliminate Visceral Leishmaniasis on the Indian Subcontinent", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002810. .

THOMPSON, R. C. A. "Parasite zoonoses and wildlife : One health , spillover and human activity", **INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY**, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.06.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>.

VALADAS, S., GENNARI, S. M., YAI, L. E. O., *et al.* "Prevalence of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from São Paulo State, Brazil", **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 521–524, 2010. DOI: 10.1645/GE-2368.1. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2368.1>.

VIOL, M. A., GUERRERO, F. D., DE OLIVEIRA, B. C. M., *et al.* "Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs", **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3479–3484, 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-5111-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5111-5>.

VOTÝPKA, J., D'AVILA-LEVY, C. M., GRELLIER, P., *et al.* "New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description", **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.06.015. .

VOTÝPKA, J., KOSTYGOV, A. Y., KRAEVA, N., *et al.* "Kentomonas gen. n., a New Genus of Endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n.", **Protist**, v. 165, n. 6, p. 825–838, 2014. DOI: 10.1016/j.protis.2014.09.002. .

WHEELER, R. J., GLUENZ, E., GULL, K. "The limits on trypanosomatid morphological diversity", **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 19 nov. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0079581. .

WHO. **WHO | Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on Neglected Tropical Diseases**. WHO. [S.l.], World Health Organization, 2010. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241564090/en/#.XjIYdXgyy8U.mendeley. Acesso em: 29 jan. 2020.

WHO. **WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis**. Licence: C ed. Geneva, World Health Organization, 2019. Disponível em: https://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/9789241550567/en/.

CAPÍTULO 2
PESQUISA DE AGENTES DA FAMÍLIA *Trypanosomatidae* EM
CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) DE VIDA LIVRE DO
DISTRITO FEDERAL

RESUMO

Os tripanossomatídeos são uma família de diversos organismos caracterizados por possuírem um único axonema e cinetoplasto rico em DNA localizado na base do flagelo. Dos 13 gêneros reconhecidos, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são conhecidos por serem patogênicos aos humanos e animais e causarem um grupo de doenças negligenciadas. A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) assume papel importante na epidemiologia das mais diversas patologias de caráter zoonótico como a febre maculosa, leptospirose, salmonelose, leishmaniose e tripanossomíase. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de sangue total e carrapatos de capivaras de vida livre do Distrito Federal (DF) por meio de ensaios moleculares (cPCR) e sorológicos (reação de imunofluorescência indireta - RIFI) e analisar as possíveis alterações laboratoriais (hemograma e bioquímicos) decorrentes destas infecções. Das 57 amostras de sangue total testadas por meio da cPCR para o gene 24S α -rDNA, 39 (68,4%) foram positivas. Todas as amostras foram negativas para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na cPCR e na RIFI. Houve diferença significativa entre os grupos de animais infectados e não infectados para os níveis de aspartato aminotransferase (AST), número de hemácias e leucócitos totais. Dos 60 carrapatos testados, sete foram positivos para o gene 24S α -rDNA. Os resultados mostram que as capivaras de vida livre do DF estão infectadas por *Trypanosoma* sp. e bem como os carrapatos coletados, indicando que estes artrópodes podem, de alguma forma, participar como vetores de espécies de tripanossomatídeos nas populações de capivaras, e que estes animais não oferecem riscos à saúde pública quando se trata de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Palavras chave: 1. Tripanossomíases. 2. *Hydrochoerus hydrochaeris*. 3. Vetores artrópodes. 4. *Trypanosoma* sp.

ABSTRACT

Trypanosomatids are a family of diverse organisms characterized by having a single axoneme and kinetoplast rich in DNA located at the base of the flagellum. Of the 13 recognized genera, the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera are known to be pathogenic to humans and animals and to cause a group of neglected diseases. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) plays an important role in the epidemiology of the most diverse pathologies of a zoonotic character such as spotted fever, leptospirosis, salmonellosis, leishmaniasis and trypanosomiasis. Thus, the objectives of the present study were to evaluate the presence of agents of the Trypanosomatidae family in samples of whole blood and ticks of free-ranging capybaras in the Federal District (DF) through molecular (cPCR) and serological tests (indirect immunofluorescence reaction - RIFI) and analyze possible laboratory changes (blood count and biochemicals) resulting from these infections. Of the 57 whole blood samples tested using the cPCR for the 24S α -rDNA gene, 39 (68.4%) were positive. All samples were negative for *Leishmania* spp. and *T. cruzi* at cPCR and RIFI. There was a significant difference between the groups of infected and uninfected animals for the levels of aspartate aminotransferase (AST), the number of red blood cells and total leukocyte. Of the 60 ticks tested, seven were positive for the 24S α -rDNA gene. The results show that the free-ranging capybaras of the DF are infected with *Trypanosoma* sp. and as well as the collected ticks, indicating that these arthropods may, in some way, participate as vectors of trypanosomatid species in capybaras populations, and that these animals do not pose risks to public health when it comes to infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp.

Key words: 1. Trypanosomiasis. 2. *Hydrochoerus hydrochaeris*. 3. Arthropod vectors. 4. *Trypanosoma* spp.

1. Introdução

As doenças causadas por parasitas que acometem tanto o homem quanto animais existem desde os primeiros relatos da humanidade, e até os dias de hoje são patógenos causadores de importantes enfermidades ao redor do mundo. Os tripanossomatídeos são uma família de organismos diversos caracterizados por possuírem um único axonema e cinetoplasto rico em DNA localizado na base do flagelo. Dos 13 gêneros reconhecidos, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* destacam-se por serem patogênicos aos humanos e animais e causarem um grupo de doenças negligenciadas (MCGHEE; COSGROVE, 1980; COX, 2002; WHO, 2012).

As tripanossomíases e as leishmanioses acometem uma gama de mamíferos e são encontradas no sangue e tecidos destes. Os insetos hematófagos possuem um papel crucial na sua transmissão (HOARE, 1972).

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é hospedeiro conhecido do *T. evansi*, enquanto poucos são os dados sobre infecção de capivaras por *T. cruzi*. Este animal assume papel importante na epidemiologia das mais diversas patologias de caráter zoonótico como a febre maculosa, a leptospirose, a salmonelose, as leishmanioses e as tripanossomíases (HERRERA et al., 2004; FONSECA; ESTON, 2007; VALADAS et al., 2010; CHIACCHIO et al., 2014; EBERHARDT et al., 2014b; RICHINI-PEREIRA et al., 2014; DE ALBUQUERQUE et al., 2017; COSTA et al., 2019; FARIKOSKI et al., 2019; LUZ et al., 2019a)

O diagnóstico das tripanossomíases realizado por meio da PCR já é bem descrito na literatura, sendo considerado um ótimo meio diagnóstico. Outras técnicas como o ELISA, a hemaglutinação indireta (HAI) e a RIFI também são indicadas no diagnóstico de tripanossomíase (DESQUESNES et al., 2013a).

Entender a real situação da complexa malha entre vetores e hospedeiros mamíferos é importante para a prevenção da transmissão dos tripanossomas e das leishmanias para humanos e animais, principalmente frente à constante mudança climática e sobreposição da vida urbana e silvestre. Por isso, o presente trabalho teve por objetivo investigar presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de sangue total e carrapatos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

2. Materiais e métodos

Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília registrado com o protocolo de nº 20/2019 e registrado no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade com o número 43798-1 (Anexos A).

Área de estudo

O estudo foi conduzido nas áreas de Fundação Jardim Zoológico de Brasília, Campo Experimental Fazenda Sucupira, pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e no Lago Paranoá próximo ao Palácio da Alvorada. (Figura 1, 2 e 3).



Figura 1. Georreferenciamento do ponto de colheita do Campo Experimental Fazenda Sucupira Lat:15° 55' 31" S, Lon:048° 02' 59" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.



Figura 2. Georreferenciamento dos pontos de colheita da Fundação Zoológica de Brasília Ponto A: Lat:15° 50' 48" S, Long: 047° 56' 27" W; Ponto B: Lat:15° 51' 03" S, Lon: 047° 56' 17" W e Ponto C: Lat:15° 51' 00" S, Long: 047° 55' 57" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.



Figura 3. Georreferenciamento do ponto de colheita da região do lago Paranoá-DF Lat:15° 47' 30" S, Long: 047° 47' 49" W; Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020

Captura e colheita de amostras

Os animais foram condicionados com utilização de ceva e apito por um período prévio de três meses até que estes entrassem nos bretes. Após este período de condicionamento, as capturas dos animais foram feitas com a utilização de bretes de contenção e cevas constituídas por legumes, bagaço de cana, cascas de mandioca e milho. Após a captura, os indivíduos foram

submetidos a contenção química via intramuscular, com utilização de zarabatana e dardo anestésico contendo uma associação de Cetamina (2,0 mg/kg) e Xilazina (0,5 mg/kg). Para acelerar o retorno anestésico foi utilizado cloreto de ioimbina (0,1 mg/kg). Os animais foram manejados individualmente, monitorados e liberados somente após a total recuperação de qualquer efeito provocado pelo fármaco dissociativo para mitigar risco de acidentes (Figuras 4A e B).

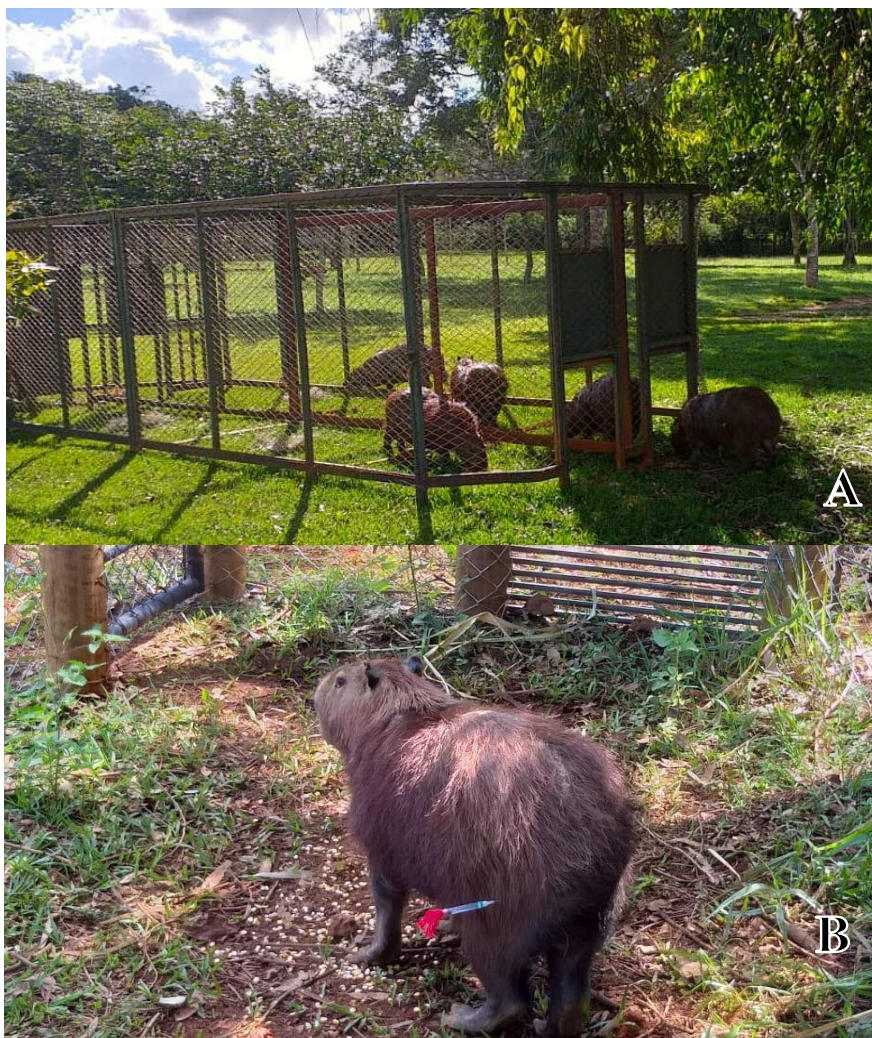


Figura 4. A: Animais já condicionados a entrarem no brete. B: Administração de fármacos anestésicos via intramuscular em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Fonte: Arquivo pessoal.

A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção da veia femoral em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e também em tubos secos para a obtenção de soro, ambos com capacidade para 4 mL e mantidas resfriadas entre 04 e 08°C até o processamento (Figura 5).

Além das amostras de sangue, foram coletados carrapatos das capivaras durante os manejos, por um período de 5 minutos por animal, os quais foram acondicionados em tubos cônicos do tipo falcon devidamente identificados e no laboratório foram acondicionados em frascos contendo álcool isopropílico para posterior identificação e realização dos ensaios moleculares.



Figura 5. Colheita de sangue de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) por venopunção da veia femoral. Fonte: Arquivo pessoal.

Análises hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue foram processadas e analisadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (UnB) em até duas horas após a colheita, buscando-se assim evitar alterações dos parâmetros hematológicos em decorrência do tempo de processamento.

Uma vez encaminhadas ao laboratório, foi determinado o número de eritrócitos ($/\mu\text{L}$) e leucócitos totais ($/\mu\text{L}$) manualmente com a utilização do hemocítômetro (câmara de Neubauer). Para contagem de eritrócitos foi preparada uma diluição de $10\mu\text{L}$ de sangue total em $1.990\mu\text{L}$ de líquido de Hayem com auxílio de pipetas automáticas e, uma vez preenchida a câmara, foram contados os eritrócitos contidos nos cinco quadrantes secundários do quadrante central e multiplicados por 10.000 (fator de conversão). Para determinação do número de leucócitos totais, o sangue total foi diluído com Líquido de Turk na diluição de 1:20 e contados nos quadrantes das extremidades da câmara sendo posteriormente multiplicados por 50 (fator de

conversão). Em ambas as contagens, após o preenchimento da câmara, foi respeitado o tempo de 5 minutos para completa sedimentação das células.

O volume globular (%) foi determinado através da centrifugação de um capilar preenchido com sangue total a 10.000 rpm durante 5 minutos e posterior leitura em tabela específica (GOLDENFARB et al., 1971). Já a concentração de hemoglobina (g/dL) foi realizada utilizando uma diluição de 10 μ L de sangue total em 2500 μ L de líquido de Drabkin. Após o preparo dessa solução, foi aguardado 5 minutos para a completa lise dos eritrócitos. Em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro semiautomático BIO 2000 (Bioplus®) utilizando comprimento de onda de 540nm acertando o zero com Drabkin.

Uma vez obtidos os valores das análises sanguíneas, foram obtidos os índices hematimétricos (VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; HCM: hemoglobina corpuscular média) através de cálculo padrão.

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e corados com panótico rápido (Laborclin®) para realização da contagem diferencial de leucócitos e estimativa manual de plaquetas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir da contagem de 100 leucócitos na objetiva de imersão (x100), já a estimativa manual de plaquetas foi calculada a partir do número de plaquetas visualizadas em 10 campos na objetiva de imersão e utilizando a seguinte fórmula $x = 2.000 \cdot y$, onde y é o número obtido da contagem das plaquetas contidas dos 10 campos de imersão (NOSANCHUK; CHANG; BENNETT, 1978; WEISER, 2012)

As amostras acondicionadas em tubos secos foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro e acondicionadas em microtubos. Uma alíquota foi utilizada para realização da determinação sérica da atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), quantificação de ureia, creatinina, proteínas totais e albumina utilizando o analisador automático Cobas C-111 (Roche Diagnostics®). A segunda alíquota foi armazenada a -20°C para realização das sorologias.

Ensaio parasitológicos

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e corados com panótico rápido (Laborclin®) para realização de pesquisa direta de hemoparasitas por meio de microscopia nas objetivas de 40X e 100X. Tubos de hematócitos após centrifugação foram utilizados para pesquisa de tripanossomatídeos com ajuda de microscópio na objetiva de 10x (WOO, 1969).

Foram também confeccionadas lâminas úmidas por gota espessa para pesquisa direta do parasito nas objetivas de 10X, 20X e 40X.

Ensaaios moleculares

A obtenção de DNA e os ensaios de reação de polimerase em cadeia convencional (cPCR) foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAV) da UnB.

A extração de DNA foi realizada com 200µL de sangue contendo EDTA, utilizando o *Kit Illustra Blood Genomicprep (GE Health Care®)* de acordo com as orientações do fabricante e armazenadas a -20°C até o momento da realização da cPCR.

O DNA dos carrapatos foi extraído por meio do protocolo proposto por SANGIONI *et al.*, 2005 (Anexo B) com a utilização de isotiocianato de guanidina e fenol clorofórmio e posteriormente armazenado à -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

As reações de PCR foram compostas por tampão 1X da Taq polimerase (Invitrogen®), 2mM de MgCl₂, oligonucleotídeos (10pmol), 0,25mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e cerca de 5 ng de DNA do produto da extração da amostra para um volume final de 25 µL. Todas as amostras foram testadas em duplicatas e amostras sabidamente positivas para *T. cruzi* e *Leishmania* sp. foram utilizadas como controles positivos das reações, bem como água Mili-Q® como controles negativos. Todas as reações foram realizadas no termociclador *BioradMyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)*.

As reações utilizando os oligonucleotídeos D75 (5'- GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG -3') e D76 (5'- CGT TCT CTG TTG CCC CTT TT -3') (Tabela 1) utilizaram o protocolo *touchdown*, no qual ocorre a queda gradual da temperatura de anelamento em cada ciclo (Lee et al., 2000). Na etapa inicial, após prévio aquecimento da tampa por 2 minutos, as amostras foram incubadas a 94°C por 3 minutos para ocorrer a desnaturação inicial. Em seguida, as amostras passaram por quatro ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação da fita de DNA, 62°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos (diminuindo 2°C por ciclo) e 72°C por 1 minuto para extensão das fitas. Ao término desta etapa, foram realizados 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C e 72°C por 1 minuto. Por último, foi realizada extensão final a 72°C por 10 minutos.

A detecção específica do *T. cruzi* foi realizada com os oligonucleotídeos 121(5'- AAT GTA CGG GTG AGA TGC ATGA-3') e 122 (5'- GTT CGA TTG GGG TTG GTG TAA

TATA 3') (Tabela 1) que amplifica kDNA, e utilizou-se o seguinte protocolo: um ciclo de desnaturação (5 min, 95°C); seguido por 35 ciclos de desnaturação (1 min, 95 °C), anelamento (1 min, 65°C) e extensão (1 min, 72°C) e um ciclo de extensão final (10 min, 72°C).

Na detecção de *Leishmania* spp. com os oligonucleotídeos R221 (5'- GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG -3') e R332 (5'- GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG -3') (Tabela 1) que tem como região alvo o gene SSU-rRNA, os ensaios foram realizados adotando as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação (5 min, 95 °C); seguido por 38 ciclos de desnaturação (1 min, 95 °C), anelamento (1 min, 53°C) e extensão (1 min, 72°C) e um ciclo de extensão final (5 min, 72°C).

Todas as amostras extraídas de sangue foram submetidas à cPCR para confirmação do gene que codifica a enzima GAPH (gliceraldeído-3fosfato desidrogenase) utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F (5'- CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T -3') e GAPDH-R (5'- CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC -3') (Tabela 1) para validar a extração realizada permitindo avaliar a integridade do DNA extraído, e principalmente, verificar a presença de inibidores da PCR (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003). Para este gene, os ensaios de cPCR foram realizados com o protocolo de: 1 ciclo de desnaturação inicial (5 min, 95 °C); seguido por 40 ciclos de desnaturação (1 min, 95 °C), anelamento (1 min, 53°C) e extensão (1 min, 72°C) e um ciclo de extensão final (5 min, 72°C).

Todas as amostras de DNA extraídas de carrapatos foram submetidas à PCR para confirmação do gene mitocondrial 16S rRNA, específico para esses aracnídeos, a partir da utilização dos oligonucleotídeos TK-F (5'- CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC GG -3') e TK-R (5'- ACG CTG TTA TCC CTA GAG -3') (Tabela 1). Os ensaios de cPCR foram realizados da seguinte forma: 1 ciclo de desnaturação (8 min, 94°C); seguido por 10 ciclos de desnaturação (1 min, 92°C), anelamento (1 min, 48°C) e extensão (1 min 30s, 72°C). E 32 ciclos de desnaturação (1 min, 92°C), anelamento (1 min, 54°C), extensão (1 min 30s, 72°C) e um passo final de extensão (10 min, 72°C).

Os oligonucleotídeos, região alvo do gene, sequência dos pares de base, especificidade e tamanho do fragmento produzido após amplificação por cPCR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos e suas características utilizados para detecção de tripanossomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e carrapatos do Distrito Federal.

Gene	Sequências dos Oligonucleotídeos (‘5-3’)	Especificidade	Fragmento	Referências
24Sα-rDNA	D75 GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG D76 CGT TCT CTG TTG CCC CTT TT	Trypanosomatidae	270pb	(SOUTO; VARGAS; ZINGALES, 1999)
kDNA	121 AAT GTA CGG GTG AGA TGC ATGA 122 GTT CGA TTG GGG TTG GTG TAA TATA	<i>T. cruzi</i>	330pb	(WINCKER et al., 1994)
SSU-rRNA	R221 GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG R332 GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG	<i>Leishmania</i> sp.	603pb	(VAN EYS et al., 1992)
m16SrRNA	TK-F CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC GG TK-R ACG CTG TTA TCC CTA GAG	Carrapatos	320pb	(HALOS et al., 2004)
mRNA	GAPDH-F CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T GAPDH-R CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC	Mamíferos	400pb	(BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003)

rDNA: DNA ribossomal; kDNA: DNA do cinetoplasto; SSU-rRNA: RNA da pequena subunidade ribossomal.

Os produtos de amplificação de todas as reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados em brometo de etídio (*Vetec Sigma-Aldrich®*, *St Louis, MO*) e visualizados sob luz ultravioleta (*UV transiluminator®*, *UVP LLC, Upland, CA*).

Ensaio sorológico

Os ensaios sorológicos foram realizados pelo método de imunofluorescência indireta (RIFI) realizados no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LABZOO) localizados no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. As amostras de soro sanguíneo das capivaras foram separadas por centrifugação e armazenadas à – 20°C até a realização da RIFI. Para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania* foram utilizados antígenos fornecidos pelo Instituto Oswaldo Cruz. Como controle positivos e negativos foram utilizados soro de cão e humano utilizando seus respectivos conjugados.

Solução salina tamponada com pH 7.2 foi utilizada para diluir as amostras a 1:20 e depositadas em áreas delimitadas nas lâminas previamente impregnadas com os antígenos seguido de incubação a 37°C por 30 minutos em câmara úmida e posteriormente lavadas com dois banhos de 10 minutos utilizando solução salina tamponada. Após a completa secagem em

temperatura ambiente, foi acrescido antigamaglobulina de capivara (produzido pelo LABZOO, CCZ-SP), marcado com isotiocianato de fluoresceína e diluído a 1:400 em azul de Evans 4 mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas conforme descrito anteriormente. Após secagem, as lâminas foram preparadas com glicerina tamponada e lidas com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40X. Amostras reagentes para *T. cruzi* e *Leishmania* spp. foram consideradas aquelas que apresentaram epimastigotas e promastigotas fluorescentes, inclusive no flagelo. Todas as amostras foram submetidas à triagem na diluição de 1:20. Aquelas que se mostraram reagentes nesta diluição, foram preparadas diluições sucessivas. Amostras com reações com títulos maiores ou iguais a 1:40 foram consideradas positivas.

Identificação dos carrapatos

Os carrapatos foram identificados por espécie, sexo e estágio de desenvolvimento, separados em larvas, ninfas, machos adultos e fêmeas adultas. A espécie foi classificada de acordo com a literatura (BATTESTI *et al.*, 2006).

Análise estatística

Para avaliação das diversas variáveis hematológicas e bioquímicas, foram utilizadas medidas de dispersão e de tendência central e medidas de frequência para descrever a presença de infecção.

Teste de Tukey foi utilizado para comparar as variáveis hematológicas das populações de animais infectados e não infectados que apresentaram normalidade. Para variáveis que não apresentaram normalidade foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliar o efeito da infecção e comparar dados hematológicos e bioquímicos obtidos entre os grupos de animais infectados e não infectados. Em ambos os testes foi considerada uma significância de 5%.

3. Resultados

Foram capturadas 57 capivaras de vida livre para a colheita das amostras biológicas e carrapatos, sendo 15 machos (13 adultos e 02 jovens) e 42 fêmeas (35 adultas e 07 jovens). Considerando as regiões amostradas, foram capturadas 15 fêmeas adultas na região do lago Paranoá, 02 fêmeas adultas Fazenda Sucupira e 40 animais (15 machos e 25 fêmeas) no Jardim Zoológico de Brasília.

Os resultados dos hemogramas e bioquímica sérica dos 57 animais estão dispostos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Valores obtidos no hemograma de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

	Média ± Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Eritrograma				
Volume globular (%)	37,9 ± 3,1	30	44	38
Hemoglobina (g/dl)	11,85 ± 2,7	7,0	18,9	11,5
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	3,0 ± 0,8	1,8	6,8	2,8
VCM (fl)	131,4 ± 29,0	54,1	202,0	133,6
CHCM (g/dl)	31,3 ± 6,7	16,6	50,8	30,8
Leucograma				
Leucócitos totais (x 10 ³ /μL)	7128 ± 2233	2400	13900	6825
Basófilos (x 10 ³ /μL)	12,54 ± 38,55	0	192	0
Monócitos (x 10 ³ /μL)	854,8 ± 480,7	82	2349	817,5
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	1066 ± 598,5	0	2500	907,5
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	1913 ± 974,9	81	4859	1852
Heterófilos (x 10 ³ /μL)	3262 ± 1583	1342	10147	2865
Plaquetas (x10³/μL)	201 ± 58	96	324	191

VCM: Volume Corpuscular Médio;

CHCM: Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 3. Valores obtidos na bioquímica sérica de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

Bioquímicos	Média ± Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Alanina aminotransferase – ALT (UI/L)	54,9 ± 23,5	13	99	57
Aspartato aminotransferase - AST (UI/L)	42,8 ± 22,5	17	143	36
Gamma-glutamilttransferase – GGT (UI/L)	0,7 ± 1,0	0	3	0
Fosfatase alcalina – FA (UI/L)	143,5 ± 99,2	33	418	110
Ureia (mg/dl)	31,96 ± 11,84	14	60	30,50
Creatinina (mg/dl)	1,4 ± 0,3	0,8	3,2	1,4
Proteína total (g/dl)	6,0 ± 0,7	4,3	7,8	6,0
Albumina (g/dl)	2,7 ± 0,6	1,4	4,1	2,9
Globulina (g/dl)	3,2 ± 0,6	2,1	4,9	3,3

Nos métodos parasitológicos de pesquisa direta (pesquisa em esfregaço sanguíneo, visualização em tubos de hematócitos e pesquisa em gota espessa) nenhuma das 57 amostras foi positiva.

Das 57 amostras de sangue total testadas por cPCR para o gene 24S α -rDNA específico para tripanossomatídeos, 39 (68,4%) foram positivas (Figura 6). Entretanto, nenhuma foi positiva nas cPCRs específicas para *T. cruzi* e para *Leishmania* sp. Na Figura 6, o controle apresenta-se acima do tamanho da banda esperada, isso se deve ao fato de que diferentes agentes da família Trypanosomatidae amplificam produtos de diferentes tamanhos.

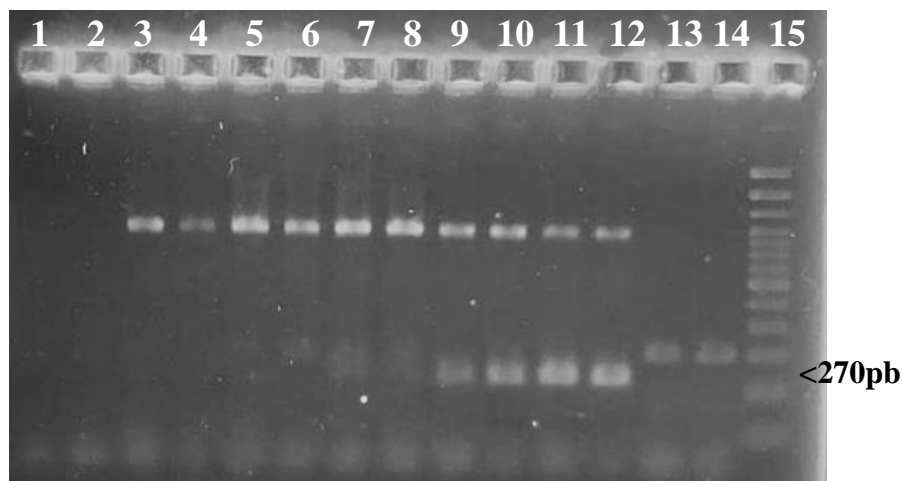


Figura 6- Resultado de ensaio de PCR em gel de eletroforese para a Família Trypanosomatidae, utilizando oligonucleotídeos D75/D76. Fragmentos DNA amplificados em duplicata a partir da extração de sangue total. Poços 1 e 2- controles negativos; Poços 3 ao 12- amostras de sangue de capivaras; Poços 5 ao 12- amostras positivas (270pb). Poços 13 e 14- Controle positivo (*T. cruzi*). Poço 15- Marcador de peso molecular 100pb (*Invitrogen*®)

Na Figura 7 os animais positivos na PCR para tripanossomatídeos estão divididos por sexo e faixa etária e porcentagem em cada grupo, e observa-se, maior número de fêmeas adultas amostradas quando comparadas aos outros grupos.

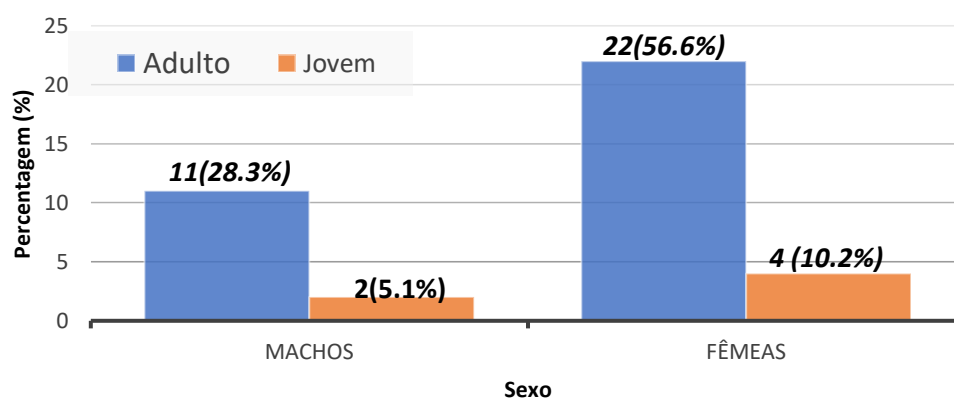


Figura 7: Relação de amostras de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) positivas na cPCR testadas para o gene 24S α -rDNA utilizando os oligonucleotídeos D75/D76 agrupadas por sexo e idade.

Foi realizado ensaio sorológico por RIFI em 55 amostras, duas amostras foram insuficientes para realizar o teste. Todas as amostras testadas foram sorologicamente negativas para *T. cruzi* e *Leishmania* sp., não apresentando sororreatividade na diluição de 1:40.

As capivaras amostradas neste estudo estavam infestadas por carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum*. Foram amostrados 558 carrapatos das capivaras. Destes, 162 (89 machos; 34 fêmeas; 39 ninfas) foram identificadas como *Amblyomma sculptum* e 387 (176 machos; 46 fêmeas e 165 ninfas) como *Amblyomma dubitatum* (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de carrapatos amostrados e número de carrapatos utilizados no diagnóstico por PCR de agentes da família *Trypanosomatidae*.

Sexo / Estágio	Identificação Taxonômica					
	<i>Amblyomma sculptum</i>		<i>Amblyomma dubitatum</i>		<i>Amblyomma</i> spp.	
	Total	PCR	Total	PCR	Total	PCR
Larvas					9	0
Ninfas	39	0	165	8		
Machos Adultos	89	30	176	6		
Fêmeas Adultas	34	10	46	6		
Total	162	40	387	20		

Foram extraídos o DNA de 231 amostras de carrapatos, sendo que, 4 a 5 artrópodes eram selecionados por animal amostrado, que posteriormente foram testados quanto a presença de agentes da família *Trypanosomatidae* por cPCR utilizando os oligonucleotídeos D75/D76.

Até o presente momento, foram testadas 60 amostras de carrapatos, 7 destas amplificaram um produto de 270 bp sendo assim, considerados positivos. Dos 7 positivos para família *Trypanosomatidae*, dois eram da espécie *A. dubitatum* (uma ninfa; um macho) e cinco da espécie *A. sculptum* (duas fêmeas e 3 machos) (Figura 8).

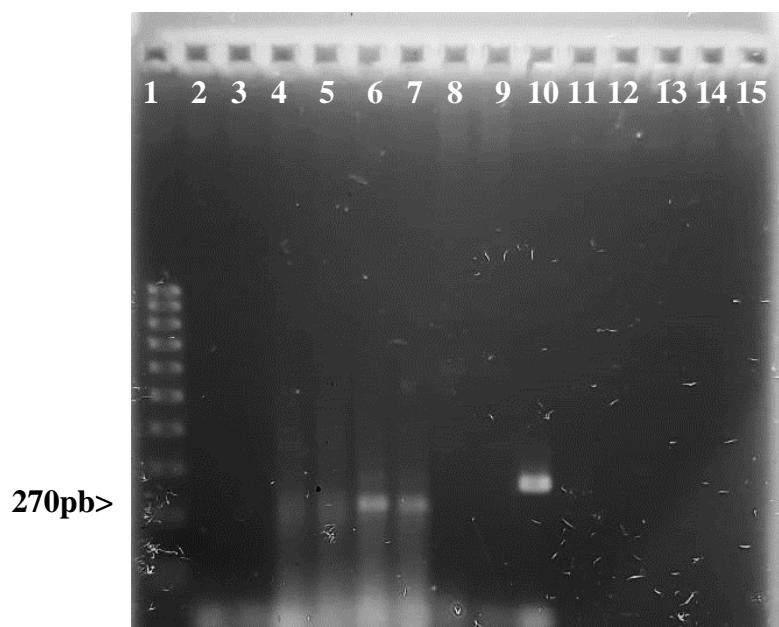


Figura 8. Resultado de PCR em gel de eletroforese para Família *Trypanosomatidae*, utilizando oligonucleotídeos D75/D76 a partir da extração carrapatos. Poço 1- Marcador de peso molecular 100pb (*Invitrogen*®); Poços 2/3- controles negativos; Poços 4/5/6/7- amostras positivas; Poços 8/9- amostra negativa; Poço 10- controle positivo (*T. cruzi*); Poços 11/12/13/14/15- vazios.

Houve relação entre as capivaras e carrapatos positivos na cPCR. Todos os carrapatos que amplificaram o gene 24S α -rDNA foram removidos de animais também positivos para o mesmo gene. Na Tabela 5, estão apresentadas a relação dos carrapatos, suas espécies e estágio de desenvolvimento relacionando com os animais de origem.

Tabela 5. Relação dos carrapatos, suas espécies e estágio de desenvolvimento relacionado com os animais de origem positivos na cPCR para o gene 24S α -rDNA.

Animal de origem	Espécie	Estágio/Sexo
A5	<i>A. sculptum</i>	Fêmea
	<i>A. dubitatum</i>	Macho
A6	<i>A. dubitatum</i>	Ninfa
A8	<i>A. sculptum</i>	Macho
	<i>A. sculptum</i>	Macho
	<i>A. sculptum</i>	Fêmea
C5	<i>A. sculptum</i>	Fêmea

Para avaliar o efeito da infecção por agentes da família *Trypanosomatidae* detectados por PCR nos achados hematológicos e bioquímicos, foram comparados os dois grupos de animais e o valor de média e desvio padrão estão dispostos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Média e desvio padrão dos valores hematológicos dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR.

	Não infectados (n=18)	Infectados (n= 39)	Valor de P
Eritrograma			
Volume globular/VG (%)	37,67 \pm 2,664	38,08 \pm 3,312	0,3832
Hemoglobina (g/dl)	11,97 \pm 3,105	11,61 \pm 2,341	0,1671
Eritrócitos (x 10 ⁶ / μ L)	3,579 \pm 1,287	2,936 \pm 0,5449	<0,001*
VCM (fl)	114,0 \pm 28,20	138,6 \pm 26,33	0,7048
CHCM (g/dl)	31,83 \pm 8,241	30,52 \pm 5,565	0,0553
Leucograma			
Leucócitos totais (x 10 ³ / μ L)	7737 \pm 2881	6926 \pm 1872	0,0352*
Basófilos (x 10 ³ / μ L)	5,65 \pm 21,95	15,18 \pm 43,23	0,5676
Monócitos (x 10 ³ / μ L)	876,6 \pm 604,6	846,1 \pm 433,3	0,1038
Eosinófilos (x 10 ³ / μ L)	1323 \pm 647,6	964,4 \pm 559,2	0,4596
Linfócitos (x 10 ³ / μ L)	1929 \pm 1184	1913 \pm 891,4	0,1652
Heterófilos (x 10 ³ / μ L)	3578 \pm 2012	3169 \pm 1386	0,4191
Plaquetas (x10³ / μL)	191867 \pm 57,503	206,487 \pm 59,805	0,9155

Tabela 7. Média e desvio padrão da bioquímica sérica dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR.

Bioquímicos	Não Infectados (n=18)	Infectados (n= 39)	Valor de P
Alanina aminotransferase – ALT (UI/L)	53,87 ± 21,91	56,72 ± 25,06	0,6030
Aspartato aminotransferase - AST (UI/L)	38,27 ± 9,927	45,15 ± 26,28	0,003*
Fosfatase alcalina – FA (UI/L)	131,3 ± 107,1	146,1 ± 95,61	0,2244
Ureia (mg/dl)	26,93 ± 8,892	34,0 ± 12,20	0,1853
Creatinina (mg/dl)	1,393 ± 0,3011	1,433 ± 0,4047	0,2233
Proteína total (g/dl)	5,693 ± 0,6984	6,164 ± 0,6492	0,9448
Albumina (g/dl)	2,553 ± 0,6501	2,854 ± 0,6492	0,9405
Globulina (g/dl)	3,140 ± 0,7288	3,3310 ± 0,6206	0,4212

4. Discussão

Em relação aos valores hematológicos e bioquímicos obtidos, não foi possível comparar os dados com outros autores devido à ausência de valores de referência para a espécie na literatura.

Nas técnicas parasitológicas (pesquisa em esfregaço sanguíneo, visualização em tubos de hematócritos e pesquisa em gota espessa) todas as amostras foram negativas para presença de flagelados. Resultados semelhantes foram encontrados em 38 amostras de capivaras de vida livre do estado do Acre (FILGUEIRAS et al., 2019). Esse achado, quando comparado com os resultados dos ensaios moleculares, mostram que apesar de infectados, os animais não apresentaram parasitemia suficiente para serem detectados por pesquisa direta, mesmo quando se utiliza técnicas de concentração (tubos de hematócrito). Este fato sugere que os animais amostrados apresentavam a forma crônica da infecção, caracterizada por baixa parasitemia.

Os ensaios de PCR realizados a partir de amostras extraídas de sangue total utilizando os oligonucleotídeos D75/D76 para detecção do gene 24S α -rDNA da família *Trypanosomatidae* do presente estudo, mostraram uma infecção de 68,4%. Todas as amostras positivas para família *Trypanosomatidae* foram posteriormente testadas por PCR para *Leishmania* sp. e *T. cruzi*, que se mostraram negativas. Com isso, pode-se constatar que todas as amostras positivas na PCR utilizando os oligonucleotídeos D75/D76, se tratavam de agentes do gênero *Trypanosoma* diferente do *T. cruzi*. Na literatura, a descrição de infecção de capivaras por *Trypanosoma* que utilizam técnicas moleculares ainda são poucos. Herrera e colaboradores (2004) encontraram taxa de infecção por *T. evansi* de 29.2% em capivaras testadas do Pantanal. Contudo, para o mesmo agente, Eberhardt e colaboradores (2014a) encontraram taxa de infecção de 10% em

capivaras amostradas no centro norte da Argentina.

No centro-oeste, não há dados de infecção de tripanosomatídeos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Contudo, estudo conduzido no Parque Nacional de Brasília e na Reserva Biológica de Contagem relataram em pequenos roedores silvestres do cerrado (quatro *N. lasiurus* e um *G. agilis*) utilizando PCR, espécies de tripanosoma descritas em esquilos (*T. otospermophili*; *T. kuseli*), assim, há possibilidade de os animais de vida livre do presente estudo enjam infectados com estas espécies encontradas em pequenos roedores do cerrado (CARDOSO et al., 2015).

O maior número de fêmeas adultas positivas (56.6%) para tripanossomatídeos (Figura 7) pode ser explicado pela conjuntura social das capivaras na qual grupos de animais são compostos por um número maior de fêmeas quando comparado aos machos, o que resulta numa amostragem maior deste sexo, o mesmo vale para faixa etária (MOREIRA; MACDONALD, 1996).

Os ensaios sorológicos dos 55 animais não foram reagentes para detecção de IgG anti *Leishmania* sp. e *T. cruzi*, mostrando que os animais testados não produziram anticorpos contra estes antígenos. Filgueiras e colaboradores (2019) encontraram resultados compatíveis com os do presente estudo. Quando realizaram RIFI de 46 capivaras para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, todas as amostras foram não reagentes.

Savani e colaboradores (2005) relatam que reação cruzada entre os antígenos *Leishmania* sp. e *Trypanosoma evansi* pode ocorrer em amostras avaliadas por RIFI. O mesmo fenômeno pode ocorrer em amostras testadas por RIFI em coinfeção por *Leishmania* sp. e *T. cruzi* (MOURIZ SAVANI et al., 2005; DUPREY et al., 2006; DESQUESNES; BOSSENO; BRENIÈRE, 2007), contudo, não foi verificado no presente estudo reações cruzadas. De acordo com os achados sorológicos do presente estudo e dados contidos na literatura, é possível que as amostras positivas na PCR sejam pela presença de espécies de trypanosoma antígenicamente distante das de *T. cruzi* e *T. evansi*, ou que não houve soro-conversão dos animais testados. Essa última hipótese é menos provável, uma vez que assumimos que todos os 39 animais positivos na PCR não soro-converteram.

Houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre o número de hemácias do grupo infectado e não infectado. O grupo infectado apresentou menor média, sendo esse um achado comum em infecções por tripanossomas nas mais diversas espécies, devido à quebra das hemácias durante a movimentação dos flagelados e eritrofagocitose (SCHAFER et al., 2009; OHAERI; ELUWA, 2011).

O número de leucócitos totais também apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos, em que, os animais infectados apresentaram médias inferiores aos do grupo não infectados. Eberhardt e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes em um grupo de capivaras infectadas por *T. evansi*. A diferença entre os grupos possivelmente se deve a capacidade imunossupressora do agente e pela apoptose de leucócitos já descrita em infecções por *T. brucei* em ratos (HAPPI; JR; ANTIA, 2012). Apesar da diferença entre os grupos na contagem de leucócitos totais, nenhuma diferença foi observada quando analisamos os tipos leucocitários.

Apesar da diferença observada nos valores de número hemácias e leucócitos, os animais apresentavam-se clinicamente saudáveis, o que nos leva a crer, juntamente com os achados dos ensaios parasitológicos, que as capivaras amostradas apresentaram baixa parasitemia (HERRERA et al., 2004). Há também a possibilidade dos animais estarem infectados com espécies não patogênicas de *Trypanosoma*. Um fator limitante para a análise do efeito da infecção é a ausência de valores de referência para a espécie, que limitam o entendimento clínicos-patológico dos valores obtidos.

Os valores de AST diferiram significativamente entre os grupos avaliados, apresentando médias superiores para os grupos de animais infectados. Comportamento semelhante para AST foi verificado em infecções por tripanossoma em cães, bovinos e quatis. A AST é uma enzima presente no músculo cardíaco, fígado, músculo esquelético, no interior dos eritrócitos e rim, sendo uma enzima não específica utilizada na avaliação de lesão hepática. Em infecções por tripanossoma, o protozoário ao invadir tecidos extravasculares como líquidos intersticiais, líquido peritoneal e líquor, tecido linfático, muscular, linfonodos, baço e rim, causa necrose e infiltração de células inflamatórias resultando em liberação de AST do interior desses tecidos e consequente aumento dos níveis séricos. Outra possível causa do aumento sérico de AST no grupo de animais infectados é a hemólise intravascular decorrente da infecção pelo protozoário e subsequente liberação do conteúdo intra-eritrocitário na circulação sanguínea (NGERANWA et al., 1993; SILVA et al., 1995; TAKEET; FAGBEMI, 2010; MISHRA; SENAPATI; SAHOO, 2017).

Os produtos da PCR oriundos de amostras extraídas a partir de carrapatos e sangue positivos para o gene 24Sa-rDNA ainda não foram sequenciados e as amostras de carrapatos restantes serão analisadas. Contudo, espera-se que os resultados de sequenciamento das amostras de sangue total e dos carrapatos tenham correlação entre si, tendo em vista que carrapatos e sangue total coletados de um mesmo animal foram positivos quando testados para

agentes da família *Trypanosomatidae*, apoiando a hipótese de que os carrapatos sejam possíveis vetores para espécies de tripanossomatídeos. Este é o primeiro relato da presença de agentes da família Trypanosomatidae em artrópodes das espécies *A. dubitatum* e *A. sculptum*.

Foram detectados agentes da família *Trypanosomatidae* em carrapatos em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 5), esse achado sugere que os carrapatos podem estar se infectando nos diferentes estágios de desenvolvimento, havendo a possibilidade de transmissão da infecção ao longo da vida do Ixodídeo (transmissão horizontal). É possível também que os protozoários se mantenham nas gerações de carrapatos através da transmissão transovariana. Trabalhos na literatura com *Rhipicephalus sanguineus*, demonstraram que a transmissão transovariana de *T. rhipicephalis* e *Leishmania* sp é possível nessa espécie de carrapato (DABAGHMANESH et al., 2016; KAULICH et al., 2019). Apesar dos achados do presente trabalho, estudos futuros são necessários para avaliar a presença de transmissão transovariana e transtadial de tripanossomatídeos em carrapatos que infestam capivaras do Distrito Federal.

5. Conclusão

As capivaras amostradas apresentaram uma alta taxa de infecção por agentes da família *Trypanosomatidae* utilizando a PCR convencional. Nenhuma amostra apresentou titulações de anticorpos para os agentes *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*. A análise dos carrapatos está em andamento, contudo, dados parciais mostram que há presença desses protozoários em artrópodes da espécie *A. dubitatum* e *A. sculptum* removidos de capivaras de vida livre do DF. A partir dos dados obtidos, as capivaras das regiões amostradas no DF não oferecem riscos à saúde humana quando se trata de *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*. No futuro, esforços são necessários para estabelecer quais espécies de tripanosoma afetam capivaras do DF com utilização de sequenciamento, bem como a relação das espécies de *A. dubitatum* e *A. sculptum* com agentes tripanossomatídeos e se estes funcionam como vetores para as espécies envolvidas.

6. Referências Bibliográficas

BATTESTI, D. M. B., BATTESTI, D. M. B., ARZUA, M., *et al.* **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** [S.l.], Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.

BIRKENHEUER, A. J., LEVY, M. G., BREITSCHWERDT, E. B. "Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype ... Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. March, p. 4172–4177, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4172. .

CARDOSO, R. M., DE ARAÚJO, N. N. S. L., ROMERO, G. A. S., *et al.* "Expanding the knowledge about Leishmania species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah", **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0780-y. .

CHIACCHIO, R. G.-D., PRIOSTE, F. E. S., VANSTREELS, R. E. T., *et al.* " Health Evaluation and Survey of Zoonotic Pathogens in Free-Ranging Capybaras (Hydrochoerus Hydrochaeris) ", **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 3, p. 496–504, 2014. DOI: 10.7589/2013-05-109. .

COSTA, F. B., GERARDI, M., BINDER, L. de C., *et al.* "Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting Amblyomma sculptum (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil", **Journal of Medical Entomology**, v. 2018, n. X, p. 1–4, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjz141. .

COX, F. E. G. **History of human parasitology.** **Clinical Microbiology Reviews.** [S.l.: s.n.]. , 2002

DABAGHMANESH, T., ASGARI, Q., MOEMENBELLAH-FARD, M. D., *et al.* "Natural transovarial and transstadial transmission of Leishmania infantum by naïve Rhipicephalus sanguineus ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 408–413, 2016. DOI: 10.1093/trstmh/trw041. .

DE ALBUQUERQUE, N. F., MARTINS, G., MEDEIROS, L., *et al.* "The role of capybaras as carriers of leptospire in periurban and rural areas in the western Amazon", **Acta Tropica**, v. 169, p. 57–61, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.01.018. .

DESQUESNES, M., BOSSENO, M. F., BRENIÈRE, S. F. "Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*", **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 457–462, 2007. DOI: 10.1016/j.meegid.2007.01.007. .

DESQUESNES, M., HOLZMULLER, P., LAI, D.-H., *et al.* "Trypanosoma evansi and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects ", **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–22, 2013. DOI: 10.1155/2013/194176. .

DUPREY, Z. H., STEURER, F. J., ROONEY, J. A., *et al.* "Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003", **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 440–446, 2006. DOI: 10.3201/eid1203.050811. .

EBERHARDT, A. T., BELDOMENICO, P. M., MONJE, L. D., *et al.* "Biochemical and physiological parameters associated with *Trypanosoma evansi* prevalence in wild capybaras A.T. Eberhardt", **Canadian Journal of Zoology**, v. 95, n. 12, p. 913–919, 2017. .

EBERHARDT, A. T., MONJE, L. D., ZURVERA, D. A., *et al.* "Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capybaras from Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays", **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 226–233, 2014a. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.02.043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.043>.

EBERHARDT, A. T., MONJE, L. D., ZURVERA, D. A., *et al.* "Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capybaras from Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays", **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 226–233, 28 maio 2014b. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2014.02.043. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401714001307>. Acesso em: 9 dez. 2019.

FARIKOSKI, I. O., MEDEIROS, L. S., CARVALHO, Y. K., *et al.* "The urban and rural capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as reservoir of *Salmonella* in the western Amazon, Brazil", **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 66–69, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5761. .

FILGUEIRAS, A., BARROS, J. H. da S., XAVIER, S. C. C., *et al.* "Natural *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* (Steel, 1885) infection among mammals from Brazilian Amazon", **Acta**

Tropica, v. 190, p. 92–98, 1 fev. 2019. DOI: 10.1016/J.ACTATROPICA.2018.11.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18309653>. Acesso em: 9 dez. 2019.

FONSECA, H. P., ESTON, R. D. M. "Biologia e manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Parque Estadual Alberto Löfren, São Paulo, Brasil", **Revista do Instituto Florestal**, v. v. 19, n. 1, p. 55–64, 2007. Disponível em: [http://www.conhecer.org.br/download/CONTENCAO E CAPTURA DE ANIMAIS SELVAGENS/LEITURA ANEXA 1.pdf](http://www.conhecer.org.br/download/CONTENCAO_E_CAPTURA_DE_ANIMAIS_SELVAGENS/LEITURA_ANEXA_1.pdf).

GOLDENFARB, P. B., BOWYER, F. P., HALL, E., *et al.* "Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination.", **American journal of clinical pathology**, v. 56, n. 1, p. 35–39, 1971. DOI: 10.1093/ajcp/56.1.35. .

HALOS, L., JAMAL, T., VIAL, L., *et al.* "Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks", **Vet. Res**, v. 35, p. 709–713, 2004. DOI: 10.1051/vetres:2004038. .

HAPPI, A. N., JR, D. A. M., ANTIA, R. E. "Blood and Tissue Leukocyte Apoptosis in *Trypanosoma brucei* Infected Rats", v. 3, 2012. DOI: 10.4303/jnp/N120101. .

HERRERA, H. M., DÁVILA, A. M. R., NOREK, A., *et al.* "Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil", **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 263–275, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.07.013. .

HOARE, C. A. "The trypanosomes of mammals: a zoological monograph", **Oxford : Blackwell Scientific Publications**, v. 2, n. July 1971, p. 1971, 1972. .

KAULICH, Y., RIBEIRO, C. M., DE ALMEIDA VALIM, J. R., *et al.* "Transovarial transmission and finding of *Trypanosoma rhipicephalis* in the hemolymph of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*", **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 41, p. 1–6, 2019. DOI: 10.29374/2527-2179.bjvm106819. .

LUZ, H. R., COSTA, F. B., BENATTI, H. R., *et al.* "Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever", 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007734. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>. Acesso em: 28 jan. 2020.

MCGHEE, R. B., COSGROVE, W. B. "Biology and physiology of the lower

trypanosomatidae", **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 140–173, 1980. .

MISHRA, R. R., SENAPATI, S. K., SAHOO, S. C. "Trypanosomiasis induced oxidative stress and hemato-biochemical alteration in cattle", v. 5, n. 6, p. 721–727, 2017. .

MOREIRA, J. R., MACDONALD, D. W., "Capybara use and conservation in South America". In: TAYLOR, V. J., DUNSTONE, N. (Org.), **The Exploitation of Mammal Populations**, [S.l.], Springer, Dordrecht, 1996. p. 88–101. DOI: 10.1007/978-94-009-1525-1_7.

MOURIZ SAVANI, E. S. M., BRANDÃO NUNES, V. L., BIANCHI GALATI, E. A., *et al.* "Ocurrence of co-infection by Leishmania (Leishmania) chagasi and Trypanosoma (Trypanozoon) evansi in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 739–741, 2005. DOI: 10.1590/s0074-02762005000700011. .

NGERANWA, J. J. N., GATHUMBI, P. K., MUTIGA, E. R., *et al.* "Pathogenesis of Trypanosoma (brucei) evansi in small East African goats", **Research in Veterinary Science**, v. 54, n. 3, p. 283–289, 1993. DOI: 10.1016/0034-5288(93)90124-X. .

NOSANCHUK, J. S., CHANG, J., BENNETT, J. M. "The analytic basis for the use of platelet estimates from peripheral blood smears. Laboratory and clinical applications", **American Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 4, p. 383–387, 1978. DOI: 10.1093/ajcp/69.4.383. .

OHAERI, C. C., ELUWA, M. C. "Veterinary Parasitology Abnormal biochemical and haematological indices in trypanosomiasis as a threat to herd production", **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 199–202, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.02.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.002>.

RICHINI-PEREIRA, V. B., MARSON, P. M., HAYASAKA, Y., *et al.* **Molecular detection of Leishmania spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil**. . [S.l: s.n.], 2014. Disponível em: <http://www.jvat.org/content/20/1/27>. Acesso em: 28 jan. 2020.

SANGIONI, L. A., HORTA, M. C., VIANNA, M. C. B., *et al.* "Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity", **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265–270, 2005. DOI: 10.3201/eid1102.040656. .

SCHAFER, A., SILVA, D., COSTA, M. M., *et al.* "Experimental Parasitology Trypanosoma

evansi : Hematologic changes in experimentally infected cats", **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 31–34, 2009. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.05.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.008>.

SILVA, R. A. M. S., HERRERA, H. M., DOMINGOS, L. B. da S., *et al.* **Pathogenesis of Trypanosoma evansi infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects.** **Ciência Rural.** [S.l: s.n.], 1995

SOUTO, R. P., VARGAS, N., ZINGALES, B. "Trypanosoma rangeli: Discrimination from Trypanosoma cruzi based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene", **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 306–314, 1999. DOI: 10.1006/expr.1998.4380. .

TAKEET, M. ., FAGBEMI, B. . "Haematological, pathological and plasma biochemical changes in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma congolense*", **Science World Journal**, v. 4, n. 2, p. 29–36, 2010. DOI: 10.4314/swj.v4i2.51843. .

VALADAS, S., GENNARI, S. M., YAI, L. E. O., *et al.* "Prevalence of Antibodies to Trypanosoma cruzi, Leishmania infantum, Encephalitozoon cuniculi, Sarcocystis neurona, and Neospora caninum in Capybara, Hydrochoerus hydrochaeris, from São Paulo State, Brazil", **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 521–524, 2010. DOI: 10.1645/GE-2368.1. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2368.1>.

VANEYS, G. J. J. M., SCHOONE, G. J., KROON, N. C. M., *et al.* "Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites", **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992. DOI: 10.1016/0166-6851(92)90208-2. .

WEISER, G., "Laboratory Technology for Veterinary Medicine". In: THRALL, M. A., WISER, G., ALLISON, R. W., *et al.* (Org.), **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**, 2nd. ed. [S.l.], Wiley-Blackwell, 2012. p. 3–33.

WHO. "Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.", **World Health Organization technical report series**, n. 975, 2012. .

WINCKER, P., BRITTO, C., PEREIRA, J. B., *et al.* "Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect Trypanosoma cruzi in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area", **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.

51, n. 6, p. 771–777, 1 dez. 1994. DOI: 10.4269/ajtmh.1994.51.771. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1994.51.771>. Acesso em: 27 jan. 2020.

WOO, P. T. K. "The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood", **Canadian Journal of Zoology**, v. 47, n. 5, p. 921–923, 1969. DOI: 10.1139/z69-150. .

ANEXOS

Anexo A. Aprovação Comissão de Ética no Uso Animal

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

Brasília, 27 de março de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ESTUDO DA CONDIÇÃO DE SANIDADE DE CAPIVARAS (*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) ORIUNDAS DO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO”. Protocolo n.º 20/2019, sob responsabilidade da Professora Giane Regina Paludo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Hydrochoerus hydrochaeris* (100). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/03/2019 a 29/02/2020.

Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB

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

Anexo B. Protocolo de extração pelo método de isotiocianato de guanidina e fenol clorofórmio**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CARRAPATOS – GT**

- 1) Colocar um carrapato em cada eppendorf identificado
 - a. Fêmeas ingurgitadas – Cortar, usar somente o capítulo (terço anterior) para evitar o máximo de contaminação com sangue
 - b. Larvas – Nunca usar várias larvas de diferentes origens. Geralmente só junta as encontradas no mesmo bolo
- 2) Adicionar em cada eppendorf 150 μ L de PBS
- 3) Triturar os carrapatos com ponteira queimada
- 4) Homogeneizar no vórtex por 10 segundos
- 5) Spin por 6-7 segundos
- 6) Adicionar 450 μ L de GT em cada microtubo
 - a. ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR
 - b. Manter o GT na geladeira
- 7) Colocar no banho maria a 37°C e deixar incubando por 10 minutos, com vórtex a cada 2,5 minutos, agitando por 10 segundos
- 8) Spin de 6 segundos na centrífuga
- 9) Acrescentar 100 μ L de clorofórmio em cada microtubo
 - a. ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR
- 10) Vórtex por 10 segundos e deixar descansando por 2 minutos
- 11) Centrifugar os tubos a 12.000 rpm por 5 minutos
 - a. Na centrífuga, lembrar de colocar a dobra da tampa do eppendorf para cima para facilitar a identificação do local do pellet
 - b. Identificar um novo microtubo para cada amostra
- 12) Obtenção de 2 fases no eppendorf
- 13) Recuperar 400 μ L da fase aquosa (transparente) colocando-a no novo microtubo identificado e desprezar o microtubo com a fase restante (azul);
 - a. NÃO PUXAR O CORANTE (FASE AZUL). INIBIDOR DE PCR
 - b. Pode-se puxar até 400 μ L, mas menos que isso não tem problema
- 14) Colocar em cada microtubo 600 μ L de isopropanol 100% (para solubilizar)
 - a. ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR

- 15) Deixar no freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, podendo ficar *overnight* ou tempo indeterminado
- 16) Centrifugar 12000 rcf – 15 min – 4°C
- 17) Desprezar o sobrenadante
 - a. Técnica do papel – um papel para cada tubo
- 18) Adicionar 800 μL de etanol à 70% em cada microtubo
- 19) Centrifugar a 12000 rcf - 5 minutos - 4°C
- 20) Desprezar o sobrenadante
- 21) Secar o pellet a 56°C no banho maria por 30 minutos, com o tubo aberto até secar
- 22) Ressuspender o pellet com PBS
 - a. 30 a 60 μL de acordo com os testes a serem efetuados
 - b. Carrapato inteiro: 60 μL
 - c. Pernas e larvar: 30 μL
 - d. Ninfas: 15 μL
- 23) Vórtex por 6 segundos.