

OCORRÊNCIA NATURAL DE *Trypanosoma cruzi* EM MAMÍFEROS SELVAGENS DE PARQUES FLORESTAIS URBANOS DE MARINGÁ, PARANÁ, BRASIL.

Gustavo Henrique Sanches (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ricardo Nascimento Drozino (PCS/UEM), Flávio Haragushiku Otomura (UENP), Mônica Lúcia Gomes (UEM), Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: mjtoledo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Parasitologia.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, ciclo silvestre, mamíferos selvagens.

Resumo:

Trypanosoma cruzi é um parasito que infecta uma diversidade de hospedeiros formando um ciclo de transmissão enzoótico em ambientes silvestres, podendo causar doença em humanos e animais domésticos. Mamíferos selvagens constituem reservatórios naturais desse parasito, o qual é transmitido por insetos hematófagos da família Reduviidae. Neste estudo a ocorrência natural de *T. cruzi* foi investigada em mamíferos selvagens capturados em dois fragmentos urbanos de Mata Atlântica do Município de Maringá, Paraná, Sul do Brasil. Amostras de sangue de 12 *Didelphis albiventris* e 35 morcegos pertencentes a cinco espécies (*Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Pygoderma bilabiatum* e *Sturnira lilium*) foram colhidas e analisadas pela PCR de sangue (kDNA) e hemocultura (NNN). Todas as amostras de *D. albiventris* foram positivas pela PCR e uma pela hemocultura, obtendo-se um isolado do parasito. *A. lituratus* foi o único quiróptero que apresentou PCR positiva para *T. cruzi*, com 40% de positividade. As demais espécies de morcegos tiveram resultado negativo para a PCR. Todas as hemoculturas referentes às amostras obtidas de morcegos capturados foram negativas. Este é o primeiro registro de *A. lituratus* naturalmente infectado por *T. cruzi* no Estado do Paraná em um fragmento florestal urbano.

Introdução

Estudos envolvendo doenças parasitárias e seus agentes etiológicos em animais selvagens são extremamente valiosos para a compreensão da dinâmica de infecções e endemias que podem afetar humanos e animais domésticos. Neste contexto, o *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida), um protozoário parasito multi-hospedeiro, é notável por ser capaz de infectar sete ordens de mamíferos, tendo como vetores insetos hematófagos da família Reduviidae (Jansen et al., 2015). *T. cruzi* é subdividido geneticamente em seis *Discrete Typing Units* (DTU, TcI-TcVI), e o

conhecimento dos padrões geográficos de distribuição dessas DTU no ambiente selvagem ainda é insuficiente (Zingales et al., 2009; Jansen et al., 2015). TcI e TcII são genótipos antigos de *T. cruzi*, e essas DTU são amplamente dispersas nas áreas de distribuição do parasito em todo o território brasileiro, contudo, TcII é menos frequentemente isolado do que TcI (Jansen et al., 2015). No entanto, no Estado do Paraná, o genótipo TcII já foi encontrado infectando humanos e triatomíneos, mas não em outros animais mamíferos (Spitzner et al., 2007; Abolis et al., 2011). Neste contexto, é importante a consideração de estudos que avaliem a dinâmica da infecção de parasitos que circulam em animais selvagens, como o *T. cruzi*. Durante este estudo, foi investigada a ocorrência natural do *T. cruzi* em mamíferos selvagens capturados em dois fragmentos florestais urbanos de Mata Atlântica sob o domínio da Floresta Estacional Semidecidual no Município de Maringá, Paraná, com o objetivo de detectar e isolar o parasito.

Materiais e métodos

Aspectos éticos e área de estudo

Os procedimentos foram aprovados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Ministério do Meio Ambiente, Brasil (nº 42881) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (nº 023/2014). O estudo de campo foi conduzido em dois parques florestais da área urbana do Município de Maringá, Paraná, Brasil: Parque do Ingá (PI, 51°55'W23°25'S) e o Parque Cinquentenário (PC, 51°56'W23°23'S).

Captura dos mamíferos e colheita de amostras de sangue

Trinta e cinco morcegos pertencentes a cinco espécies foram capturados com redes de neblina. Para a captura de gambás foram utilizadas armadilhas *live trap* do tipo Tomahawk. Gambás e morcegos foram anestesiados, de maneira não prejudicial, com 4,0 mg/Kg de xilazina (Anasedan-CEVA) em associação com 20,0 mg/kg de ketamina (Ketamina-FAGRA) para a colheita de sangue. O sangue obtido foi cultivado em meio Novy, McNeal e Nicolle (NNN).

Aproximadamente 0,2 mL de sangue total obtido foi armazenado em microtubos contendo 400 µL de solução de 0,2 M de EDTA e 6,0 M de guanidina para extração e amplificação de DNA de sangue de acordo com Gomes et al. (1998) modificado por Miyamoto et al. (2006).

Detecção do parasito no sangue

O DNA foi extraído por meio do método fenol/clorofórmio e precipitado com adição de etanol e acetato de sódio. A amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada de acordo com Gomes et al. (1998), modificado por Miyamoto et al. (2006) usando os *primers* 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'). Os produtos da amplificação

foram analisados em eletroforese de gel de poliacrilamida a 4,5%, seguido de coloração com nitrato de prata.

Resultados e Discussão

Dos 35 morcegos examinados, o fragmento do kDNA (~330 pb) de *T. cruzi* foi detectado em dez indivíduos da espécie *Artibeus lituratus* (n=25) perfazendo 40% de positividade para esta espécie. Para as outras espécies de morcego capturadas (*Carollia perspicillata* [n=3], *Platyrrhinus lineatus* [n=1], *Pygoderma bilabiatum* [n=2], e *Sturnira lilium* [n=4]), o fragmento específico de kDNA não foi detectado (Tabela 1).

Morcegos *A. lituratus*, uma espécie de alta mobilidade, muito comum em ambientes urbanizados, exibem grande área de forrageamento, o que facilitaria a infecção por uma infinidade de agentes patogênicos (Nunes et al., 2016). Por ser uma espécie sinantrópica, *A. lituratus* pode atuar como mantenedor e dispersor de parasitos em ambientes perturbados (Jansen et al., 2015; Nunes et al., 2016). Neste estudo, hemoculturas foram negativas para todos os morcegos. Jansen e colaboradores (2015) relatam que menos de 40% dos animais examinados estão infectados, com hemoculturas positivas apenas em 10% dos espécimes examinados (alta parasitemia).

Todos os *D. albiventris* (n=12) amostrados foram positivos para PCR-kDNA (100%), com uma hemocultura positiva para *T. cruzi* perfazendo um isolado do parasito (Tabela 1). Uma infecção recente ou em parasitemias transitórias com picos que flutuam ao longo do tempo, ou infecções concomitantes, podem influenciar o encontro de hemoculturas positivas em hospedeiros silvestres (Jansen et al., 2015). Isso explica o fato de que as amostras dos demais *D. albiventris*, embora com PCR positiva, foram negativas na hemocultura (baixas parasitemias) (Tabela 1).

Tabela 1. Mamíferos capturados e examinados quanto à presença de infecção por *Trypanosoma cruzi* (detecção por PCR e hemocultura) em um fragmento florestal urbano de Maringá, Paraná, sul do Brasil.

Espécies	Amostragem	Prevalência (%)*	Hemocultura (%)
<i>Didelphis albiventris</i>	12	100.0	8.3
<i>Artibeus lituratus</i>	25	40.0	0.0
<i>Carollia perspicillata</i>	3	0.0	0.0
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1	0.0	0.0
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	2	0.0	0.0
<i>Sturnira lilium</i>	4	0.0	0.0
TOTAL	47	46.8	2.1

* Referente à porcentagem de animais daquela espécie positivos para PCR.

Conclusões

Demonstramos a presença de *T. cruzi* nos dois grupos de mamíferos estudados, com a obtenção de um isolado do parasito. Além disso, a PCR para detecção do kDNA de *T. cruzi*, revelou infecção pelo protozoário em

morcegos da espécie *A. lituratus*, registro inédito no Estado do Paraná. Esses resultados corroboram a importância de estudos que avaliam a dinâmica da infecção de patógenos que circulam em animais selvagens, como o ciclo enzoótico do *T. cruzi* em mamíferos selvagens e triatomíneos.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo investimento e oportunidade.

Ao professor Dr. Max Jean de Ornelas de Toledo que me acolheu em sua linha de pesquisa.

Referências

ABOLIS, N. G.; ARAUJO, S. M.; TOLEDO, M. J. O.; FERNANDEZ, M. A.; GOMES, M. L. *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. **Acta Trop.** 120, 167–172, 2011.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENNA, S. D.; GALVÃO, L. M.; CHIARI, E.; *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. **Exp. Parasitol.** 33, 28–33, 1998.

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

MIYAMOTO, C. T.; GOMES, M. L.; MARANGON, A. V.; ARAÚJO, S. M.; BAHIA, M. T.; LANA, M.; TOLEDO, M. J. O. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. **Exp. Parasitol.** 2016.

NUNES, H.; ROCHA, F. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban Ecosyst.** doi:10.1007/s11252-016-0632-3, 2016

SPITZNER, F. L.; FREITAS, J. M.; MACEDO, A. M.; TOLEDO, M. J. O.; ARAÚJO, S. M.; PRIOLI, A. J.; GOMES, M. L. *Trypanosoma cruzi*- triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bug in Paraná state, Brazil. **Acta Parasitologica** v. 52, p. 74-81, 2007.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES, S. E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENG, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104, 1051–1054, 2009.