

## ***Trypanosoma cruzi* INFECTANDO NATURALMENTE MAMÍFEROS SINANTRÓPICOS DE VIDA LIVRE EM ÁREAS VERDES DE MARINGÁ, PARANÁ.**

Giullia Ferreira Iunklaus (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ricardo Nascimento Drozino, Flávio Haragushiku Otomura, Mônica Lúcia Gomes, Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: giullia\_iunklaus@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá.

**Ciências Biológicas, Parasitologia.**

**Palavras-chave:** *Discrete Typing Units*, mamíferos selvagens, ciclo silvestre.

### **Resumo:**

Estudos envolvendo doenças parasitárias e animais selvagens são extremamente valiosos para a compreensão da dinâmica de infecções e endemias que podem afetar humanos e animais domésticos. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida), um protozoário parasito multi-hospedeiro faz parte desse grupo, sendo capaz de infectar sete ordens de mamíferos, tendo como vetores insetos hematófagos da família Reduviidae. Subdividido geneticamente em seis *Discrete Typing Units* (DTU, TcI-TcVI). TcI e TcII são amplamente dispersos nas áreas de distribuição do parasito em todo o território brasileiro. Neste estudo, a ocorrência natural do *T. cruzi* foi investigada em mamíferos selvagens capturados em fragmentos florestais urbanos de Mata Atlântica no município de Maringá, Paraná. Para tanto, foram capturados 12 gambás, 35 morcegos e cinco ratos. Os mamíferos capturados foram anestesiados, de maneira não prejudicial, para a colheita de sangue. O sangue obtido foi submetido a PCR para detecção do parasito e ao cultivo em meio NNN/LIT para obtenção de novos isolados. Demonstramos a presença de *T. cruzi* em gambás e morcegos, com a obtenção de um isolado do parasito. O mesmo foi genotipado como TcII com o marcador 24S $\alpha$  do DNA ribossomal e pela PCR/RFLP do gene citocromo oxidase II. Esses resultados corroboram a importância de estudos que avaliam a dinâmica da infecção de *T. cruzi* e das DTU que circulam em animais selvagens.

### **Introdução**

Estudos envolvendo doenças parasitárias e animais selvagens são extremamente valiosos para a compreensão da dinâmica de infecções e endemias que podem afetar humanos e animais domésticos. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida), um protozoário parasito multi-hospedeiro faz parte desse grupo, sendo capaz de infectar sete ordens de mamíferos, tendo como vetores insetos hematófagos da família Reduviidae (Jansen et al.,

2015). Subdividido geneticamente em seis *Discrete Typing Units* (DTU, TcI-TcVI), TcI e TcII são amplamente dispersos nas áreas de distribuição do parasito em todo o território brasileiro. No entanto, no Estado do Paraná, o genótipo TcII já foi encontrado infectando humanos e triatomíneos, mas nunca foi encontrado em mamíferos. Para tanto, esse estudo investigou a ocorrência natural do *T. cruzi* em mamíferos selvagens capturados em fragmentos florestais urbanos de Mata Atlântica em Maringá no Paraná.

## Materiais e métodos

### *Aspectos éticos*

O trabalho foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, nº 42881) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Maringá (nº 023/2014).

### *Captura dos mamíferos e colheita de amostras de sangue*

Foram capturados mamíferos selvagens de dois fragmentos florestais de Maringá: Parque Cinquentenário e Parque do Ingá. Para a captura de gambás e dos pequenos roedores foram utilizadas armadilhas de arame do tipo *live trap*. Morcegos foram capturados com redes de neblina. Gambás, roedores e morcegos foram anestesiados, de maneira não prejudicial, para a colheita de sangue. O sangue colhido foi cultivado em meio NNN/LIT.

### *Detecção dos parasitos e genotipagem do isolado*

Amostras de sangue foram armazenadas em solução de guanidina/EDTA para subsequente extração de DNA. 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 Miyamoto et al. (2006) e os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese de gel de poliacrilamida a 4,5%, seguido de coloração com nitrato de prata. A genotipagem do isolado procedeu de acordo com Sá e colaboradores (2013) por meio da PCR/RFLP da citocromo oxidase II e do gene ribossomal 24S $\alpha$ .

## Resultados e Discussão

Foram capturados 12 gambás *Didelphis albiventris*, cinco *Rattus rattus* e 35 morcegos pertencentes a cinco espécies: *Artibeus lituratus* (n=25), *Carollia perspicillata* (n=3), *Platyrrhinus lineatus* (n=1), *Pygoderma bilabiatum* (n=2) e *Sturnira lilium* (n=4).

Dos 35 morcegos examinados, a PCR demonstrou a presença de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi* em dez indivíduos da espécie *A. lituratus* (10/25) perfazendo 40% de positividade para esta espécie. Para as demais espécies de morcego capturadas, o fragmento específico de kDNA não foi detectado (Tabela 1). A PCR não foi realizada para os cinco *R. rattus* amostrados, enquanto que para *D. albiventris* (12/12) a PCR demonstrou 100% de positividade (Tabela 1).

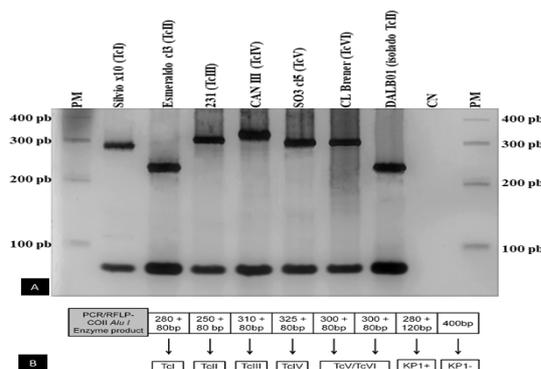
*A. lituratus* é uma espécie de morcego muito comum em ambientes antropizados. Exibem uma grande área de forrageamento, mesmo em áreas verdes em meio a urbanização, o que facilitaria uma maior chance de infecção por diversos agentes patogênicos, incluindo o *T. cruzi* (Nunes et al., 2016). Por ser uma espécie sinantrópica, *A. lituratus* pode atuar como mantenedor e dispersor de parasitos em ambientes perturbados (Jansen et al., 2015; Nunes et al., 2016). Isso explicaria a alta taxa de infectividade detectada pela PCR (Tabela 1). Contudo, hemoculturas foram negativas para todos os morcegos amostrados (Tabela 1). Jansen e colaboradores (2015) relatam que menos de 40% dos animais examinados estão infectados, com o encontro de hemoculturas positivas em apenas 10% dos espécimes examinados.

Todos os 12 *D. albiventris* amostrados foram positivos para PCR (100%), com uma hemocultura positiva para *T. cruzi* perfazendo um isolado do parasito (Tabela 1), sendo este, genotipado como TcII (Figura 1). Em infecções recentes ou em parasitemias transitórias com picos que flutuam ao longo do tempo, hemoculturas positivas podem ser observadas, enquanto que em infecções mais antigas, com baixa prevalência de parasitos sanguíneos, o isolamento se torna mais laborioso (Jansen et al., 2015). Isso explica o fato de que as amostras dos demais *D. albiventris* e dos morcegos examinados, embora com PCR positiva, foram negativos em hemocultura.

**Tabela 1** – Mamíferos capturados e examinados quanto à presença de *T. cruzi* em um fragmento florestal urbano de Maringá, Paraná.

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
<i>Rattus rattus</i> *	5	-	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>46,8</b>	<b>1,92</b>

\* Detecção por PCR não realizada para esta espécie amostrada.



**Figura 1** – Amplificação e perfis dos fragmentos de restrição da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida 6% usado para detecção e genotipagem das DTU de isolados de *T. cruzi*. (A) Padrões de controle das cepas de *T. cruzi* e genotipagem do isolado obtido de *D. albiventris* (DALB01). (B) Esquema de genotipagem para determinação das DTU de *T. cruzi* por PCR RFLP (Sá et al., 2013). CN, controle negativo; PM, peso molecular, 100pb DNA ladder.

## Conclusões

Demonstramos a presença de DNA de *T. cruzi* em gambás e morcegos, com a obtenção de um isolado do parasito. O isolado obtido foi genotipado como pertencente à DTU TcII com o marcador 24S $\alpha$  do DNA ribossomal e pela PCR/RFLP do gene mitocondrial da citocromo oxidase II. TcII foi demonstrado pela primeira vez em um mamífero de vida livre no estado do Paraná, conferindo um achado incomum. Esses resultados demonstram a importância de estudos que avaliem a dinâmica da infecção de patógenos que circulam em animais selvagens, como o ciclo enzoótico do *T. cruzi* em mamíferos selvagens de vida livre, com atenção especial à fragmentos florestais urbanos.

## Agradecimentos

Ao CNPq e a Fundação Araucária.

## Referências

- 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.** 2016.
- SÁ A.R., STEINDEL M., DEMEU L.M., LÜCKEMEYER D.D., GRISARD E.C., NETO Q.A., ARAÚJO S.M., TOLEDO M.J., GOMES M.L. Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasites Vectors**, 23, e363, 2013.