

## DETECÇÃO MOLECULAR DE *Trypanosoma cruzi* EM GAMBÁS *Didelphis albiventris* CAPTURADOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Maria Fernanda Lopes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ingrid Giarola Matias dos Santos, Taís Protzek Ferreira, Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador). E-mail: mjotoledo@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

**Ciências Biológicas, Parasitologia, Protozoologia de Parasito**

**Palavras-chave:** *Trypanosoma* spp., reservatório silvestre, PCR

### RESUMO

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário causador da doença de Chagas (DC), capaz de infectar a maioria das espécies de mamíferos, como os marsupiais do gênero *Didelphis* spp. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de *Trypanosoma* spp. em gambás *Didelphis albiventris* capturados no Estado do Paraná, Brasil, através de métodos moleculares. Foram obtidas autorizações do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade e da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) para captura, coleta, transporte e análise de material biológico. Os animais foram capturados no campus sede da UEM e no Parque do Ingá, em Maringá, no campus sede da Universidade Estadual do Norte do Paraná, em Bandeirantes, e na Mata São Francisco, em Cornélio Procópio / Santa Mariana, no Paraná. Para as capturas foram utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk e foram coletadas amostras de sangue dos animais capturados para realização de hemocultura (HC) e de reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR). Das 49 amostras de sangue de gambás analisadas, apenas uma apresentou hemocultura positiva (1/49, 2,0%). Sete de dezessete (41,18%) amostras apresentaram resultado positivo para *Trypanosoma* spp. na cPCR, confirmando que esses marsupiais são importantes reservatórios de *Trypanosoma* spp. no Estado do Paraná. A técnica de cPCR apresentou capacidade de detecção desses parasitos em mamífero silvestre, podendo ser empregada em estudos de epidemiologia da DC.

### INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado, agente etiológico da doença de Chagas (DC). Diversos mamíferos podem atuar como reservatório deste parasito, dentre eles, destacam-se os marsupiais do gênero *Didelphis* spp., popularmente conhecidos como gambás (TELLERIA & TIBAYRENC, 2017). Entre as quatro espécies de gambás encontradas no Brasil, o gamba-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) é o mais comum no Estado do Paraná (DROZINO et al., 2019), onde também ocorre, em menor proporção, o gamba-da-orelha-preta (*Didelphis aurita*). Para a detecção de *T. cruzi* nestes animais foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, cujos iniciadores se anelam nas regiões conservadas (de 120 pb) e amplificam as regiões variáveis (de 330 pb) dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi* (AVILA et al., 1991).

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Aspectos éticos:** Foi obtida concessão do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para captura e coleta de material biológico na Universidade Estadual de Maringá (UEM) e no Parque do Ingá, no município de Maringá, bem como na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), no município de Bandeirantes, e na unidade de conservação Mata São Francisco, em Cornélio Procópio / Santa Mariana, no Paraná: ICMBIO 77912-2, ICMBIO 89104-1 e ICMBIO 85317-1. Foi também obtido parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM, nº 3775080223.

**Captura e coleta de material biológico dos animais:** Para captura dos gambás foram utilizadas armadilhas *live trap* do tipo Tomahawk acionadas por pedal e iscadas com frutas. As armadilhas eram colocadas à noite, a partir das 18:00 h, e inspecionadas a cada 30 minutos, até as 23:00 h. Após anestesia com xilazina e cetamina, era coletado cerca de 1 mL de sangue em tubos contendo anticoagulante EDTA para a realização da cPCR, hemoculturas e esfregaços sanguíneos.

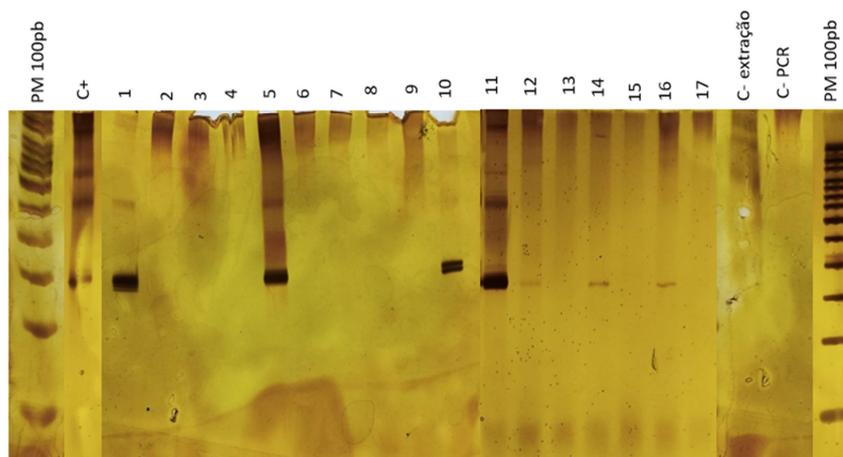
**Hemocultura:** 400 µL de sangue de cada animal eram transferidos para dois tubos de 15 mL contendo 3 mL de meio de cultura LIT. As culturas foram incubadas a 28 °C em estufa B.O.D. e após 30, 60, 90, 120 dias era realizada análise microscópica de ~10 µL para verificar a ocorrência e a multiplicação de parasitos.

**Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR):** o DNA foi extraído utilizando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. A partir do DNA extraído foi realizada sua amplificação em um termociclador automático (MJ Research, PTC-150). Foi utilizado 2 µL de DNA de

cada amostra, Tampão 10X, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeos, 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 25 pmoles de cada iniciador para 10 µL de reação. Foram utilizados os iniciadores 121 e 122 que amplificam fragmentos de 330 pb da região variável do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 49 amostras de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*). Apenas um gambá (1/49, 2,04%), capturado em Bandeirantes, apresentou hemocultura positiva. Foi observada forma tripomastigota com uma semana de incubação. Deste total de amostras, 17 (34,69%) foram analisadas pela técnica de cPCR e sete delas (41,18%) apresentaram resultado positivo, o que confirma o papel destes marsupiais como reservatório de tripanossomatídeos no estado. Este resultado mostra que a técnica de cPCR apresenta capacidade de detecção desses parasitos em sangue de animal silvestre. Entretanto, ela não permite identificar a espécie de *Trypanosoma* presente nos gambás, pois os iniciadores utilizados na PCR-kDNA, além de reconhecer sequências do kDNA de *T. cruzi*, também reconhecem sequências de *T. rangeli*, um tripanossomatídeo não patogênico para humanos (VALLEJO et al., 1999). Um gel com os resultados representativos da cPCR é mostrado na Figura 1.



**Figura 1** – Gel de poli-acrilamida mostrando produtos específicos de ~330 pb do minicírculo do kDNA de tripanossomatídeos no sangue dos animais. Canaletas: PM 100 pb (DNA ladder); C+: controle positivo da PCR (DNA de cultura da cepa Y de *T. cruzi*); 1 a 17: amostras analisadas (1, 5, 10, 11, 12, 14 e 16, amostras positivas); C-: controle negativo da extração; C- PCR: controle negativo da reação.

## CONCLUSÕES

Sete (41,18%) de 17 amostras apresentaram resultado positivo para a presença de *Trypanosoma* spp. confirmando o papel do gambá-de-orelha-branca *Didelphis albiventris* como reservatório no ciclo de transmissão silvestre da doença de Chagas no Estado do Paraná.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro (bolsa de Iniciação Científica) e a equipe do Laboratório de Doenças de Chagas e Parasitologia Molecular da UEM pelo apoio e infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

ÁVILA, H. A. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 31, n.9, p. 2421-2426. 1993.

DROZINO, R. et al. *Trypanosoma* Found in Synanthropic Mammals from Urban Forests of Paraná, Southern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.19, n.11, p. 1-5, 25 oct. 2019.

TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiases Chagas Disease: One Hundred Years of Research**. 2. ed. Montpellier: Elsevier, 2017.

VALLEJO G. A. et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, vol. 72, p. 203-212. 1999.