



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE,
DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, PRODUÇÃO E
AGRICULTURA FAMILIAR – SEMAGRO



INSTITUTO DE MEIO AMBIENTE DE MATO GROSSO DO SUL –
IMASUL

GERÊNCIA DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

RELATÓRIO FINAL

Ecologia dos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi* em Mato Grosso do Sul:
estudo em áreas com diferentes características de ocupação

Número da autorização: 006/2020

Nome do Responsável: Filipe Martins Santos

Universidade Católica Dom Bosco

12 de Novembro de 2023

1. Introdução:

O autor do presente relatório vem trabalhando com a ecologia e ciclos de transmissão dos Tripanossomatídeos há quase uma década, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. O grupo vem formando profissionais no estudo dos ciclos de transmissão desses parasitas exemplificado por meio de dissertações e teses defendidas nos programas de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária/UCDB e Pós-graduação em Biologia Parasitaria/IOC/FIOCRUZ-RJ. Dentro da Família Trypanosomatidae são reconhecidos 25 gêneros (D'ávila-Levy et al., 2015; Maslov et al., 2019; Kostygov et al., 2020; Luke's et al., 2021) com o ciclo de vida heteroxênicos, com a participação de dois hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados, ou monoxênicos, quando completam seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro, geralmente insetos (Wallace et al., 1983; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008; Rey, 2008).

Os Tripanossomatídeos heteróxeos incluem seis gêneros: *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Paraleishmania*, *Porcisia*, *Trypanosoma* e *Phytomonas* (Hoare, 1972; Merzlyak et al., 2001; O'Donoghue, 2017; Malavazi et al., 2020). Dentro desses gêneros destacamos o *Trypanosoma cruzi*, agente patogênico da Doença de Chagas (DC) uma das oito doenças tropicais classificadas como negligenciadas (Lindoso; Lindoso, 2009), com aproximadamente 14 milhões de casos na América Latina (Almeida et al., 2009). As constantes modificações dos habitats, e conseqüente fragmentação da paisagem original vem sendo apontadas como principais causas do aparecimento de doenças emergentes e re-emergentes, que podem resultar em danos consideráveis à saúde humana. O novo perfil epidemiológico da DC vem ocorrendo por meio da transmissão oral (Coura, 2006; Dias et al., 2008; Roque et al., 2008; Xavier et al., 2014). Entretanto, o controle dos surtos orais que apresentam caráter sazonal e repetitivo é dificultado, uma vez que não se conhece os ciclos enzoóticos.

A ocorrência de *T. cruzi* em Mato Grosso do Sul não se restringe ao ambiente natural, visto que casos em humanos foram registrados em 12 municípios do distrito sanitário de Rio Verde, MS (Borges-Pereira et al. 2001). O ciclo peridoméstico de *T. cruzi* foi reportado na comunidade quilombola de Furnas do Dionízio (Jaraguari, MS) envolvendo animais domésticos, selvagens e vetores (gambás, suínos e *Triatoma sordida*) (Cominetti et al., 2011). Ainda, Cominetti et al. (2013) observaram a infecção por *T. cruzi* em quatro espécies de triatomíneos vetores (*Panstrongylus megistus*, *P. geniculatus*, *T. matogrossensis* e *T. sordida*), em oito cidades do estado do MS

(Aparecida do Taboado, Aquidauana, Caarapó, Corumbá, Dourados, Jaraguari, Rochedo e Terenos), alertando para o risco de transmissão de *T. cruzi* para os seres humanos em áreas domiciliares e peridomiciliares.

Outro grupo de destaque é gênero *Leishmania* que causa um complexo de doenças severas nos seres humanos e são caracterizadas por diferentes formas clínicas, impulsionado não apenas pela resposta imune do hospedeiro, mas também pela espécie do parasita infectante (Patiño et al., 2021; Maruf et al., 2023). Fatores socioeconômicos, a proximidade de remanescentes de vegetação natural e o aumento global da temperatura demonstraram associações significativas com a incidência de leishmaniose visceral e cutânea em populações vulneráveis de regiões tropicais em desenvolvimento, aumentando o risco de infecções (Valero et al., 2020). Cerca de 1,2 milhões de casos de Leishmaniose humana foram relatados em todo o mundo, com quase 75% deles ocorrendo em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica, Peru e Colômbia (Alvar et al., 2012).

Assim, com o avanço das novas tecnologias, como o Sequenciamento de Nova Geração, podemos detectar diversos parasitas da família Tripanossomatídeos simultaneamente, assim podemos expandir na presente proposta a detecção desses parasitas nos hospedeiros coletas em vez de ficar restrito a *T. cruzi*, uma vez que os estudos acerca do parasitismo por Tripanossomatídeos em hospedeiros vertebrados venham sendo reportados em áreas naturais como o Pantanal, outras regiões do estado carecem de informações detalhadas a respeito dos ciclos de transmissão. Este é o caso do município de Campo Grande, área de relevante biodiversidade e pressão antrópica, no qual recentemente isolou-se *T. cruzi* (Tcl) em morcegos (Comunicação pessoal) e *Leishmania infantum* em quatis (de Macedo et al. 2023).

2. Objetivos:

Determinar os ciclos de transmissão de Tripanossomatídeos em hospedeiros vertebrados em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS

Objetivos Específicos

- Verificar a fauna de mamíferos existentes em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS
- Verificar a competência infectiva de Tripanossomatídeos em roedores em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS
- Verificar a competência infectiva de Tripanossomatídeos em marsupiais em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS

- Verificar a competência infectiva de Tripanossomatídeos em primatas em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS
- Verificar a competência infectiva de Tripanossomatídeos em carnívoros em Unidades de Conservação no Município de Campo Grande/MS

3. Metodologia:

4.1. Áreas de estudo

O estudo foi realizado no município de Campo Grande - MS em duas Unidades de Conservação Estadual de Proteção Integral (Parque Estadual do Prosa e o Parque Estadual da Mata do Segredo), além do Parque das Nações Indígenas. O presente trabalho foi realizado de acordo com o (I) Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) protocolo nº 70946-2, (II) Comitê de Ética e Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco, protocolo nº CEUA 013/2020 e (III) IMASUL/licença número 006/2020, processo 71/401070/2020.

4.2. Parque Estadual da Mata do Segredo

Durante o período de vigência realizamos coletas de primatas não humanos para a realização da Tese de doutorado do aluno Oscar Fernandes Junior (Título: Primatas não-humanos como indicadores da diversidade de Kinetoplastida em fragmentos florestais urbanos no centro-oeste do Brasil [defesa agosto/2023]). Para a captura de primatas foi utilizamos primeiramente “ceva” ou habituação através da oferta de alimentos que consisti em:

1. Localizar os grupos e registrar o tipo de habitat, horário de atividade, hábitos alimentares e coordenadas geográficas com o uso de um GPS;
2. Observar a estrutura do grupo (número de animais, faixas etárias);
3. Com base nessas observações selecionar o local para instalação das plataformas de captura;

As plataformas foram construídas a uma distância de 2 metros do solo e nelas foram instaladas três armadilhas *Tomahawk* de 90x45x50 cm. Próximo as armadilhas e mesmo dentro delas, ofereceremos frutas (bananas) para que os primatas se habituem às armadilhas. As frutas trocadas pelo menos cinco vezes por semana. Porém, nessa fase, as armadilhas não estavam armadas. Para avaliar a habituação dos primatas às armadilhas, instalamos armadilhas fotográficas camufladas (Bushnell®, Trophy cam, USA), que foram programadas para operar 24 horas por dia em modo filme e câmera.

Assim, podíamos avaliar quais espécies ou grupos estavam frequentando a plataforma, bem como os horários de alimentação.

Quando verificarmos que os animais já estavam habituados às armadilhas, inclusive entrando dentro delas, armamos os equipamentos para conduzir as capturas durante 15 dias. De setembro de 2020 a novembro de 2020, foram realizadas as habituações dos Macacos-prego (*Sapajus cay*). Posteriormente, de dezembro de 2020 a setembro de 2021, as capturas ocorreram durante cinco dias consecutivos a cada três meses.

Todos os indivíduos capturados foram sedados com uma combinação de cloridrato de midazolam (0,5 mg/kg) e cloridrato de cetamina (12 mg/kg), pesados, medidos (cabeça e corpo) e marcados com microchip. Também incluímos em nosso protocolo de sedação o antagonista benzodiazepínico flumazenil (0,025 mg/kg) como reversor anestésico. Após recuperação total da sedação, os animais foram soltos nos locais de captura. Amostras biológicas (sangue total) foram coletadas pela veia femoral, após protocolo de assepsia contendo sabão bactericida, iodo e álcool 70% (três vezes cada). Das amostras coletadas foram realizados testes parasitológicos, sorológicos e moleculares para detecção de Tripanossomatídeos.

Na mesma área começamos um projeto de doutorado do aluno Wesley Arruda Gimenes Nantes para detecção de Tripanossomatídeos em pequenos mamíferos utilizando armadilhas do tipo *Tomahawk* (45 x 17,5 x 15 cm) e *Sherman* (31 x 8 x 9 cm), as armadilhas permanecerão abertas no período noturno, sendo checadas no início da manhã e mantidas fechadas durante o dia, rearmadas no final da tarde, durante 15 dias de coletas. Porém, devido a desistência do aluno só foram realizados dois campos (maio e junho de 2021), representando a fase de levantamento da comunidade de pequenos mamíferos presentes na área. Todos os indivíduos foram marcados, pesados, medidos e soltos nos mesmos locais de capturas.

4.3. Parque Estadual do Prosa e Parque das Nações Indígenas

No Parque Estadual do Prosa foram coletadas amostras de quatis (*Nasua nasua*) para detecção de Tripanossomatídeos nos meses de outubro/2022, fevereiro/2023 e março/2023 com as armadilhas *box-trap* (90 x 45 x 50 cm). Todos os indivíduos foram sedados (Zoletil®100 [associação de Tiletamina e Zolazepan]), marcados, pesados, medidos e soltos nos mesmos locais de capturas. Amostras biológicas (sangue total) foram coletadas pela veia femoral, após protocolo de assepsia contendo sabão bactericida, iodo e álcool 70%. Das amostras coletadas serão destinadas para a

realização de testes parasitológicos, sorológicos e moleculares para detecção de Tripanossomatídeos.

No ano de 2023 parque das Nações Indígenas foram realizadas capturas de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no ano de 2023 nos meses de março, maio, junho, julho e agosto. A equipe de captura foi composta por duas ou três pessoas para busca aleatória dos animais nos ambientes abertos da área. Após o avistamento do animal o equipamento de captura foi preparado e iniciado a abordagem a pé. A estratégia de aproximação foi o deslocando lento, descrevendo uma trajetória com formato aproximado de espiral ao redor do animal, evitando movimentar-se diretamente na sua direção. O contato visual entre atirador e o animal foi mantido continuamente durante a aproximação. A meta do atirador foi aproximar-se até cerca de 10 m dos animais, distância considerada segura para tiro. Apenas as capivaras posicionadas lateralmente e dentro da distância preconizada foram escolhidas como alvo. Para disparar os dardos, utilizamos uma pistola de CO₂ com pressão regulável (Distinject®, modelo 35) ou zarabatana (Figura 1). A contenção química foi por meio da associação de Zoletil®100 (associação de Tiletamina e Zolazepan) (Piovezan et al. 2007). Amostras biológicas (sangue total) foram coletadas pela veia femoral, após protocolo de assepsia contendo sabão bactericida, iodo e álcool 70%. Das amostras coletadas serão realizados testes parasitológicos, sorológicos e moleculares para detecção de Tripanossomatídeos.



Figura 1. Dardo anestésico disparado para contenção de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Parque das Nações Indígenas, Campo Grande – MS.

4. 4. Teste Parasitológico

Culturas axênicas foram realizadas colocando 0,3 ml de sangue dos mamíferos coletados (macacos-prego, quatis e capivaras) em meios bifásicos Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) suplementados com 10% de soro fetal bovino. Os tubos foram incubados a 26-28°C e examinados semanalmente por até quatro meses. Consideramos positividade nas culturas sanguíneas como indicativo de parasitemias elevadas e potencial fonte de infecção para vetores no momento da captura.

4. 5. Testes Moleculares

A cultura axênica positiva em fase exponencial foi amplificada e depositada na "Coleção de Trypanosoma de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores" (www.coltryp.fiocruz.br). A cultura também foi submetida à extração de DNA usando o método fenol-clorofórmio. O DNA genômico de amostras de sangue foram extraídas usando o Kit Mini de DNA de Sangue QIAamp (Qiagen®, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi diluído em 50 µl de tampão de eluição e armazenado a -20°C até o diagnóstico molecular.

A detecção de tripanossomatídeos no DNA genômico extraído (cultura e sangue total) foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada (nPCR) usando como alvo o gene rDNA 18S do tripanossoma (aproximadamente 650 pb) (Smith et al., 2008). Os produtos de nPCR foram purificados usando o kit de purificação de banda de gel e DNA de PCR Illustra GFX (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). A amostra foi sequenciada em ambas as fitas de DNA com o Kit de Sequenciamento por Ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma plataforma ABI 3730 DNA disponível na plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ. As sequências foram editadas, alinhadas e corrigidas usando o software BioEdit.

As amostras positivas de sangue total no nPCR foram quantificadas usando o dispositivo de DNA Qubit de alta sensibilidade (Invitrogen®, Estados Unidos). Amostras com uma concentração mínima de 20 ng/µl em um volume de 20 µl, totalizando um mínimo de 400 ng por amostra de DNA, foram submetidas ao Sequenciamento de Próxima Geração de acordo com os protocolos recomendados pela Illumina (Protocolo Demonstrado pela Illumina: Preparação de Biblioteca para Sequenciamento Metagenômico) e sequenciadas em uma plataforma Illumina HiSeq2500 (PE250), utilizando primers descritos por Santos et al., (202).

4.6. Análise NGS no R

Os dados gerados por NGS foram importados na plataforma R v3.6.2, onde todas as análises foram realizadas (R Core Team, 2021). As sequências foram analisadas usando o pacote DADA2 v1.14.0, seguindo o pipeline de análise conforme descrito no tutorial (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) (Callahan et al., 2016). Além disso, a taxonomia foi atribuída usando o SILVA v132. A tabela de Variantes de Sequência de Amplicon (ASV), a taxonomia atribuída e as informações dos metadados das amostras foram combinadas como um objeto phyloseq (pacote phyloseq versão 1.30.0) (McMurdie e Holmes, 2013). Para determinar a ocorrência de espécies por amostra, um corte de leitura foi estabelecido, normalizando o total de leituras por amostra na tabela ASV para 100.000 leituras, e ASVs que apresentaram ≤ 50 leituras na amostra foram excluídas da análise (Santos et al., 2022).

4.7. Análise Filogenética

As leituras ASV foram alinhadas a outras sequências de cinetoplastídeos obtidas do banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando o algoritmo L-INS-i no software MAFFT v.7.0 (Katoh, 2013). O alinhamento foi inspecionado e editado manualmente no Mega7 (Kumar et al., 2016). Foram realizadas inferências de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). Para cada análise, os melhores modelos de substituição de bases foram escolhidos de acordo com o critério de informação de Akaike corrigido (cAIC) no jModelTest-2.1.10 (Darriba et al., 2012).

4. Resultados e discussão com contribuições para Gestão e Manejo das Unidades de Conservação

No total foram capturados 27 indivíduos de Macacos-prego (15 fêmeas e 12 machos) (Figura 2). Desses animais 16 indivíduos foram positivos nos testes moleculares para Tripanossomatídeos. Co-infecções foram mais predominantes do que infecções isoladas. De fato, apenas duas fêmeas apresentaram infecções isoladas por *Trypanosoma* sp. DID. Foram detectadas as seguintes infecções: *Trypanosoma* sp. DID (n=16), *Leishmania infantum* (n=12), *Trypanosoma cruzi* (n=14), *Trypanosoma minasense* (n=09) e *Leishmania amazonensis* (n=02) (Tabela 1). Desses resultados estamos ainda gerando os produtos que serão publicados. Não observamos indivíduos com alta parasitemia por meios das culturas. Referentes aos pequenos mamíferos foram capturados 42 indivíduos de duas espécies (*Gracilinanus agilis* [n=37 - 16 fêmeas e 21 machos]) e *Oecomys cleberi* [n=05 - 04 fêmeas e 01 machos]) (Figura 3 e 4). Não foram

coletadas amostras biológicas, pois estávamos avaliando a estrutura da comunidade de pequenos mamíferos na área.

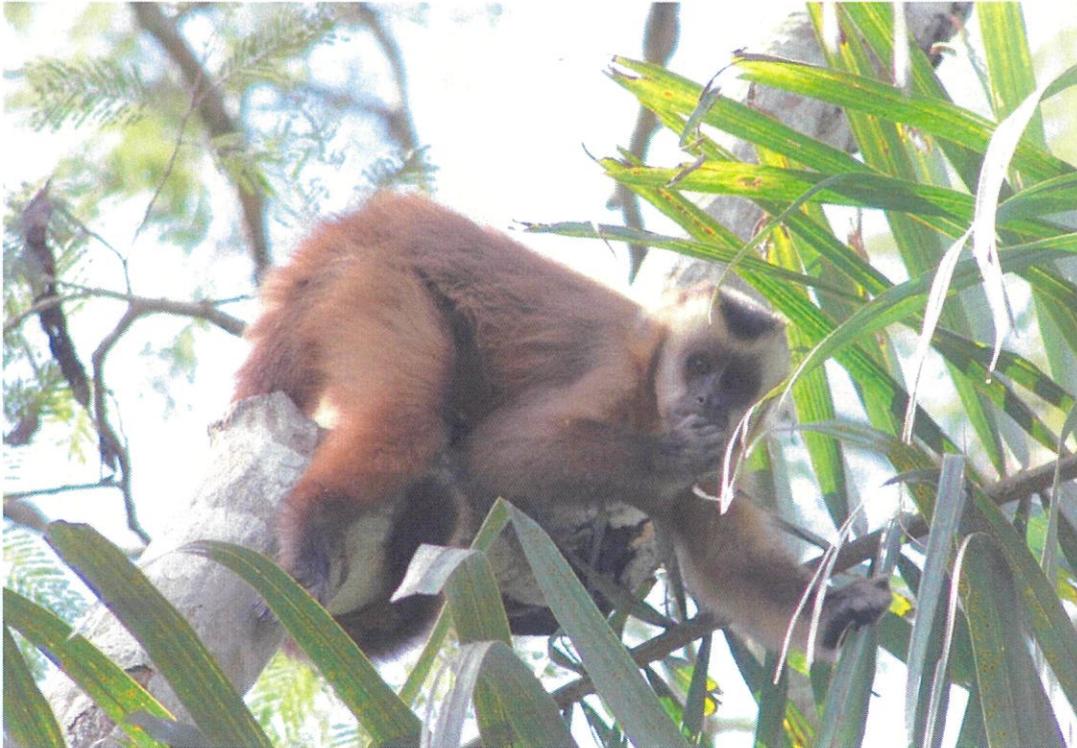


Figura 2. Indivíduos de Macaco-prego (*Sapajus cay*) solto após a recuperação do protocolo anestésico no Parque Estadual Mata do Segredo, Campo Grande-MS.



Figura 3. Indivíduos de *Gracilinanus agilis* coletado e anilhado no Parque Estadual Mata do Segredo, Campo Grande-MS.



Figura 4. Indivíduos de *Gracilinanus agilis* solto após coleta no Parque Estadual Mata do Segredo, Campo Grande-MS.

Tabela 1. Infecções e coinfeções por Tripanossomatídeos em macacos-prego (*Sapajus cay*) amostrados no Parque Estadual Mata do Segredo, Campo Grande-MS. Campo Grande, Centro-Oeste do Brasil.

ID	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. minasense</i>	<i>Trypanosoma sp. DID</i>
307	x	x		x	X
457	x	x		x	X
458	x	x		x	X
486	x	x		x	X
488	x	x		x	X
490	x	x		x	X
491	x	x		x	X
492	x	x		x	X
304B					X
304A	x				X
306	x	x			X
480B					X
300B	x				X
302	x	x	x		X
466	x	x			X
465	x	x	x	x	X

Nossos resultados mostram que os Parque Estadual Mato do Segredo mantêm diversos ciclos de transmissão de Tripanossomatídeos, uma vez que encontramos cinco espécies de parasitas na área *Trypanosoma sp. DID*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *T. cruzi* e *T. minasense*. O recém-descrito *Trypanosoma sp. DID* por Rodrigues et al., (2019) foi detectado em todos os primatas não humanos (NHP) amostrados aqui, demonstrando que essa nova Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU) está amplamente

dispersa em primatas não-humanos, independentemente de sua estratégia de transmissão. De fato, após Rodrigues et al., (2019) demonstrar que o *Trypanosoma* sp. DID está posicionada em um clado que inclui exclusivamente em hospedeiros quirópteros, diversos outros trabalhos vem detectando em outros grupos de hospedeiros mamíferos como *Didelphis* spp. no bioma Cerrado e Mata Atlântica, assim como *Thylamys macrurus*, *Oecomys mamorae* e *Clyomys laticeps* no Pantanal (Rodrigues et al., 2019; Nantes et al., 2020; Dario et al., 2022; Santos et al., 2022). O fato de encontrar o *Trypanosoma* sp. DID em primatas não-humanos juntamente com os estudos prévios, reforça que o nicho dessa espécie de parasita não cultivado pode estar mais relacionado à extração arbórea.

A detecção de *T. minasense* sugere que esse parasita pode estar presente em ambientes com um foco significativo em conservação, uma vez que esse parasita só vem sendo detectadas em primatas silvestres em ambientes preservados. Desde que *T. minasense* foi descrito pela primeira vez infectando saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) no Brasil por Chagas em 1909 (Coura, 2013), foi amplamente documentado, incluindo saguis, macacos-prego, macacos-esquilo, bugios e macacos-aranha da América Central à América do Sul (Deane et al., 1974; Sousa et al., 1974; Sousa e Dawson, 1976; Martínez et al., 2016). Seus estágios de desenvolvimento e seu vetor permanecem desconhecidos (Deane e Damasceno, 1961; Rodhain, 1941; Dias e Campos-Seabra 1943). Além disso, esse parasita não se desenvolve em hemocultura, apenas em esfregaços de sangue (Ziccardi et al., 1996). Além disso, os primatas não humanos em Campo Grande demonstraram estar expostos e possivelmente participando de um sistema de hospedeiros reservatórios para *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, parasitas zoonóticos de grande importância para a Saúde Pública.

No Parque Estadual do Prosa foram coletados 38 indivíduos de quatis (Figura 5), e no que se referem as capivaras capturas no parque das Nações Indígenas foram capturas 35 indivíduos (Tabela 2), sendo 26 indivíduos únicos (09 fêmeas e 17 machos) e 9 recapturas (Figura 6), porém os testes diagnósticos dos quatis e capivaras ainda estão sendo realizados.



Figura 5. Coleta de sangue realizada em quatis (*Nasua nasua*) no Parque Estadual do Prosa, Campo Grande - MS.



Figura 6. Coleta de sangue realizada em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Parque das Nações Indígenas, Campo Grande - MS.

Com intuito de aproveitar as coletas das capivaras para identificação de Tripanossomatídeos, devido a estudo prévio realizado com amostras de capivaras coletadas entre os meses maio/2017 e agosto/2018 na mesma área de estudo, nosso grupo de pesquisa detectou a presença de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa (SFG) nesses indivíduos. Assim para aproveitar as coletas desses indivíduos

concomitantemente iniciamos um projeto de doutorado no aluno Willian Oliveira de Assis (Fatores de Risco associados a infecção por *Rickettsia* do grupo de febre maculosa para os seres humanos em parque urbano em Campo Grande, Mato Grosso do Sul). A presente proposta tem como objetivo determinar os Fatores de Risco associados a infecção por *Rickettsia* do grupo de febre maculosa para os seres humanos no Parque das Nações Indígenas, Campo Grande. Com isso pretendemos identificar os possíveis fatores de riscos associados à transmissão aos seres humanos. No final iremos criar um mapa de risco dinâmico no tempo para o Parque das Nações Indígenas por cruzar as informações sobre distribuição espacial dos carrapatos, bem como sua prevalência de infecção por *Rickettsia*, seleção de habitat das capivaras e uso do espaço por humanos.

Tabela 2. Campanhas de Captura de Capivara no Parque das Nações Indígenas, *Campo Grande - MS.* realizadas no ano de 2023.

Mes	Dias	Capturas	Recapturas	Indivíduos	Sexo
Março	02/03 – 23/03 (10 dias)	11	0	11	3 machos e 8 fêmeas
Maio	22/05 – 25/05 (3 dias)	4	2	2	1 macho e 3 fêmeas
Junho	06/06 e 22/06 (2 dias)	2	1	1	1 macho e 1 fêmea
Julho	17/07 – 24/07 (6 dias)	10	0	10	4 machos e 6 fêmeas
Agosto	02/08 – 25/08 (6 dias)	8	6	2	3 machos e 5 fêmeas
TOTAL	27 dias	35	9	26	9 machos e 17 fêmeas

6. Conclusão

Em suma observamos que os macacos-prego coletados no Parque Estadual Mata do Segredo estão participando de diversos ciclos de transmissão no município de campo grande e podem estar servindo com efeito diluidor de parasitas de importância para a saúde pública como *T. cruzi* e *L. infantum*. Mostrando a importância do monitoramento constante desses hospedeiros e outros hospedeiros como o *G. agilis* e *O. cleberi* espécies de pequenos mamíferos que já foram descritas infectadas por esses parasitas em outras áreas. Outros hospedeiros como quatis e capivaras foram coletados e estudos ainda estão para ser realizados para determinar a importância desses hospedeiros na participação desses ciclos de transmissão.

7. Referências bibliográficas.

Almeida, E. A et al. Evolução fatal da co-infecção doença de Chagas/Aids: dificuldades diagnósticas entre a reagudização da miocardite e a miocardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.199-202, 2009.

Alvar, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

Borges-Pereira, J. et al. Chagas' disease on urban population of the sanitarian district of Rio Verde, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 459-466, 2001.

Cominetti, M. C. et al. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.5, p.576-581, 2011.

Cominetti, M. C. et al. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.3, p.277-280, 2013.

Coura, J. R. Transmission of chagasis infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p. 113-117, 2006.

Coura, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, p.389-390, 2013.

D'Ávila-Levy, C. M. et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 956-965, 2015.

Dário, M. A., et al. Trypanosomatid Richness Among Rats, Opossums, and Dogs in the Caatinga Biome, Northeast Brazil, a Former Endemic Area of Chagas Disease. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 851903, 2022

Darriba, D., et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, p. 8, p. 772-772, 2012.

de Macedo GC et al. *Leishmania infantum* infecting the carnivore *Nasua nasua* from urban forest fragments in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazilian Midwest. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, p. 1050339, 2023

Deane L. M. & Damasceno R. G. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 61-70, 1961

Deane L. M. et al. Nycthemeral variation in the parasitaemia of *Trypanosoma minasense* in naturally infected marmosets of the genus *Callithrix* (Primates, Callithricidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 16 n. 1, p. 1-6, 1974.

Dias, E. & Campos-Seabra, C. A. *Trypanosoma conorrhini*, hemoparasito do rato transmitido pelo *Triatoma rubrofasciata*. Presença do vector infectado na cidade do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 301-330, 1943.

Dias, F. B. S. et al. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. **Infection, genetics and evolution : Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics In Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1278–81, dez. 2010.

Hoare, C. A. et al. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.**, 1972.

Katoh, S. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Mol Biol Evol**, v. 30, p. 772–780, 2013

Kostygov, A. Y. et al. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, v. 11, n. 3, p. 200407, 2021.

Kumar, S., et al. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

Lindoso, J. A. L.; Lindoso, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009 .

Luke's, J. et al. Characterization of a new cosmopolitan genus of trypanosomatid parasites, *Obscuromonas* gen. nov. (Blastocrithidiinae subfam. nov.). **European Journal of Protistology**, v. 79, p. 125778, 2021.

Malavazi, P. F. N. S. et al. *Trypanosomes* of vectors and domestic dogs in *Trypanosoma cruzi* transmission areas from Brazilian southwestern amazon: New mammalian host for *Trypanosoma janseni*. **Acta Tropica**, v. 210, p. 105504, 2020.

Martínez, M. F. et. al. Molecular characterization of trypanosomatid infections in wild howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 115 n. 2, p. 198–206, 2016

Maruf, S. et al. Revisiting the diagnosis and treatment of Para Kala-azar Dermal Leishmaniasis in the endemic foci of Bangladesh. **PloS one**, v. 18, n. 1, p. e0280747, 2023.

Maslov, D. A. et al. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, v. 146, n. 1, p. 1-27, 2019.

Merzlyak, E. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 161-169, 2001.

Nantes, W.A.G., et al. Trypanosomatid species in *Didelphis albiventris* from urban forest fragments. **Parasitology Research**, v. 120, n. 1, p. 223-231, 2021.

O'Donoghue, P. Haemoprotozoa: making biological sense of molecular phylogenies. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 3, p. 241-256, 2017.

Patiño, L. H. et al. Development of an amplicon-based next-generation sequencing protocol to identify *Leishmania* species and other trypanosomatids in leishmaniasis endemic areas. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00652-21, 2021.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. p. 883-883, 2008.

Rodhain, J. Notes Sur *Trypanosoma minasense* Chagas. Identité spécifique du *Trypanosome* du Saimiri: *Chrysothrix sciureus*. **Acta Biológica Bélgica**, n. 1, p. 187-192, 1941.

Rodrigues, M. S., et al. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171-181, 2019

Roque, A. L. R. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted chagas disease outbreaks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 742–749, 2008.

Santos, F. M., et al. Kinetoplastid Species Maintained by a Small Mammal Community in the Pantanal Biome. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1205, 2022.

Simpson, A. G. B. et al. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

Smith, A., et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, n.11, p. 1329-35, 2008.

Sousa O. E. et al. The prevalence of *trypanosomes* and microfilariae in Panamanian monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23 n. 5, p. 862–868, 1974.

Sousa, O. E. & Dawson, G. A. *Trypanosome* infections in the marmoset (*Saguinus Geoffroyi*) from the Panama Canal Zone. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25 n.3, p. 407–409, 1976.

Stevens, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226-232, 2008.

Valero, N.N.H.; Uriarte, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365-384, 2020.

Wallace, F. G. et al. Guidelines for the Description of New Species of Lower Trypanosomatids 1. **The Journal of protozoology**, v. 30, n. 2, p. 308-313, 1983.

Xavier, S. C. DAS C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.

Ziccardi, M. et al. The haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 501-505, 1996.