



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



**OCORRÊNCIA NATURAL DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM MORCEGOS
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

THALLYTA MARIA VIEIRA

Belo Horizonte

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**OCORRÊNCIA NATURAL DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM MORCEGOS
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

THALLYTA MARIA VIEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia

Área de concentração: Protozoologia

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Norma Melo

Co-orientação: Prof.^a Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Belo Horizonte

2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Deus, que sempre cuida de mim e é fiel!

Às minhas queridas, orientadora Dra. Maria Norma Melo e coorientadora Dra. Célia Maria Gontijo, obrigada pela base científica, orientação e ajudas incalculáveis e fundamentais para o desenvolvimento do projeto e meu crescimento pessoal e profissional. Tive o privilégio de ser orientada por profissionais exigentes, preocupadas, competentes e sábias, profissionais referências! E por pessoas humanas, carinhosas, doces, alegres, iluminadas e especiais. As admiro demais! Um dia Mara Norma foi a orientadora e Célia Maria a orientanda, e hoje as duas Marias são minhas orientadoras! As melhores orientadoras! Professora Norma, sua sabedoria e o seu sorriso alegre de menina ilumina. Você é nossa inspiração! Celinha, a sua ética e a sua positividade é encantadora. Agradeço a confiança por aceitarem trabalhar com algo novo, por terem acreditado em mim e pela força que não dispensaram para o término recorde da tese. Obrigada por terem me ensinado a ser uma pesquisadora, uma professora e uma pessoa melhor. Vocês foram e serão sempre muito importantes na minha vida, as levarei eternamente no meu coração!

Ao professor Eduardo Robson, meu orientador de Montes Claros, agradeço por ter me acompanhado nos primeiros passos no mestrado e por ter me apoiado mesmo quando decidi que ia largar um projeto de doutorado praticamente pronto para começar um do zero com os meus amados morcegos. Obrigada pela base científica, pelas orientações científicas e orientações para a vida! Suas grandiosas ajudas no desenvolvimento do projeto foram fundamentais para a realização dos trabalhos de campo. Agradeço também pela amizade e pelo exemplo.

A Soraia da Silva Oliveira, quem muito me ensinou e ajudou. Uma profissional dotada de grandiosa competência e sabedoria e que eu admiro muito. Uma pessoa que possui um bom coração e uma família maravilhosa. Alguém que eu vou carregar eternamente no meu coração com muito carinho. Soraia obrigada por tudo! Saiba que meu carinho e gratidão por você é sincero. Que Deus abençoe o seu caminho e você seja sempre muito feliz, pois você merece.

Ao professor José Dilermando, Leco, agradeço por estar junto desde a idealização do projeto. Obrigada por acreditar e apoiar o projeto. Você sempre me passava paz, força e motivação. Tenho muita admiração e carinho por você e a sua equipe.

Agradeço e dedico as pessoas mais importantes da minha vida: minha Mãe Ailde e meus irmãos Gustavo e Vinícius. Não tenho vocês ao meu lado no dia a dia já a um bom tempo, mas tenho vocês a todo instante no meu coração! Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são muito importantes para mim e eu amo vocês incondicionalmente!

Meu noivo, Thiago Neves, o turismólogo mais biólogo que muito biólogo.... Me ajudou em todas as coletas e me deu amparo nos momentos difíceis. Foi a minha base emocional e o meu companheiro de campo. Obrigada pela paciência, carinho, companheirismo, amor e incentivo dispensados sempre. Obrigada pelo trabalho e empenho no campo, que fez toda a diferença. Amo você! Agora o casamento sai! Agradeço também a Marlene, Elson, Diogo, Lara e Dan que são minha família e força.

A toda a minha querida família... agradeço com carinho, por entenderem as minhas ausências, pelo apoio, respeito e amor. Em especial à minha bisavó Maezinha e à três pessoas que sempre cuidaram de mim e foram a minha base: Minha tia Anésia (ajudou muito no projeto fazendo lanches deliciosos), e os meus amados avós Feliciano (*no coração*) e Maria Eva (*no coração*). Amo muito vocês!

Aos moradores e familiares que nos abriram a porta de suas casas e esperavam às vezes até tarde da noite as coletas acabar. Vocês fizeram parte, vocês foram essenciais e fundamentais, obrigada!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.” (Clarice Lispector).

O agradecimento especial vai a BAT EQUIPE, que por um mais de um ano... na chuva, no sol e no frio... nas alegrias, nas aventuras, nos cansaços e nas tristezas... estiveram comigo até o final. Amanda Mickaeli, Bruna Oliveira, Cristieli Gonçalves, Elisângela Desidério, Gilberto Sabino, Jhony Veloso, Leonardo Quaresma, Marcos Lopes, Patrícia Doerl, Patrícia Gomes, Pedro Vasconcelos, Ronald Santos, Sabrina Lima, Sheila Cardoso, Thiago Neves, Vera Alves, Warlen Melo e Seu Claudio, vocês foram fundamentais para esse estudo. Ter todos vocês por perto foi importante! Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade. Saibam que tenho por vocês todo carinho do mundo! No final obtive mais que uma tese, obtive aprendizados para a vida e verdadeiras amizades. Essa vitória é da BAT EQUIPE!!!!

Agradeço de todo o coração à minha segunda BAT EQUIPE, formada de amigos multidisciplinares que além de me ajudar com incentivo, carinho e motivação, me acolheram nas madrugadas, finais de semana e sempre que eu desesperada pedia socorro nas formatações, explicações e revisões. Dedico a posse do meu concurso a esses amigos, que literalmente me pegaram pela mão e disseram você vai conseguir defender em tempo récorde e estou com você! Sendo os meus amigos e anjos: Leonardo Quaresma, Daniel Dias, Gisele Lopes, Agnes Sampaio, Paula Monaliza, Leydiana Duarte, Ana Paula Venuto, Larissa Vasconcelos, Thiago Neves, Viviane Vasconcelos, Anne Faria, Maria Fernanda Maia, Leide Gonçalves, Luiz Falcão, Priscila Lopes, Fátima França, Mariana Oliveira, Ana Cláudia Maia, Francielen Moraes, Cleandson Santos, Danilo Carreiro.

Aos amigos parasitologistas que serão para sempre meus verdadeiros e queridos amigos! Soraia Silva, Paula Monaliza, Ana Paula Venuto, Evandro Costa (overnight), Ramon Brito, Andressa Noronha, Elaine Matias, Aytube Coaglio, Jordana Celeste, Ivana Rocha, Hudson Andrade, Francisco Ferreira, João Carlos França, Seu Nerizinho. Obrigada pelo incentivo, apoio, amizade e por não terem me deixado desistir. Obrigada pelo pensamento positivo e força nunca dispensados nos momentos difíceis. E pelas risadas, nas aulas e nas saídas super agradáveis. Tenho orgulho de vocês, pois além de grandes amigos, vocês são grandes profissionais!

Meu amigo Gilberto Sabino, quem eu admiro e gosto muito, obrigada pelo companheirismo no projeto piloto e no momento chamado sempre.

Deus sempre coloca mesmo anjos em nossas vidas... Gostaria de agradecer a minha ‘’anja’’ do doutorado Agnes, companheira de todas as horas e amiga fiel, que esteve ao meu lado nos momentos cruciais do experimento e da elaboração desta tese. Obrigada pelo enorme aprendizado, apoio, força, ajudas, conselhos e carinho.

A todos os meus companheiros e AMIGOS do laboratório de Parasitologia e Microbiologia do ICA, que tanto me ajudaram e motivaram, muito obrigada! Vocês são especiais e parte de mim. Agradeço a Franciellen Moraes por ter me incentivado a fazer parte do programa de Parasitologia da UFMG, e literalmente ter me guiado e tanto ajudado em BH e na UFMG.

Aqueles que me deram abrigo, carinho, ânimo e força em BH... Tia Fátima, tio Eltinho, Mel, Vívian, Lucas, Chico e Lola. Vocês fizeram o percurso ser melhor e mais fácil. Muito obrigada por tudo!!! Serei eternamente grata a vocês.

Agradeço aos amigos e amigas (que tanto me cobravam atenção!!!!), pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva e também pelo incentivo e carinho de sempre! Não citarei nomes, mas todos aqueles que me acompanharam nas alegrias e desesperos sabem o quanto foram importantes e o quanto sou grata. Meus queridos amigos, essa vitória não é minha, é nossa!

Aos amigos do Amaro Sátiro de Araújo... pela segunda vez vocês fizeram parte da minha história. Obrigada pelo apoio e incentivo! Adoro vocês. Agradeço a Ana Abreu pelas palavras de motivação e apoio.

Agradeço ao Instituto Grande Sertão - IGS e o Espeleogruppo Peter Lund - EPL, nas pessoas de Eduardo Gomes e Vanessa Barbosa, pela inspiração, apoio e amizade.

Agradeço aos caros colaboradores que contribuíram para que esse estudo fosse maior:

Ao Departamento de Parasitologia da UFMG:

Professor Dr. Marcos Pezzi Guimarães, ao Ms. Hudson Andrade dos Santos e a mestrandia Lara Ribeiro do laboratório de Parasitologia Veterinária.

Professor Dr. Pedro Marcos Linardi do Laboratório de Ectoparasitos.

Professor Dr. Stefan Michael Geiger do Laboratório de Helmintoses Intestinais.

Professor Dr. Hudson Pinto do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados.

Professora Dr. Érika Martins Braga e ao pós-doutorando Dr. Francisco Ferreira do Laboratório de Malária.

Professor Dr. Alexandre Ferreira Marques, os doutorandos Ana Paula Venuto e Ramon Brito, e o técnico Afonso da Costa Viana do Laboratorio de Imuno-Proteoma e Biologia de Parasitos.

Ao Departamento de Microbiologia da UFMG:

Professor Dr. Jacques Robert Nicoli, a pós-doutoranda Kelly Moreira Grillo Ribeiro Branco do Laboratório Ecologia e Fisiologia de Microrganismos;

Professores Dra. Paula Prazeres Magalhães e Dr. Luiz de Macêdo Farias do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbicos.

Departamento de Zoologia da UFMG:

Ao professor Dr. Almir Rogério Pepato e ao mestrando Leonardo Pereira Quaresma do Laboratório de Sistemática e Evolução de Ácaros Acariformes.

Aos professores Dra. Valéria Tavares, Dr. Luiz Falcão e Dr. Fernando Prini pelo exemplo e apoio.

Centro de Pesquisas René Rachou da FIOCRUZ:

À FIOCRUZ René Rachou, em especial aos AMIGOS do querido e competente Grupo de Estudos em Leishmanioses que me receberam tão bem e me ensinaram muito!!!

Departamento de Biologia da UFLA:

Ao professor Dr. Renato Gregorin, curador da Coleção de Mamíferos.

Ao Centro de Estudo em Virologia da USP:

Professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo e o pós-doutorando Gilberto Sabino Santos Junior do Laboratório de Virologia.

Ao Centro de Controle de Zoonoses:

Ao coordenador Edvaldo Freitas, aos veterinários Marília Rocha e Joel Fontes, e os funcionários Claudio e Armênio do CCZ de Montes Claros, e aos profissionais Francisco Gama e Marlise Costa do Laboratório de Virologia do CCZ de BH.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG, o qual tenho muito orgulho em fazer parte. Agradeço aos professores que muito me ensinaram e eu os estimo. Agradeço também aos excelentes técnicos e funcionários. E a coordenação da Pós-graduação em Parasitologia, em especial ao professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e as lindas e queridas Sumara Aparecida e Sibebe Abreu.

À Fapemig, pela bolsa e pelo financiamento concedido para desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos morcegos, pois sem esses lindos não teria essa dissertação!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado, meu eterno AGRADECIMENTO!

Quando se acredita e luta, tudo no fim dá mesmo certo...

| | |
|---|--|
| Lista de Figuras..... | XI |
| Lista de Tabelas | Erro! Indicador não definido. III |
| Lista de abreviaturas | XIVV |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Morcegos..... | 17 |
| 1.2 Tripanosomatídeos | 19 |
| 1.2.1 O gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses | 19 |
| 1.2.2 Tripanossomíases e <i>Trypanosoma cruzi</i> | 22 |
| 1.3 Morcegos e tripanossomatídeos | 26 |
| 1.4 Tripanossomatídeos na cidade de Montes Claros | 34 |
| 1.5 Técnicas biomoleculares | 36 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 39 |
| 3. OBJETIVOS | 40 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 40 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 40 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 Ética e biossegurança | 41 |
| 4.2. Área do estudo..... | 41 |
| 4.3. Atividades realizadas no campo | 47 |
| 4.3.1 Captura e coleta dos morcegos..... | 48 |
| 4.4. Atividades realizadas no laboratório | 49 |
| 4.4.1. Eutanásia e coleta de amostras biológicas dos morcegos..... | 49 |
| 4.4.2 Carcaças dos morcegos | 50 |
| 4.5 Pesquisa de tripanossomatídeos | 51 |
| 4.5.1 Isolamento dos parasitos | 51 |
| 4.5.2 Diagnóstico Molecular | 51 |
| 4.5.3 Pesquisa de <i>Leishmania</i> | 52 |
| 4.5.4 Pesquisa de tripanossomatídeos | 54 |
| 4.6 Análise dos dados..... | 566 |
| 5. Resultados | 57 |
| 5.1 Fauna de morcegos | 57 |
| 5.1.1 Morcegos capturados..... | 57 |
| 5.1.2. Morcegos coletados e utilizados para a pesquisa de tripanossomatídeos..... | 63 |
| 5.2. Infecção por tripanossomatídeos | 67 |
| 5.2.1 Infecção dos morcegos por <i>Leishmania</i> | 67 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.2 Detecção de <i>Leishmania</i> pelo alvo SSU rRNA e identificação das espécies pela PCR RFLP <i>hsp70</i> | 67 |
| 5.2.3 Detecção de <i>Leishmania</i> pelo alvo SSU rRNA 18 S e identificação das espécies pela sequenciamento | 70 |
| 5.3 Infecção dos morcegos por <i>Trypanosoma</i> | 73 |
| 5.3.1 Isolamento de tripanossomatídeos em cultura..... | 73 |
| 5.3.2 Identificação molecular dos isolados de tripanossomatídeos em cultura | 78 |
| 5.3.3 Detecção de <i>Trypanosoma</i> pelo alvo SSU rRNA 18 S e identificação das espécies pela sequenciamento | 79 |
| 5.3.4 Tripanossomatídeos | 85 |
| 6. DISCUSSÃO | 90 |
| 6.1. Fauna de Morcegos..... | 91 |
| 6.1.1 Morcegos Capturados | 91 |
| 6.1.2 Morcegos coletados | 96 |
| 6.2 Infecção de morcegos por tripanossomatídeos..... | 97 |
| 6.2.1 A infecção em morcegos por espécies de <i>Leishmania</i> no município de Montes Claros..... | 98 |
| 6.2.2 Infecção em morcegos por espécies de <i>Trypanosoma</i> no município de Montes Claros | 101 |
| 6.2.3 Morcegos infectados por tripanossomatídeos e sua implicação para a saúde pública no município de Montes Claros..... | 106 |
| 6.2.3.1 Infecção nas áreas estudadas..... | 106 |
| 6.2.3.2 Perfil epidemiológico..... | 113 |
| 7. CONCLUSÕES | 116 |
| 8. ANEXOS | 118 |
| Anexo 1- Aprovação do CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG | 118 |
| Anexo 2 - Licença de coleta e sacrifício dos quirópteros - SISBIO | 119 |
| Anexo 3 - Licença de coleta e captura de morcegos em caverna – SISBIO..... | 120 |
| Anexo 4 - Autorização para coleta no Parque Estadual da Lapa Grande..... | 121 |
| Anexo 5 - Autorização para coleta no Parque Municipal da Sapucaia | 122 |
| Anexo 6 - Folder | 123 |
| Anexo 7 - Palestras e oficinas..... | 124 |
| Anexo 8 - Formulário de campo de coleta de morcegos | 127 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 128 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Localização dos quatro locais de coleta no município de Montes Claros, MG, Brasil. | 43 |
| Figura 2: Pontos de coleta no bairro Vila Luiza (16°44'27.86"S 43°51'45.93"O): Pontos 1 e 3: Cemitério; Ponto 2: Praça do cemitério; Pontos 4 e 5: Residências. | 44 |
| Figura 3: Pontos de coleta no bairro Nossa Senhora das Graças (16°45'46.91"S 43°51'12.19"O). Ponto 1, 2, 3, 4 e 5: Residências. | 45 |
| Figura 4: Pontos de coleta no Parque Municipal da Sapucaia (16°46'5"S 43°53'15"W). Pontos 1 a 5: Mata Seca. | 46 |
| Figura 5: Pontos de coleta no Parque Estadual da Lapa Grande (16°42'25.55"S 43°56'27.99"O). Pontos 1 e 2: Caverna Lapa Grande; Pontos 3 a 5: Mata de galeria. | 47 |
| Figura 6: Procedimento de campo: A: Captura do morcego na rede de neblina B: Morcegos acondicionados em saco de algodão. C: Triagem e identificação das espécies; D: Morcego <i>Desmodus rotundus</i> identificado com anilha. | 49 |
| Figura 7: Procedimentos de laboratório. A: Realização da eutanásia e necropsia dos morcegos. B: Coleta das amostras biológicas, ao lado da chama, para a cultura. C: Coleta do baço para pesquisa de tripanossomatídeos. D: Coleta de sangue para pesquisa de tripanossomatídeos. | 50 |
| Figura 8: Organograma dos testes moleculares realizados no estudo. | 51 |
| Figura 09: Estimativa de riqueza e curva de acumulação de espécies dos morcegos capturados no município de Montes Claros, MG.. | 59 |
| Figura 10: Morcegos capturados segundo a abundância e riqueza e de espécies por área de estudo. ... | 60 |
| Figura 11: Morcegos capturados segundo o hábito alimentar por área de estudo. | 61 |
| Figura 12: Número de animais capturados X temperatura e umidade, por local de coleta. | 62 |
| Figura 13: Morcegos coletados segundo a abundância e riqueza de espécies por área de estudo. | 65 |
| Figura 14: Morcegos coletados segundo hábito alimentar por área de estudo. | 66 |
| Figura 15: Resultado representativo da triagem realizada através da PCR SSU-rRNA em amostras de DNA extraído dos morcegos coletados em Montes Claros. | 67 |
| Figura 16: Perfil representativo da PCR <i>hsp70</i> de amostras de DNA extraído dos morcegos. | 68 |
| Figura 17: Perfil representativo da digestão com <i>HaeIII</i> de amostras positivas na PCR <i>hsp70</i> de DNA extraído dos morcegos. | 68 |
| Figura 18: Característica da positividade dos morcegos infectados por <i>Leishmania</i> , por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar, em relação aos morcegos coletados | 72 |
| Figura 19: Fotomicrografia de flagelados tripanossomatídeos isolados em cultivo, corados pelo Giemsa, isolados de morcegos capturados no município de Montes Claros (1000x) | 74 |
| Figura 20: Características dos morcegos infectados por tripanossomatídeos isolados em cultura, por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar. | 77 |
| Figura 21: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados na PCR direcionada ao alvo <i>hsp70</i> das amostras de DNA extraídas dos isolados cultivados.. | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figura 22: Perfis da digestão com <i>Hae</i> III de fragmento do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA extraído dos isolados cultivados... | 79 |
| Figura 23: Resultado representativo dos produtos amplificados na PCR dirigida a região V7V8 do gene <i>SSU rRNA</i> de amostras de DNA extraídas dos morcegos.. | 80 |
| Figura 24: Característica da positividade dos morcegos infectados por espécies de <i>Trypanosoma</i> por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar, em relação aos animais coletados | 84 |
| Figura 25: Distribuição das espécies de morcegos e espécies de tripanossomatídeos nas quatro áreas estudadas no município de Montes Claros..... | 90 |
| Figura 26: Perfil do Parque Estadual da Lapa Grande, Montes Claros - MG..... | 109 |
| Figura 27: Perfil do Parque Municipal da Sapucaia, Montes Claros - MG..... | 110 |
| Figura 28: Perfil de algumas residências do bairro Nossa Senhora das Graças, Montes Claros..... | 111 |
| Figura 29 Perfil de algumas residências do bairro Vila Luiza, Montes Claros..... | 112 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Relação de espécies de <i>Leishmania</i> já descritas no mundo parasitando determinadas espécies de morcegos, com diferentes hábitos alimentares. | 29 |
| Tabela 2: Relação de espécies de <i>Trypanosoma</i> , confirmados através de análises filogenéticas, já descritas no mundo parasitando determinadas espécies de morcegos, com diferentes hábitos alimentares. | 31 |
| Tabela 3: Lista das espécies de morcegos capturados nas quatro áreas de estudo do município de Montes Claros, no período de abril 2014 a abril de 2015.. | 58 |
| Tabela 4: Lista das espécies de morcegos coletadas nas quatro áreas de estudo do município de Montes Claros, no período de abril 2014 a abril de 2015.. | 64 |
| Tabela 5: Espécie de <i>Leishmania</i> , identificada através da RFLP- <i>hsp70</i> , por espécie de morcego, local de coleta, dieta, sexo, idade e tecido infectado. | 69 |
| Tabela 06: Resultados do sequenciamento da região V7V8 do gene SSU- rRNA, realizado a partir das amostras de sangue e das amostras positivas pelo <i>hsp70</i> | 71 |
| Tabela 7: Características dos morcegos dos quais foram isolados espécies de tripanossomatídeos..... | 76 |
| Tabela 8: Espécies de <i>Trypanosoma</i> identificadas através do sequenciamento, por morcego (espécie, sexo, idade), amostra sequenciadas (sangue, isolados cultivados, tecidos positivos no alvo <i>hsp70</i>), e por área de estudo..... | 81 |
| Tabela 9: Positividade para tripanossomatídeos, utilizando as metodologias de sequenciamento e PCR RFLP <i>hsp70</i> , por espécie e área de estudo dos morcegos coletados no município de Montes Claros no período de abril de 2014 a abril de 2015.. | 87 |

Lista de abreviaturas

BH: Belo Horizonte

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleotídeo

DTUs: Discrete Typing Units

H': Índice de diversidade de Shannon-Winer

IEF-MG: Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais

ICA: Instituto de Ciências Agrárias

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS: Internal Transcribed Spacer

kDNA: DNA do cinetoplasto

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LMC: Leishmaniose mucocutânea

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose visceral canina

mg: Miligramas

NSG: Nossa Senhora das Graças

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)

PELG: Parque Estadual da Lapa Grande

RFLP: Polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição

PMS: Parque Municipal da Sapucaia

qPCR: PCR quantitativa em tempo real

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

rDNA: DNA ribossomal

rRNA: RNA ribossomal

SSU rRNA: Sequências da subunidade menor do ribossomo

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

UFLA: Universidade Federal de Lavras

UI/mL: Unidade Internacional por mililitro

VL: Vila Luiza

Resumo

Os quirópteros possuem grande diversidade de espécies, hábitos alimentares e abrigos. Em consequência da fragmentação ambiental estão cada vez mais se estabelecendo nos centros urbanos. O presente estudo foi realizado para verificar a ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos capturados em dois bairros (Vila Luiza -VL e Nossa Senhora das Graças -NSG) e dois parques (Parque Estadual da Sapucaia- PMS e Parque Estadual da Lapa Grande - PELG) do Município de Montes Claros – MG, no período de abril de 2014 a abril de 2015. Foram capturados 1.100 morcegos pertencentes a quatro famílias: Emballonuridae (3,5%), Molossidae (10,3%), Phyllostomidae (75,9%), Vespertilionidae, (10,3%). Destes, 247 indivíduos foram utilizados para investigar a presença de tripanossomatídeos. Utilizou-se cultivo NNNLIT, com 2,1% (16/741) positivos e 1,6 (12/741) estabilizados e criopreservados. Os isolados foram identificados através da técnica de sequenciamento direcionada à região V7V8 do gene SSU rRNA como *Trypanosoma dionisii* (10/14) e *Trypanosoma cruzi* (2/14). A técnica da PCR foi adotada para amplificação do gene SSU rRNA e detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras de sangue, pele, baço, fígado e medula. Para a identificação das espécies de *Leishmania* utilizou-se PCR RFLP *hsp70* e Hae III, com positividade de 4,9% (7/144), sendo quatro amostras identificadas como *Leishmania braziliensis* e as outras três não identificadas. O DNA das 7 amostras de tecido positivas pelo alvo *hsp70*, e o DNA das 247 amostras de sangue foram analisadas pela PCR direcionada a região V7V8 do gene SSU Rrna, que detecta a família Trypanosomatidae. As amostras positivas foram sequenciadas para identificação das espécies. A positividade de infecção por tripanossomatídeos, nos morcegos coletados, foi de 25,9% (64/247). Sendo que o gênero *Leishmania* foi representado pelas espécies *Leishmania amazonensis* (9,3%), *Leishmania braziliensis* (7,8%), *Leishmania infantum* (4,6%) e *Leishmania* sp. (4,6%), e o gênero *Trypanosoma* pelas espécies *Trypanosoma dionisii* (40,6%), *Trypanosoma cruzi* (4,6%), e *Trypanosoma* sp. (32,8%). O PELG e o bairro NSG, apresentaram o maior número de morcegos infectados por *Leishmania* sp., sugerindo a ocorrência dos ciclos silvestre e urbano destas espécies. Os parques PELG e PMS apresentaram maior positividade de espécies do gênero *Trypanosoma* indicando uma maior participação dos morcegos no ciclo silvestre destes parasitos. No presente estudo constatou-se a ocorrência da infecção de morcegos por tripanossomatídeos em diferentes áreas de Montes Claros, o que é de grande importância ecológica, epidemiológica, de saúde pública e sanidade animal.

Palavras chave: Morcegos, *Leishmania*, *Trypanosoma*, Tripanossomatídeos.

Abstrat

The bats have great abundance and diversity of species, eating habits and shelters. Because of habitat fragmentation, they have increasingly settled in urban centers. To get to know the possible impacts of the interaction bats / humans and domestic animals, bats were captured from april 2014 to april 2015 in two districts (Vila Luiza and Nossa Senhora das Graças – NSG) and in two parks (City Park of Sapucaia – CPS) and State Park of Lapa Grande - SPLG) in the city Montes Claros – MG. It was done in order to verify the occurrence of trypanosomatids in these animals. It was captured 1,100 bats belonging to the families Emballonuridae (3,5%), Molossidae (10,3%), Phyllostomidae (75,9%), Vespertilionidae, (10,3%). We collected 247 individuals to investigate the presence of trypanosomes. We used NNN cultivation / LIT, with 2.1% (16/741) positive, and 12 stabilized. The isolated ones were identified by the sequencing technique directed to the V7V8 region of SSU rRNA as *Trypanosoma dionisii* (10/14) and *Trypanosoma cruzi* (2/14). We also used the PCR SSU rRNA in *Leishmania* DNA in samples of blood, skin, spleen, liver and bone marrow. For the identification of the species, it was used PCR-RFLP hsp70 with positivity of 4.9% (7/114); four samples were identified as *Leishmania braziliensis*, but three were not. The 247 DNA samples of blood and the 7 samples positive for the hsp70 target tissue were analyzed by PCR SSU rRNA (V7V8) that detects the Trypanosomatidae family. The positive samples were sequenced for the species identification. The prevalence of infection by trypanosomatids in the bats collected was of 25,9% (64/247). The genus *Leishmania* was represented by the species *Leishmania amazonensis* (9.3%), *Leishmania braziliensis* (7,8%), *Leishmania infantum* (4,6%) and *Leishmania* sp. (4,6%), and the genus *Trypanosoma* was represented by the species *Trypanosoma dionisii* (40.6%), *Trypanosoma cruzi* (4,6%), and *Trypanosoma* sp. (32,8%). The SPLG park and the NSG district presented the largest number of bats infected by *Leishmania* sp., suggesting the occurrence of wild and urban cycles of these species. The SPLG and CPS parks had a higher prevalence of species of the genus *Trypanosoma*, indicating a greater participation of bats in the wild cycle of these parasites. In this study, we found the occurrence of infection of bats by trypanosomatids in different areas of Montes Claros, which is of great ecological and epidemiological importance and of public and animal health.

Keywords: Bats, *Leishmania*, *Trypanosoma*, Trypanosomatids.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morcegos

Os morcegos possuem hábito noturno, e dentre os mamíferos são os únicos capazes de realizar um voo verdadeiro (Fenton, 1992). Pertencentes a ordem Chiroptera (palavra derivada do grego *cheir*: mão, *pteron*: asa) a qual é composta pelas subordens Megachiroptera e Microchiroptera, representam um dos grupos de vertebrados mais diversificados do mundo, cerca de 20% da riqueza de mamíferos, sendo superada apenas pela ordem Rodentia (Gardner, 2008; Moratelli & Calisher, 2015).

A subordem Megachiroptera possui mais de 150 espécies, todas da família Pteropodidae, estabelecidas apenas no sudeste da Ásia e da Austrália, e nas regiões tropicais da África e da Índia. (Fenton, 1992; Reis et al., 2007). Já a subordem Microchiroptera ocorre em todo o mundo, com exceção das regiões polares, sendo representada por 17 famílias, 202 gêneros e 1120 espécies (Simmons, 2005). Dentre estas, nove famílias, 68 gêneros e 179 espécies já foram encontradas no Brasil (Nogueira et al, 2014; Moratelli & Dias, 2015).

A quiropterofauna pode representar até 50% da comunidade de mamíferos de uma área da região neotropical (Timm, 1994), e no Brasil representa cerca de 28% das 661 espécies de mamíferos que ocorrem no país (Reis, 2007). A família Phyllostomidae é a mais abundante e diversificada em hábitos alimentares, sendo que 160 espécies ocorrem na região neotropical e 92 espécies no Brasil. Dentre as diferentes guildas alimentares, os animais de hábito frugívoro, nectarívoro, polínívoro, insetívoro, carnívoro, onívoro e hematófago são os mais comuns (Peracchi et al., 2006; Peracchi et al., 2011; Nogueira et al., 2014.)

Os quirópteros desempenham diversas funções fundamentais para manter o equilíbrio dos ecossistemas: os insetívoros atuam no controle de insetos vetores de patógenos e pragas agrícolas, os nectarívoros na polinização de grande quantidade de flores e os frugívoros na regeneração e manutenção das florestas através da dispersão de sementes. Esses importantes serviços ecológicos são potencializados pela ampla diversidade e quantidade de espécies, o que faz dos quirópteros, um grupo especial dentro das comunidades biológicas (Fabian et al., 2008).

Além de atuar diretamente no equilíbrio do meio ambiente e da cadeia trófica, os quirópteros também são protagonistas de importantes descobertas científicas, por exemplo servindo de material para pesquisas sobre desenvolvimento de anticoagulantes, vacinas, mecanismos de resistência a doenças, circulação sanguínea, tempo de remoção de toxinas, efeitos da inalação de fumaça, uso e funcionamento de sonar e infravermelho (Campbell et al., 2002; Ciprandi et al., 2003; Reis et al., 2007; Moratelli & Calisher, 2015).

A fragmentação florestal em consequência de alterações ambientais acarretadas por eventos naturais e/ou antrópicos têm promovido mudanças na dinâmica dos ecossistemas, e têm provocado a redução do tamanho de diversas populações e o desaparecimento de espécies que requerem grandes áreas para sobreviver (Fenton et al., 1992; Bierregaard et al., 1992; Kalko, 1997). No entanto, algumas espécies de morcegos têm mostrado capacidade de resistir às mudanças ambientais, seja se mantendo em fragmentos florestais localizados em perímetros urbanos como praças e parques, ou estabelecendo-se diretamente em ambientes urbanizados, como as residências e estabelecimentos comerciais. Por possuírem ampla tolerância às modificações ambientais algumas espécies de morcegos estão entre aquelas mais bem sucedidas da Terra (Muhldorfer, 2012).

Algumas espécies de morcegos que antes habitavam ambientes como cavernas, árvores e ocos de árvores nas florestas estão se estabelecendo cada vez mais nas cidades, onde encontram abrigo e alimentação (Tencate et al., 2012). Os insetívoros são atraídos pelas luzes das vias públicas e das residências onde encontram farta alimentação de insetos (Rydell, 1992; Silva et al., 1996), enquanto os nectarívoros e frugívoros são atraídos pelas flores, frutos e folhas das árvores de quintais, praças e parques urbanos (Zortéa & Chiarello, 1994).

Embora algumas espécies de morcegos sejam sinantrópicas, isto é, utilizam do ambiente modificado pelo homem para sobreviver, e possam albergar e dispersar alguns patógenos, elas prestam diversos serviços fundamentais para o equilíbrio ambiental. No Brasil os morcegos são protegidos pela Lei de Crimes Ambientais nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, que considera crime a sua perseguição, caça ou destruição.

O papel dos morcegos como reservatórios de doenças, como a raiva é bastante conhecido. Entretanto, muitos aspectos da infecção por protozoários ainda são desconhecidos.

1.2 Tripanosomatídeos

Atualmente, os tripanosomatídeos são classificados como pertencentes ao Reino Euglenozoa, a Classe Kinetoplastea, a Ordem Trypanosomatida e a família Trypanosomatidae (Votykka et al., 2015).

A família Trypanosomatidae, de acordo com a taxonomia tradicional (baseada em parâmetros morfológicos, hospedeiros de origem e nos ciclos de vida), foi classificada em nove gêneros. Destes, seis compreendem parasitos monoxênicos de insetos (gêneros *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia* e *Blastocrithidia*), e quatro parasitos heteroxênicos, sendo um de insetos e plantas (gênero *Phytomonas*), e três de hospedeiros invertebrados e vertebrados (gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*) (Wallace, 1966, 1979; Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Camargo, 1998).

1.2.1 O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto parasitárias causadas por protozoários da classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Amplamente distribuídas no Velho e no Novo Mundo, as leishmanioses apresentam uma grande diversidade epidemiológica, sendo consideradas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012) como duas das mais importantes doenças negligenciadas (Shaw, 2007).

Endêmicas em cinco continentes e registradas em 98 países, ocorrem em áreas de clima temperado à tropical. Estima-se que cerca de 14 milhões de pessoas estejam infectadas, e que mais de 350 milhões estejam em situações de risco de infecção. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo são registrados na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. São estimados 2 milhões de novos casos anuais (0,2 a 0,4 milhões de casos de Leishmaniose visceral, e 0,7 a 1,2 milhões de casos de Leishmaniose tegumentar), e de 20 a 40 mil óbitos por ano (WHO, 2012).

A maioria dos casos de leishmaniose cutânea ocorre nas Américas, região Mediterrânea, Ásia Ocidental e Central e Oriente Médio, onde dez países apresentam cerca de 70-75% dos casos de leishmaniose cutânea: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (WHO 2010; Alvar et al., 2012)

Vários estudos têm registrado a franca expansão das leishmanioses pelo mundo e ocorrências de casos em regiões não endêmicas têm sido recorrentes. As principais causas

apontadas para isso são os impactos antrópicos sobre o meio ambiente envolvendo guerras, migrações, globalização e o aquecimento global (Shaw, 2007).

Estes fatores, juntamente com a coinfeção *Leishmania*-HIV e a resistência de algumas cepas dos parasitos aos tratamentos convencionais, têm contribuído para mudar o perfil epidemiológico das leishmanioses no mundo (Desjeux, 2004; Piscopo & Mallia 2006). Embora as leishmanioses ainda estejam fortemente associadas às populações mais pobres (Alvar et al., 2012), casos novos vêm sendo relatados em países desenvolvidos (Shaw, 2007).

Dependendo da espécie de *Leishmania* as leishmanioses podem apresentar um amplo espectro de sintomas no homem. As formas clínicas podem ser incluídas em dois grupos principais: (1) Leishmaniose Visceral (LV) – causadas sobretudo pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi* no Novo Mundo) (Kaye & Scott 2011) e (2) Leishmaniose Tegumentar (LT), com a forma cutânea (LC) causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo, nas Américas por *L. mexicana* e *L. amazonensis* e pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. naffi*, *L. lindenberg*, *L. colombiensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. utingensis*. A forma mucocutânea (LMC) é causada principalmente por *L. braziliensis* e raramente por *L. guyanensis*. A leishmaniose cutânea disseminada é causada principalmente por *L. braziliensis* e a cutâneo-difusa (LCD), uma variante da LC, causada por *L. amazonensis* (Ashford, 2000).

A apresentação clínica das leishmanioses (incluindo infecções subclínicas, auto-cura de lesões e doença disseminada crônica) é dependente tanto da espécie do parasito, quanto da resposta imune do hospedeiro (Ashford, 2000). A importância das leishmanioses no Novo Mundo reside não somente na alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos de LV não tratados, e alta morbidade nos casos de LTA, que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes (Dedet & Pratlong, 2000).

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies que infectam diferentes ordens de mamíferos, dentre essas, até o momento, 21 são consideradas patogênicas para a espécie humana (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). Cerca de 40 espécies de flebotomíneos já foram consideradas suspeitas ou incriminadas como vetoras dos agentes etiológicos das leishmanioses no Brasil (Rangel & Lainson, 2009).

As espécies de *Leishmania* apresentam uma gama de hospedeiros vertebrados mamíferos: canídeos, roedores, edentados (tatu, preguiça, tamanduá), marsupiais

(gambá), quirópteros e primatas incluindo o homem (Brazil, 2007; Berzunza-Cruz et al., 2015). A maioria das leishmanioses são zoonóticas, com o homem infectando-se secundariamente.

O principal mecanismo de transmissão biológica das espécies de *Leishmania* para os mamíferos, incluindo os humanos, é através da picada de fêmeas do inseto vetor, díptero hematófago pertencente à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, dos gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Rangel & Lainson, 2005).

Os flebotomíneos são insetos encontrados em toda a região tropical, especialmente nas regiões quentes e úmidas do planeta (Sharma & Singh, 2008). Baseado no desenvolvimento dos parasitos no interior do trato digestório do inseto vetor, dentre outras características, o gênero *Leishmania* pode ser subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987).

Na maior parte dos estudos sobre epidemias de leishmaniose visceral em áreas urbanas tem sido relatado o encontro de cães infectados, e em algumas áreas, foi possível observar que a LV canina precedeu o aparecimento da doença humana (Gontijo & Melo, 2004). Embora o cão seja considerado o principal reservatório de *Leishmania infantum* no ambiente urbano, gatos, roedores, marsupiais e quirópteros de hábitos sinantrópicos já foram encontrados naturalmente infectados por esta espécie de *Leishmania* em áreas urbanizadas (Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2015)

Considerada uma zoonose de animais silvestres, que só acometia o homem que adentrava as florestas, hoje, a LTA ocorre em áreas ecologicamente alteradas como zonas rurais, matas remanescentes modificadas e regiões periurbanas. As espécies que causam a LTA são também detectadas em animais domésticos como os cães, gatos e cavalos. Essas adaptações dos parasitos, vetores, hospedeiros e reservatórios, evidenciam um novo padrão epidemiológico com ciclos de transmissão ocorrendo no ambiente peridoméstico (Marzochi, 1989; Lima et al., 2002; Madeira et al., 2003).

A epidemiologia das leishmanioses no Novo Mundo é bastante complexa devido a participação de várias espécies do agente etiológico, de vetores e de hospedeiros (Silva et al., 2005) envolvidos em complexos ciclos de transmissão ainda pouco conhecidos, que se caracterizam por serem dinâmicos e multivariáveis (Roque & Jansen, 2014).

A melhor compreensão, no ambiente urbano, da participação de outros possíveis hospedeiros, especialmente os de hábitos sinantrópicos, no ciclo de transmissão de espécies de *Leishmania* é um ponto crucial para o entendimento da dinâmica das

leishmanioses como também para melhorar a eficácia do controle destas doenças (Madeira et al., 2003; Roque et al., 2010; Oliveira et al., 2015).

1.2.2 Tripanossomíases e *Trypanosoma cruzi*

As tripanossomíases são causadas por várias espécies de parasitos do gênero *Trypanosoma*, com seu ciclo de infecção ocorrendo entre vertebrados de todas as classes, e transmitidas por vários invertebrados hematófagos pertencentes a diversas ordens e famílias. Moscas, hemípteros e pulgas transmitem tripanossomas a mamíferos, flebotomíneos e mosquitos (culicídeos) transmitem tripanossomas a anuros e lagartos terrestres, alguns artrópodes transmitem tripanossomas a peixes, e sanguessugas transmitem tripanossomas a vertebrados terrestres e a vertebrados aquáticos como peixes, anfíbios e répteis (Ferreira et al., 2007; Viola et al., 2008a).

Hoare (1972) dividiu os tripanossomas de mamíferos em duas secções de acordo com o desenvolvimento no vetor e a forma de transmissão. As espécies da secção Stercoraria apresentam ampla distribuição geográfica, pertencem aos subgêneros *Schizotrypanum* (*T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*), e se desenvolvem exclusivamente no tubo digestivo do inseto vetor, sendo transmitidas pela contaminação com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes dos vetores. A secção Salivaria compreende os tripanossomas de origem africana dos subgêneros *Duttonella* (*T. vivax*), *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Pycnomonas* (*T. suis*) e *Nannomonas* (*T. congolense*), os quais são transmitidos através da inoculação de formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas glândulas salivares dos vetores durante o repasto sanguíneo, com exceção das espécies cuja transmissão ocorre mecanicamente e são as únicas existentes fora da África, ocorrendo na Ásia e nas Américas Central e do Sul (*T. equiperdum* e *T. evansi*) (Hoare, 1972; Ventura et al., 2001; Cortez et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Stevens et al., 2008).

Através de análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH (Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006), foi demonstrado que o gênero *Trypanosoma* é monofilético e ele foi dividido em 9 clados principais: clado *T. brucei*, clado *T. cruzi*, clado aquático (Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens et al., 1998, 1999a, 2001), *T. theileri*, *T. lewisi*, *T. cyclops*, *T. copemani*, *T. avium/T. corvi* e *Trypanosoma* de

serpentes/lagartos e crocodilianos (Fermino et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Hamilton et al., 2004, 2005a, 2007, 2009; Rodrigues et al., 2006; Viola et al., 2009a, b, García et al., 2011b; Maia da Silva et al., 2010; Rodrigues et al., 2006, 2010).

O clado *T. cruzi* é formado por espécies do subgênero *Schizotrypanum* incluindo *T. cruzi* que é a espécie-tipo e tripanossomas exclusivos de morcegos do Novo e Velho Mundo (*T. dionisii*, *T. cruzi marinkellei*, *T. erneyi*, *T. livingstonei*, entre outros). Outras espécies também fazem parte do clado *T. cruzi* como o *T. conorhini* de ratos, *T. vespertilionis* de morcegos europeus, isolados de marsupiais e roedores da Austrália, tripanossomas africanos provenientes de morcegos, macacos e civeta. O *T. rangeli* e *T. rangeli-like*, formam um grupo homogêneo, mais relacionado com as espécies de *Schizotrypanum* (Stevens et al., 2001, 2008; Hamilton et al., 2007; Lima et al., 2012; Lima et al., 2013).

As espécies do subgênero *Schizotrypanum* são as únicas que infectam células de mamíferos e se multiplicam dentro destas como amastigotas. O *T. cruzi* é a única espécie capaz de infectar tanto morcegos quanto diversos outros mamíferos incluindo o homem (Hoare, 1972; Marinkelle, 1982a; Molyneux, 1991; Stevens et al., 2001; Cavazanna et al., 2010; Hamilton et al., 2012a, b; Lima et al., 2012a, b, 2013). As formas encontradas no sangue dos mamíferos são indistinguíveis morfologicamente, sendo muito semelhantes às de *T. cruzi*.

Por esta razão, todas as espécies desse subgênero são denominadas *T. cruzi-like* (Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991). A recente adição das espécies *T. erneyi* e *T. livingstonei* (isoladas de morcegos africanos) ao clado *T. cruzi*, sustenta a hipótese (Lima et al., 2012a, 2013) denominada “bat seeding”. Esta hipótese sugere que *T. cruzi* evoluiu de parasitos restritos a morcegos, provavelmente do continente africano de onde os morcegos irradiaram no Eoceno, e que posteriormente se adaptaram aos mamíferos terrestres (Hamilton et al., 2009, Hamilton et al., 2012 a, b).

A espécie *Trypanosoma cruzi* é formada por um complexo de isolados que diferem em características morfológicas, biológicas, patológicas, clínicas, imunológicas, bioquímicas e moleculares (Andrade et al., 1999; Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012). Essa heterogeneidade levou ao agrupamento de cepas de *T. cruzi*, que são geneticamente relacionadas e identificadas por marcadores moleculares comuns, em seis Discrete Typing Units (DTUs), denominados TcI -TcVI (Zingales et al., 2009) além do

TcBat, genótipo recentemente proposto e descrito como restrito a morcegos (Marcili et al., 2009).

São descritos três ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi*, o silvestre, o doméstico e o peridoméstico, podendo ocorrer sobreposição de ciclos (Coura et al., 2002). As DTUs foram caracterizadas de casos humanos de Doença de Chagas, de triatomíneos de áreas endêmicas e de animais do peridomicílio. Os estudos sobre o ciclo silvestre são recentes, escassos e complexos. O estudo da ecoepidemiologia das DTUs nas áreas silvestres é primordial para compreender a história natural e evolutiva de *T. cruzi*, pois cada ecótopo e nicho ecológico possuem focos de transmissão que apresentam distintos perfis epidemiológicos, que se caracterizam por serem multivariáveis e complexos (Paho, 2009, Miles et al., 1983; Lisboa et al., 2004, 2006, 2008, 2009; Herrera et al., 2008, 2009; Valente et al., 2009). A maioria das espécies de tripanossomas que circulam apenas no ciclo silvestre não é patogênica para seus hospedeiros. Já as espécies *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*, que possuem ocorrência na África, e *T. cruzi* e *T. rangeli* com ocorrência nas Américas, infectam o homem. Sendo que apenas *T. rangeli*, não é considerada patogênica para o homem (Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007).

Os isolados pertencentes às DTUs TcI, III e IV predominam no ciclo silvestre, sendo que TcI é o genótipo mais frequente e mais conhecido quanto à distribuição geográfica, diversidade de hospedeiros, vetores e ecossistemas. As DTUs TcIII e IV são descritas como predominantemente associadas à hospedeiros silvestres de várias ordens e biomas (Lisboa et al., 2009). TcI e TcIV são comuns em casos humanos de infecção oral por *T. cruzi* na Amazônia brasileira (Marcili et al., 2009a, c; Valente et al., 2009; Monteiro et al., 2012, 2013; Ramírez et al., 2013; Santana et al., 2014). Os isolados das DTUs II, V e VI são associados principalmente com o ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão (Broutin et al., 2006; Virreira et al., 2006; Ragone et al., 2012; Zingales et al., 2012). A TcII é a segunda mais frequente, porém mais focal e associada à maioria dos casos humanos nas antigas áreas endêmicas do país (Di Noia et al., 2002), e as DTUs TcV e TcVI são reportadas como primariamente associadas a ciclos domésticos em regiões endêmicas no sul do país, com raros registros em ciclos silvestres (Gaunt & Miles, 2000; ; Yeo et al., 2005; Westenberger et al., 2005; 2006; Lewis et al., 2009; Llewellyn et al., 2009a, b; Marcili et al., 2009a, b; Miles et al., 2009; Araujo et al., 2011, Zingales et al., 2012).

Morcegos infectados, geralmente por via oral através da ingestão de insetos que apresentem o *T. cruzi* atuam como verdadeiros reservatórios domésticos do parasito (Marinkelle, 1977; Steindel et al., 1998; Barnabé et al., 2003; Grisard et al., 2003; Lisboa et al., 2008; Maia da Silva et al., 2008; Marcili et al., 2009b; Cavazzana et al., 2010).

O *T. cruzi* (Chagas, 1909) protozoário da Classe Kinetoplastea e Ordem Trypanosomatida, é o agente etiológico da doença de Chagas que se apresenta como a quarta principal endemia das Américas (Souto Jr. & Ribeiro, 2002). Devido a sua alta morbidade, a tripanosomíase americana continua sendo um grave problema social e de saúde pública (Paho, 2014). Cerca de 6 a 7 milhões de pessoas serão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina. Estima-se que a incidência anual nas Américas seja de 28.000 mil casos e cerca de 12.000 mortes. Mesmo considerando os recentes avanços na eliminação da transmissão vetorial e transfusional da Doença de Chagas em áreas endêmicas brasileiras há 2 a 3 milhões de chagásicos residindo no Brasil com cerca de seis mil mortes por ano (Dias, 2009; Rassi-Júnior et al., 2010; Silveira 2011; Who, 2014).

Os principais mecanismos de transmissão da Doença de Chagas são: vetorial, transfusional, oral, transplacentário e acidentes de laboratório) (Ribeiro et al., 1987; Bittencourt, 1992; Moncayo, 1999; Dias, 2009). A transmissão oral é considerada a via mais importante para os animais silvestres, e ocorre quando estes entram em contato com as formas infectivas do parasito através da ingestão das formas de fezes (quando o animal coça com a boca o local do seu corpo onde estas estão depositadas), alimentos contaminados com o parasito, mamíferos infectados, e/ou o próprio triatomíneo (Roque & Jansen, 2014).

A Doença de Chagas é dividida em fases aguda e crônica. A fase aguda pode ser assintomática em cerca de 95% dos casos, ou sintomática com manifestações clínicas leves como febre, sonolência, fadiga muscular, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dificuldade em respirar, diarreia, edema e taquicardia, com remissão espontânea dos sintomas. Essa fase raramente é letal, levando a morte apenas quando ocorre severas manifestações de miocardite e meningoencefalite. A fase crônica possui a forma clínica assintomática, e a forma sintomática que apresenta distúrbios digestivos como megacólon e megaesôfago, alterações neurológicas e miocardiopatia chagásica (Teixeira et al., 2007).

A tripanossomíase, primitivamente, era uma doença enzoótica circulando somente entre animais silvestres, entretanto, a partir do contato do homem com os focos naturais e o desequilíbrio ecológico, passou a ser uma zoonose (Gonçalves da Costa, 1999). Há mais de cem espécies vetoras responsáveis pela transmissão natural do *T. cruzi*, e estas estão se adaptando progressivamente a ecótopos artificiais, como abrigos dos animais domésticos e as habitações humanas, interferindo diretamente na veiculação do parasito no ambiente domiciliar ou na manutenção da enzootia chagásica (Vinhaes, 2000; Barreto, 1965).

A escassez de fontes alimentares para triatomíneos e animais silvestres, decorrente do desequilíbrio ecológico somado à contínua migração rural-urbana, da pobreza, e do aspecto semi-rural dos bairros periféricos de várias cidades, contribui para o estabelecimento de focos periurbanos, onde os animais domésticos ficam mais expostos, sendo sua infecção normalmente precedente à do homem (Barreto, 1965; Dias *et al.*, 2000; Roque & Jansen, 2008).

1.3 Morcegos e tripanossomatídeos

Os desequilíbrios ambientais promovem um maior contato entre vetores, animais silvestres, sinantrópicos, domésticos e o homem, amplificando a área de ocorrência de vários parasitos, alterando a ecologia do vetor, do parasito e do hospedeiro (Ávila-Pires, 1989; Roque & Jansen, 2014).

Os morcegos sinantrópicos podem favorecer a ocorrência de importantes agravos com a possibilidade de afetar o homem, os animais domésticos e os animais silvestres. Segundo Bredt e seus colaboradores (1998), anticorpos de 32 viroses e vários tipos de doenças virais associadas a morcegos já foram relatadas nos morcegos. Dentre essas, destacam-se a raiva e o hantavírus (Carneiro *et al.*, 2009; Sabino-Santos *et al.*, 2015). Além disso, vários endoparasitos, como protozoários, trematódeos, cestódeos, nematódeos, e ectoparasitos como ácaros, carrapatos e moscas já foram observados parasitando morcegos (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015; Santos & Gibson, 2015; Almeida *et al.*, 2015; Hornok *et al.*, 2015; Langourov, 2015).

Lampo e colaboradores (2000) observaram que *Lutzomyia longipalpis* é capaz de se alimentar em pelo menos 4 espécies de morcegos de três famílias diferentes: *Pteronotus*

parnellii (Mormoopidae), *Glossophaga longirostris* (Phyllostomidae), *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) e *Myotis oxyotus* (Vespertilionidae).

Exemplares de triatomíneos das espécies *Cavernicoia pilosa*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius domesticus*, *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida* e *Triatoma infestans* já foram encontrados positivos para *T. cruzi* e com sangue de morcego em seus abdomens (Dias et al., 1942; Barreto, 1968; Barreto, 1971; Barreto, 1975).

Dentre os tripanosomatídeos relatados em morcegos destacam-se os dos gêneros *Leishmania* (Tabela 1) e *Trypanosoma*, e as espécies *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Apesar desses gêneros possuírem diferentes formas de dispersão, transmissão, vetores e de sítios de colonização no hospedeiro mamífero, eles possuem uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos domésticos e silvestres, e de insetos hematófagos vetores. E como ambos não possuem métodos de controle e prevenção eficazes, desenvolvem doenças que são negligenciadas, emergentes e re-emergentes no Brasil (Saraiva et al., 1987; Roque et al., 2009; Marcili et al., 2013; Savani et al., 2010; De Lima et al., 2008).

A utilização de métodos que aumentem a acurácia da identificação dos agentes etiológicos é extremamente importante. Técnicas que utilizam a biologia molecular têm contribuído de forma significativa nas investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, diagnóstico e controle de doenças (Aransay et al., 2000; Pita-Pereira et al., 2005, Cavalcanti, 2008). No entanto, a confirmação da presença do parasito no animal pelo uso exclusivo dessas técnicas não é suficiente para definir um animal infectado como reservatório, mas apenas como um hospedeiro. Pois, considera-se reservatório um sistema que pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção do agente infeccioso na natureza, e não apenas uma única espécie de mamífero infectado (Ashford, 1996; Ashford, 1997; Haydon et al., 2002). Deste modo, cada espécie de mamífero desempenha um papel na manutenção do parasito nos sistemas reservatórios, sendo em uma escala espaço-temporal restrita, específica para cada local e cada momento (Roque et al., 2010).

Os quirópteros já são apontados como potenciais reservatórios de espécies de tripanosomatídeos do gênero *Trypanosoma*, e recentemente foram incriminados como potenciais hospedeiros reservatórios de espécies do gênero *Leishmania*. Além disso, os quirópteros podem coabitar nos seus abrigos com flebotomíneos e triatomíneos, os quais possuem capacidade vetorial em infectar-se e transmitir o parasito ao realizarem o repasto sanguíneo. Os morcegos possuem grande abundância de espécimes e riqueza de espécies,

ampla distribuição geográfica (alta mobilidade, hábito migratório), e estratégias de vida distintas (ampla diversidade de habitats e hábitos alimentares) (Millán et al., 2014; Roque & Jansen, 2010; Roque & Jansen, 2014; Berzunza - Cruz et al., 2015).

A diversidade de morcegos no Brasil ainda é subestimada (Tavares *et al.*, 2008), e a fauna parasitária é um campo de estudo negligenciado. Essa escassez de conhecimento sobre os parasitos dos morcegos se deve a resistência dos pesquisadores em trabalhar com estes mamíferos. Isto devido aos mesmos estarem associados à transmissão do vírus rábico, a mitos e lendas, além de ser um trabalho de campo noturno, que requer experiência da equipe para captura e manuseio dos animais além da exigência de licenças geralmente demoradas para sua obtenção (Deus et al., 2003; Cunha et al., 2005; Schefferet al., 2007). Para um estudo com significância estatística é preciso sacrificar um número considerável de espécimes, pois para o encontro de endoparasitos que costumam possuir baixa prevalência é preciso analisar um número elevado de diferentes tipos de amostras biológicas tais como sangue, baço, fígado, coração, medula, pele, dentre outros (Esteban *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2009).

Mais estudos focados na detecção das espécies de tripanossomatídeos que infectam morcegos são importantes para se definir o papel destes animais no ciclo epidemiológico de transmissão dos parasitos em uma determinada área e determinado tempo. Estes conhecimentos são primordiais para que se possa estabelecer medidas de controle e vigilância epidemiológicas mais eficazes para a população humana, para os animais domésticos e silvestres, inclusive os morcegos.

Tabela 1: Relação de espécies de *Leishmania* já descritas no mundo parasitando determinadas espécies de morcegos, com diferentes hábitos alimentares.

| Espécies de <i>Leishmania</i> | Espécies de morcego | Dieta | Prevalência do estudo | Citação/Local |
|-------------------------------|--|-------|-----------------------|---|
| _____ | _____ | _____ | (0/216) 0% | ROTUREAU et al. 2006 Guiana Francesa |
| <i>L. infantum</i> | <i>C. perspiscillata</i> | F | (1/11) 9.09% | DE LIMA et al. 2008 Venezuela |
| <i>L. amazonensis</i> | <i>M. molossus</i> , <i>M. rufus</i> , <i>M. nigricans</i> , <i>N. laticaudatus</i> , <i>E. glaucinus</i> , <i>E. auripendulus</i> | I | (21/659) 3.2% | SAVANI et al. 2010 São Paulo, Brasil |
| | <i>G. soricina</i> | N | | |
| | <i>A. lituratus</i> , <i>S. liliium</i> | F | | |
| <i>L. infantum</i> | <i>M. molossus</i> | I | | |
| | <i>G. soricina</i> | N | | |
| <i>L. braziliensis</i> | <i>M. molossus</i> | I | (2/5) | SHAPIRO et al. 2013 Mato Grosso do Sul, Brasil |
| | <i>G. soricina</i> | N | 40% | |
| _____ | _____ | _____ | (0/35) 0% | MILLÁN et al. 2014 Espanha |

| | | | | |
|-----------------------|---|---|------------------|---|
| <i>L. sp</i> | <i>Desmodus rotundus</i> | | (16/100) 16% | CUNHA et al. 2014 Brasil |
| <i>L. tropica</i> | <i>Cardioderma cor</i> | I | | |
| <i>L. major</i> | <i>Nycteris hispida</i> | I | (8/163) | KASSAHUN et al. 2015 |
| <i>Leishmania sp.</i> | <i>Scotophilus dinganii colias, Neoromicia somalica, Miniopterus arenarius, Glauconycteris variegata</i> | I | 4,9% | Etiópia |
| <i>L. mexicana.</i> | <i>Pteronotus personatus</i> | I | (41/420) 9,7% | BERZUNZA-CRUZ et al., 2015 México |
| | <i>Artibeus jamaicensis, Artibeus lituratus, Dermanura phaeotis, Carrollia sowellii, Choenoriscus godmani, Sturnira lilium, Sturnira ludovici</i> | F | | |
| | <i>G. commissaris, G. soricina, Leptonycteris curaso, Choeroniscus godmani</i> | N | | |
| | <i>Phyllostomus discolor</i> | O | | |
| | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | |
| <i>L. amazonensis</i> | <i>Artibeus lituratus, Artibeus planirostris, P. lineatus</i> | F | (117/488) | OLIVEIRA et al. 2015 |
| | <i>Eumops glaucinus, Myotis nigricans, Molossus rufus</i> | I | | |
| <i>L. infantum</i> | <i>Desmodus rotundus</i> | H | 23,9% | São Paulo, Brasil |
| | <i>Molossus molossus, Molossus rufus</i> | I | | |
| | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | |

Legenda: C – Carnívoro, F - Frugívoro, H – Hematófago, I – Insetívoro, N – Nectarívoro, O – Onívoro.

* As espécies destacadas em vermelho possuem relato de ocorrência em Montes Claros.

Tabela 2: Relação de espécies de *Trypanosoma* , confirmados através de análises filogenéticas, já descritas no mundo parasitando determinadas espécies de morcegos, com diferentes hábitos alimentares.

| Espécie de Trypanosoma | Espécies de morcego | Dieta | Prevalência do estudo | Citação/Local |
|-------------------------------|--|--------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>T. dionisii</i> | <i>Pipistrellus pygmaeus, Nyctalus noctula, Eptesicus serotinus, M. mystacinus</i> | I | (17/154) 11,0 % | HAMILTON et al., 2012. |
| <i>T. vespertilionis</i> | <i>Nyctalus noctula</i> | I | | Inglaterra |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Thyroptera tricolor, Myotis albescens, Myotis ruber, Myotis albescens</i> | I | | |
| | <i>Myotis levis, Noctilio albiventris, Myotis nigricans</i> | | | |
| | <i>Carollia perspicillata</i> | F | 2009 | |
| <i>T. cruzi marinkellei</i> | <i>Artibeus planirostris, Carollia perspicillata</i> | F | NC | MARCILI et al., 2009, 2013 |
| | <i>Trachops cirrhosus, Chrotopterus auritus</i> | C | | |
| | <i>Phyllostomus discolor, Phyllostomus hastatus</i> | O | 2013 | |
| | <i>Tonatia bidens, Lophostoma silvicolum</i> | I | (19/211) | Brasil, África |
| <i>T. dionisii</i> | <i>Carollia perspicillata, Sturnira lillium</i> | F | 9,0% | |
| | <i>Eptesicus brasiliensis, Molossus molossus, Pipistrellus pipistrellus</i> | I | | |
| <i>T. erneyi</i> | <i>Tadarida sp., Mops condylurus</i> | I | | |

| | | | | |
|--------------------------|--|---|---------------------|---|
| <i>T. rangeli</i> | <i>Artibeus planirostris, Platyrrhinus lineatus</i> | F | NC | MAIA DA SILVA et al., 2009 Brasil, Inglaterra, Bélgica, África |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Noctilio albiventris, Myotis nigricans</i> | I | | |
| <i>T. c. marinkellei</i> | <i>Phyllostomus discolor</i> | O | | |
| | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | |
| | <i>Artibeus planirostris</i> | F | | |
| <i>T. dionisii</i> | <i>Pipistrellus pipistrellus, Myotis nigricans</i> | I | | |
| | <i>Sturnira lillium, Carollia perspicillata</i> | F | | |
| | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | |
| <i>T. desterrensis</i> | <i>Eptesicus furinalis</i> | I | | |
| <i>T. hastatus</i> | <i>Phyllostomus hastatus</i> | O | | |
| <i>T. vespertilionis</i> | <i>Pipistrellus pipistrellus</i> | I | | |
| <i>T sp 60</i> | <i>Rousettus aegyptiacus</i> | F | | |
| <i>T. c. marinkellei</i> | <i>Artibeus planirostris, Carollia perspicillata</i> | F | (135/1043) 12,9% | CAVAZZANA et al., 2010 |
| | <i>Tonatia bidens, Lophostoma silvicolum</i> | I | | |
| | <i>P. hastatus, P. discolor, Phyllostomus sp.</i> | O | | |
| | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | |
| | <i>Trachops cirrhosus, Chrotopterus auritus</i> | C | | |
| <i>T. dionisii</i> | <i>Phyllostomus hastatus</i> | O | | |
| | <i>Desmodus rotundus, Diphylla ecaudata</i> | H | | |
| | <i>Anoura sp</i> | N | | |

| | | | | |
|---------------------------|--|---|----------|---------------|
| | <i>C. perspicillata, S. lillium, Uroderma bilobatum</i> | F | | |
| | <i>M. molossus, Promops sp, N. albiventris, E. brasiliensis</i> | I | | |
| | <i>M. nigricans, M. albescens, P. pipistrellus</i> | I | | |
| <i>T. cruzi</i> | <i>P. pipistrellus, M. albescens, M. levis, M. nigricans</i> | I | | |
| | <i>M. ruber, Noctilio albiventris, Thyroptera tricolor</i> | F | | |
| | <i>P. lineatus, A. planirostris, Rousettus aegyptiacus, Carollia perspicillata</i> | F | | |
| <i>T. livingstonei</i> | <i>Rhinolophus lander, Hipposideros caffer</i> | I | 2012 | |
| <i>Trypanosoma erneyi</i> | <i>Tadarida sp.</i> | I | (6/24) | LIMA et al., |
| | | | 25% | 2012, 2013 |
| <i>T. vespertilionis</i> | <i>Mopys condylurus, Pipistrellus pipistrellus</i> | I | 2013 | África |
| | | | NC | Inglaterra |
| <i>T. c. marinkellei</i> | <i>Carollia perspicillata,,</i> | F | (18/115) | GARCIA et al. |
| | <i>Phyllostomus discolor</i> | O | 15,6% | 2012 |
| <i>T. dionisii</i> | <i>Carollia perspicillata,,</i> | F | | |

Legenda: C – Carnívoro, F - Frugívoro, H – Hematófago, I – Insetívoro, N – Nectarívoro, O – Onívoro, NC – Não é citado no trabalho.

* As espécies destacadas em vermelho possuem relato de ocorrência em Montes Claros.

1.4 Tripanossomatídeos na cidade de Montes Claros

A cidade de Montes Claros situa-se no Norte de Minas Gerais e conta com aproximadamente 355 mil habitantes sendo mais de 95% desse contingente residente em área urbana (IBGE, 2010). O desenvolvimento da cidade e o crescimento populacional, aliados as alterações ambientais promoveram o estabelecimento de vetores, quirópteros e tripanossomatídeos nas áreas urbanas constituindo um possível problema que pode atingir grandes proporções, com sérias implicações para a saúde pública.

De acordo com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Montes Claros, de 2007 a 2011 foram confirmados 129 casos humanos de LV, com 10 óbitos. Dados obtidos no ano de 2012 até o mês de junho registram 29 notificações de LV com dois óbitos no município de Montes Claros (SINAN, 2012). Nos anos de 2014 e 2015 foram confirmados 12 e 17 casos de LV, respectivamente. Segundo dados do setor de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Montes Claros, 32 pessoas tiveram LT em 2009, aumentando em 137% no ano de 2010 com 76 casos e em 2011 com 77 casos. Em 2014 e 2015 foram registrados 56 e 49 casos de LTA em Montes Claros, porém não foi realizada investigação epidemiológica para a confirmação da autoctonia.

A realização de 44.228 exames sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães da cidade, no período de 2009 a 2011, detectou 2.472 cães com sorologia positiva. Em 2014, dos 21.208 cães examinados em um inquérito censitário 1.025 foram reativos (4,8%), e dos 2.159 cães examinados pela demanda espontânea 804 foram reativos (37,2%). E em 2015 dos 6.173 examinados pelo inquérito censitário 623 foram reativos (10,1%), e dos 1.463 examinados através da demanda espontânea 527 foram reativos (36%).

O município de Montes Claros foi escolhido pelo Ministério da Saúde para participar de um projeto piloto do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral por apresentar grande número de casos humanos e caninos. O projeto visa avaliar a eficácia do uso de uma coleira à base de deltramina 4%, que funciona como inseticida e repelente, protegendo os cães das picadas dos flebotomíneos. Os bairros Maracanã, Vila Campos, Vila Greyce, Vila Vargem Grande, Conjunto Joaquim Costa, Ciro dos Anjos, Chiquinho Guimarães, Nossa Senhora das Graças, Dona Gregória, Conjunto Habitacional Olga Benário, Vila Itatiaia, Conjunto Habitacional José Correia Machado e Alterosa foram envolvidos no projeto contemplando o encoleiramento em massa dos cães. Já os bairros Vila Luiza, João Botelho, Vila Sumaré, São Judas Tadeu II, Dr. Antônio Pimenta, Dr.

João Alves, Vila Telma, Conjunto José Carlos de Lima, Maria Cândida, Conjunto Havaí, Morrinhos, Clarindo Lopes, Francisco Peres, Santa Rita I e Roxo Verde receberam apenas o monitoramento da infecção canina para efeitos de comparação. Todos os bairros foram escolhidos de acordo com a prevalência dos casos humanos e caninos da LV.

Estudo realizado por Rocha (2002) analisou 6.928 cães em 15 bairros de Montes Claros e estimou em 4,6% a média anual da prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC). Posteriormente, foram examinados 4.795 cães e verificou-se a média de infecção em torno de 5%, além de terem sido capturados um total de 1043 exemplares pertencentes a 16 espécies de flebotomíneos (Monteiro *et al.* 2005). Conclui-se que a LVC está amplamente distribuída no município de Montes Claros, caracterizando a região como uma importante área endêmica, devido à significativa presença do vetor, tanto no intra como no peridomicílio, e ao grande número de casos caninos da doença (Monteiro *et al.*, 2005). Nenhuma pesquisa envolvendo outros possíveis reservatórios como marsupiais, roedores, gatos e morcegos foi realizada no município.

De acordo com a Vigilância Epidemiológica do município de Montes Claros, não consta nenhum caso de Doença de Chagas notificado no município de Montes Claros nos últimos 5 anos. Vale ressaltar que somente é de notificação compulsória os casos agudos.

O município, além de possuir clima favorável, possui moradores com baixos níveis sócio-econômicos e que vivem em habitações extremamente simples, com deficiência na coleta de lixo e de saneamento básico (Monteiro *et al.*, 2005). Há bairros e comunidades periféricas em processo de urbanização localizadas muito próximas as áreas verdes. Alguns moradores possuem elevada convivência com animais domésticos e animais de produção, que são conhecidas fontes de alimentação, mantenedoras de colônias de triatomíneos e flebotomíneos. Além disso, em algumas residências há o acúmulo de matéria orgânica e entulhos como lixo, madeira, telha e outros o que propícia o surgimento de criadouros de flebotomíneos e triatomíneos.

1.5 Técnicas biomoleculares

Na primeira metade da década de 80 um método de amplificação de sequência de DNA foi desenvolvido e revolucionou a análise genética nestes últimos anos: a reação de polimerase em cadeia (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Essa tecnologia concebida por Kary Mullis proporcionou estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Vários métodos de detecção de ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA, foram desenvolvidos a fim de aperfeiçoar as pesquisas em diversas áreas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste na reação em cadeia que permite a amplificação, por meio da enzima Polimerase, de frações de moléculas de DNA de qualquer espécie, dentre elas, os parasitas, dando-lhes assim, sua identidade (Silva et al., 2002). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, tais como especificidade e alta sensibilidade, capacidade de detecção e identificação do protozoário envolvido, além de produzir um resultado em poucas horas, confiável e utilizando-se de amostras de DNA pós-extração (Ikononopoulos et al., 2003).

O monitoramento da leishmaniose requer ferramentas rápidas e que possam ser facilmente transferidas para a identificação de espécies. Isso pode ser conseguido através da técnica de PCR, com os ensaios que combinam um elevado nível de detecção com o poder discriminatório adequado. Existem alguns alvos genéticos que estão disponíveis para essa finalidade: DNA ribossomal (ITS), genes gp63, genes miniexon, DNA de cinetoplasto e um ensaio baseado na amplificação por PCR de genes *hsp70* (*heat shock protein 70*), seguido pela análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (*hsp70* de PCR-RFLP) (Garcia et al., 2004). O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é um tipo de marcador molecular codominante, identificado por hibridização (Ferreira & Grattapaglia, 1995), que permite discriminar as espécies de *Leishmania* através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, gerados após digestão com endonucleases (Spanakos et al., 2007)

Genes *hsp70* representam um alvo adequado para identificar espécies de *Leishmania* neotropicais em tecidos de hospedeiros. Eles trazem informações complementares para outros marcadores que permitem a sondagem da variabilidade

genética de moléculas, possivelmente envolvidos na imunopatologia, e apresentam uma menor taxa de variação genética do que os genes gp63 ou rDNA ITS (Garcia et al., 2004).

O método baseado em sondas de DNA para o diagnóstico rápido da leishmaniose refere-se a uma técnica utilizada para isolar DNA do cinetoplasto (kDNA), o DNA mitocondrial não usual, assim é possível distinguir os dois principais agentes da leishmaniose, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana*, mas não discrimina as subespécies dentro desses complexos (Rogers & Wirth, 1987).

No genoma de tripanossomatídeos, várias sequências de DNA são utilizadas em estudos diversos, tais como a região ITS (Internal Transcribed Spacer), sequências teloméricas, o locus gp63, sequências alvo em genes rRNA, como 18S e 16S SSU- rRNA, e as regiões conservadas do minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Wortmann et al., 2001).

Em tripanossomatídeos, o DNA mitocondrial é conhecido como DNA do cinetoplasto, ou kDNA, representando cerca de 20 a 25% do DNA celular total. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares, cada organismo contendo de 10.000 -20.000 minicírculos e 20-50 maxicírculos, concatenados em uma única rede (Simpson, 1987; Stuart e Feagin, 1992). No que diz respeito a *Leishmania* são estimados cerca de 10.000 minicírculos, por parasito (Degraeve et al., 1994). As proteínas essenciais para a atividade mitocondrial são codificadas, nos tripanossomatídeos, pelos maxicírculos (DNA mitocondrial), enquanto que as moléculas de RNAs-guias usadas na organização dos transcritos destes maxicírculos são codificadas pelos minicírculos (Simpson et al., 1987). Assim, o DNA mitocondrial é considerado um marcador excelente para estudos filogenéticos e taxonômicos, uma vez que apresenta uma taxa de evolução alta e heterogênea entre seus genes, além de ausência de recombinação (Meyer, 1993).

Os padrões de digestão de kDNA por endonucleases de restrição (esquizodemas) são característicos de espécies, subespécies, cepas e mesmo clones de tripanossomatídeos (Morel e Simpson, 1980; Morel et al., 1980), sendo que os minicírculos de kDNA são ótimos alvos para diagnósticos por PCR, uma vez que apresentam uma quantidade grande de cópias e sua sequência ser conhecida para maioria das espécies de *Leishmania*, além do seu polimorfismo entre espécies e isolados.

Os genes de rDNA amplamente distribuídos ao longo do genoma, além de serem, em todos os organismos conhecidos como funcionalmente equivalentes, têm sido

considerados bons marcadores para inferências em estudos filogenéticos. Essa excelência como marcadores é válida também para tripanossomatídeos, uma vez que os cístrons ribossômicos apresentam um alto grau de polimorfismo, devido à existência de regiões com diferentes graus de variabilidade, transcritas ou não (Sogin et al., 1986).

As sequências da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) apresentam regiões variáveis, flanqueadas por regiões conservadas, permitindo alinhamentos extremamente confiáveis, e ainda compreendem características únicas, tais como o tamanho e a facilidade de obtenção pela PCR, que as têm tornado as mais utilizadas em trabalhos filogenéticos (Hernández et al., 1990). Especialmente em tripanossomatídeos, Hernadéz et al., (1990) relataram a presença, na subunidade SSU dos genes de rDNA, oito regiões conservadas, chamadas U1-U8, e nove regiões variáveis, conhecidas como (V1-V9).

2. JUSTIFICATIVA

Os morcegos são animais silvestres que apresentam características potenciais como agentes dispersores de patógenos, pois possuem grande mobilidade e contato direto ou indireto com os humanos. Compõem cerca de 27% da fauna de mamíferos do Brasil, dispondo de ampla diversidade e riqueza, podem ter grande longevidade, além de possuírem uma ampla gama de hábitos alimentares e abrigos, os quais variam entre as áreas preservadas e as áreas urbanizadas (Muhldorfer, 2012).

A grande expansão urbana causa perturbações nos fragmentos florestais e leva vetores e animais silvestres, hospedeiros-reservatórios do ciclo silvestre dos agentes causadores das leishmanioses e tripanossomíases, a migrarem e se adaptarem cada vez mais nas cidades. Estes fatos podem acarretar uma crescente incidência de zoonoses nas cidades e nas florestas, já que os morcegos podem propagar patógenos da fauna silvestre para a cidade e vice e versa.

O município de Montes Claros é uma área endêmica para as leishmanioses visceral e tegumentar e possui características que podem contribuir diretamente para a urbanização do ciclo de transmissão e a manutenção de um ciclo enzoótico dos parasitos das leishmanioses e da doença de Chagas no município. Os estudos sobre a quiropterofauna brasileira são escassos, (Bernard et al., 2011) e os estudos sobre a fauna parasitária é ainda um campo de estudo negligenciado.

Nos últimos dez anos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% das doenças que têm infectado humanos são de origem animal, e muitas delas são de difusão global (Field et al. 2004). Os resultados obtidos com este estudo poderão contribuir para um maior e melhor entendimento sobre as possíveis implicações dos morcegos urbanos para com a saúde pública humana e sanidade animal.

Assim, o presente estudo pretende apresentar novas informações de importância ecológica e epidemiológica, com a investigação da ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos coletados no município de Montes Claros. Será possível conhecer melhor a biologia e a ecologia parasitária dos quirópteros, e assim compreender melhor o papel desses animais no ciclo ecoepidemiológico de transmissão dos agentes etiológicos das leishmanioses e tripanossomíases.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Pesquisar a ocorrência natural de tripanossomatídeos em morcegos coletados em diferentes ecótopos no município de Montes Claros, para avaliar o potencial destes mamíferos na manutenção dos ciclos de transmissão dos tripanossomatídeos.

3.2. Objetivos específicos

- Inventariar a quiropterofauna de áreas de parque e áreas urbanizadas do município de Montes Claros, MG.
- Detectar e identificar, através de técnicas de biologia molecular, as espécies de tripanossomatídeos em morcegos do município de Montes Claros, MG.
- Avaliar as características e os locais de ocorrência dos morcegos infectados por tripanossomatídeos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética e biossegurança

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal. O projeto possui aprovação do CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG com o protocolo 333 / 2013 (Anexo 1).

A licença de coleta e sacrifício dos quirópteros foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, através do registro 41709-1 referente a titular Thallyta Maria Vieira (Anexo 2). A licença de coleta e captura de morcegos em caverna foi fornecida pelo SISBIO, através do registro 41245-1, referente a titular Thallyta Maria Vieira (Anexo 3). As autorizações para as coletas nos parques estadual e municipal foram fornecidas pelo Instituto Estadual de Florestas de MG (012/2014) e pela Secretaria Adjunta do Meio Ambiente de Montes Claros, respectivamente (Anexo 4 e 5).

Os pesquisadores que manusearam os morcegos receberam vacinas contra a raiva, tétano e febre amarela. Observou-se a titulação de anticorpos igual ou superior a 0,5UI/mL (Unidade Internacional por mL) para a vacina de raiva, conforme exigido pelo Ministério da Saúde (OMS, 1992).

4.2. Área do estudo

O município de Montes Claros está situado na Bacia do Alto Médio São Francisco, ao norte do Estado de Minas Gerais, localizado na latitude 16° 43' 41", longitude 43° 51' 54" e altitude de 638 metros. O clima da região é classificado segundo Koppen como tropical de savana (Aw), com verão chuvoso e inverno seco, sendo as estações seca e chuvosa bem definidas (Sá-Júnior et al., 2012). O período chuvoso se concentra entre os meses de outubro a março e a temperatura média em torno de 25°C (Secretaria Municipal de Desenvolvimento Econômico, Turismo, Ciência e Tecnologia de Montes Claros, 2011).

Montes Claros conta com aproximadamente 355.401 mil habitantes e mais de 95% desse contingente reside em área urbana (IBGE 2010). Alguns bairros do município são localizados próximos a manchas de mata remanescente, e outros localizados em áreas com árvores isoladas. No entanto, em todos os bairros há, em diferentes proporções, características que oferecem uma diversa gama de abrigos e alimentos para os morcegos como telhados, sótãos, cunheiras e árvores. A presença de palmeiras, galinheiros, chiqueiros, currais, ninhos de pardais e pombos, acúmulo de madeiras, telhas, lixo e folhas favorecem a ocorrência de espécies de flebotomíneos e triatomíneos que são vetoras de *Leishmania* e *Trypanosoma*, respectivamente. Essa combinação de abrigo e recursos alimentares permite o desenvolvimento e a procriação dos morcegos e insetos vetores e conseqüentemente, a possível infecção dos morcegos por tripanossomatídeos (Gonçalves et al., 2004, Galati et al. 2006). Os parques do município são caracterizados por possuírem um relevo cárstico com presença de várias cavidades, onde há a coabitação de diversas espécies animais incluindo morcegos, flebotomíneos e triatomíneos.

O estudo foi realizado durante 13 meses consecutivos, preferencialmente na lua nova, em quatro locais do município de Montes Claros:

a) dois bairros, sendo um mais urbanizado - Vila Luiza (VL), e outro menos urbanizado - Nossa Senhora das Graças (NSG);

b) dois parques sendo um mais preservado - Parque Estadual da Lapa Grande (PELG), e outro menos preservado - Parque Municipal da Sapucaia (PMS).

Todos os locais selecionados apresentam relato de casos de leishmaniose humana (Figura 1). As coordenadas geográficas foram obtidas com o GPS Garmin Etrex.

Em todos os locais de coleta foram amostrados cinco pontos e em cada ponto instalou-se uma rede de neblina para captura e coleta de morcegos. Abaixo uma breve descrição dos quatro locais de coleta.



Figura 1: Localização dos quatro locais de coleta de morcegos no município de Montes Claros, MG, Brasil. Fonte: Google Earth Pro 2015.

O bairro Vila Luiza situa-se próximo da área central e do cemitério da cidade e possui intenso fluxo de veículos (Figura 2). No bairro vizinho, próximo das áreas de coleta, há uma praça com várias mangueiras. No entanto, no bairro Vila Luiza todas as residências amostradas possuíam lotes medianos, poucas árvores frutíferas e cães. Já as residências mais modestas do bairro além de cães possuem gatos, galinhas e cavalos. No período do estudo não foram notificados casos de LV e LTA no bairro Vila Luiza.



Figura 2: Pontos de coleta de morcechos no bairro Vila Luiza ($16^{\circ}44'27.86''S$ $43^{\circ}51'45.93''O$): Pontos 1 e 3: Cemitério; Ponto 2: Praça do cemitério; Pontos 4 e 5: Residências. Fonte: Google Earth Pro, 2015.

O bairro Nossa Senhora das Graças apesar de também estar inserido na área urbana, é um bairro mais afastado, possuindo uma grande área verde, e um lago (Figura 3). As residências são formadas por lotes grandes no estilo de sítios onde há o cultivo de variadas árvores frutíferas e a criação de animais, como porco, cavalo, boi e galinha. Em todas as residências há cachorros e gatos reproduzindo constantemente.

A maioria dos moradores possui perfil sócio econômico baixo e o costume de acumular materiais e lixo no próprio peridomicílio. Apenas uma residência os moradores possuíam estudo superior e uma melhor condição de vida, embora também houvesse acúmulos de materiais no peridomicílio, presença de cães de rua e criação de cavalos. Somente na avenida principal do bairro e nos horários de pico há trânsito intenso de veículos automotores.

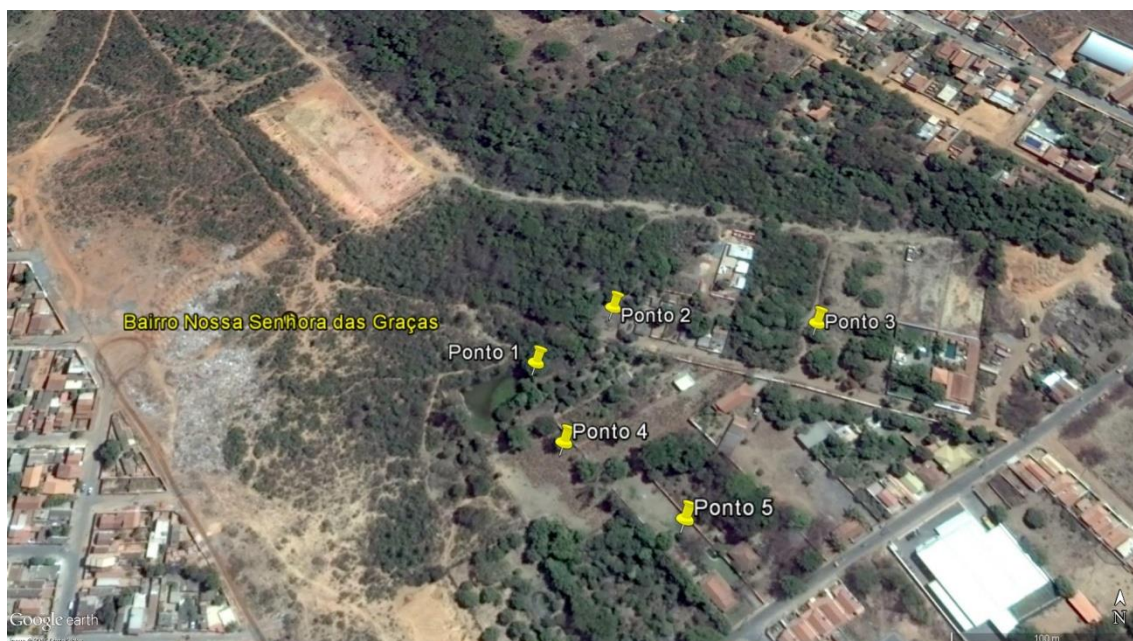


Figura 3: Pontos de coleta no bairro Nossa Senhora das Graças (16°45'46.91"S 43°51'12.19"O). Ponto 1, 2, 3, 4 e 5: Residências. Fonte: Google Earth Pro 2015.

O Parque Municipal Dr. Simeão Ribeiro Pires, mais conhecido como Parque da Sapucaia (PMS), é um remanescente de floresta nativa com cerca de 30 ha abrangendo boa parte da Serra do Ibituruna. É administrado pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Montes Claros. Possui relevo cárstico com presença de grandes formações rochosas com altitudes variando entre 680 e 810m. A vegetação é definida, predominantemente, por mata seca (*sensu stricto*) (Rizzini, 1976; Santos et al. 2007). Além de possuir o bairro Morada da Serra em seu entorno, o local é bastante utilizado para visitação pública (Figura 4). Como não há monitoramento e fiscalização é comum haver queimadas criminosas, lixo jogado no chão, e formação de trilhas. Há presença de animais domésticos nas residências localizadas no entorno do parque e dentro do parque.

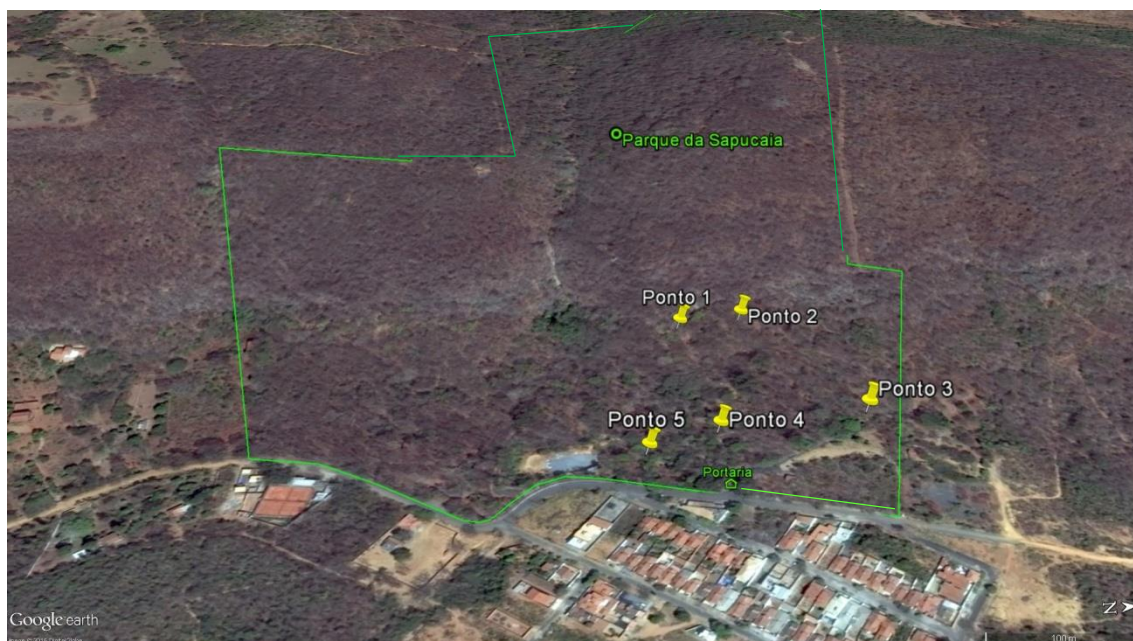


Figura 4: Pontos de coleta no Parque Municipal da Sapucaia (16°46'5"S 43°53'15"W). Pontos 1 a 5: Mata Seca. Fonte: Google Earth Pro 2015.

O Parque Estadual da Lapa Grande (PELG) é uma unidade de conservação de proteção integral criado pelo Decreto nº 44.204, de 10 de janeiro de 2006 e administrado pelo Escritório Regional Norte do Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF-MG). Possui área aproximada de 15.360,43 ha com perímetro de 78.201,90 metros e encontra-se a 12 Km do centro urbano de Montes Claros. O parque está em uma área de transição entre o Cerrado *sensu stricto* e remanescentes da Floresta Estacional Decídua “Mata Seca” e Semi Decidua “Mata Ciliar” (oliveira et al. 2013). A altitude varia entre 680m e 1038m e há grande concentração de cavernas, abrigos dolinas, sumidouros e ressurgências. Além de abrigar um dos principais mananciais de fornecimento de água para o município, abriga uma diversificada fauna e flora (IEF, 2014). A visitação pública é realizada em pequenos grupos, em horário definido e acompanhados por guias. As trilhas e todo o parque são fiscalizados e monitorados. Há presença de animais domésticos apenas nas residências localizadas no entorno do parque.



Figura 5: Pontos de coleta no Parque Estadual da Lapa Grande ($16^{\circ}42'25.55''S$ $43^{\circ}56'27.99''O$). Pontos 1 e 2: Cavidade Lapa Grande; Pontos 3 a 5: Mata de galeria. Fonte: Google Earth Pro 2015.

4.3. Atividades realizadas no campo

Antes da escolha dos pontos de coleta um folder com informações sobre o projeto e as leishmanioses foi elaborado e distribuído aos moradores dos bairros pertencentes ao estudo com o objetivo de apresentar o projeto, através de uma visita explicativa (Anexo 6). Os moradores que relatavam a presença de morcegos em suas residências e que apoiaram a ideia do estudo tiveram suas residências escolhidas para a realização das capturas.

Com a finalidade de treinar a equipe, duas capturas foram realizadas antes do início do projeto. Os estagiários voluntários aprenderam armar e desarmar as redes de neblina, retirar os morcegos da rede, e a tria-los utilizando uma metodologia padronizada. Os dados dessas capturas não foram computados no estudo.

Durante o desenvolvimento do projeto realizaram-se várias palestras e oficinas (Anexo 7). Além de apresentar o estudo era trabalhada a educação ambiental e a educação em saúde. As visitas explicativas, as palestras e as oficinas permitiram a construção do conhecimento comum entre a equipe do projeto e a comunidade, onde através do contato direto foi trabalhado não só o tema do projeto, mas vários temas da parasitologia.

4.3.1 Captura e coleta dos morcegos

De acordo com a licença do SISBIO foram coletados até cinco indivíduos da ordem Chiroptera por captura em cada um dos quatro locais selecionados, totalizando até 20 indivíduos por mês.

Para a captura dos animais foram utilizadas luvas de raspa e redes de neblina (12 x 2,5 m – Ecótone, Polônia), dispostas no peridomicílio de cada residência ou determinada trilha dos parques. Para isto, as possíveis rotas de vôo foram observadas com antecedência para a escolha dos pontos estratégicos. As redes permaneceram abertas por cinco horas a partir das 18 horas. O esforço amostral foi calculado conforme STRAUBE & BIANCONI (2002), sendo a área da rede x tempo de exposição x número de repetições x número total de redes.

Os morcegos capturados foram acondicionados em sacos de algodão individualizados (20 x 20 cm) para posterior identificação. Todos os espécimes capturados foram identificados com o auxílio de chaves taxonômicas (Gregorin & Taddei, 2002; Charles-Dominique, 2001; Timm et al. 1998, Medellín et al. 1997), registrando-se sexo, classe de idade, estágio reprodutivo, peso e medida do antebraço. A classe de idade foi verificada através da ossificação das epífises das falanges, classificando os indivíduos em jovens, subadultos ou adultos (Anthony, 1988). O sexo e o estado reprodutivo das espécies foram verificados visualmente, sendo as fêmeas classificadas como: fêmea jovem (fêmea adulta com abdômen sem feto detectável por apalpação e mamas não desenvolvidas), fêmea prenha (fêmea adulta com feto detectável por palpação do abdômen), fêmea lactante (fêmea adulta com mamas bem desenvolvidas, desprovidas de pêlos ao redor e com secreção de leite verificada por leve pressão das mesmas), fêmea pós-lactante (fêmea adulta com mamas flácidas, desprovidas de pêlos ao redor e ausência de leite quando pressionadas). E os machos classificados como: macho escrotado (sexualmente ativo), macho não escrotado (sexualmente inativo).

Após a identificação, até cinco indivíduos foram selecionados aleatoriamente para compor a amostra. Para cada indivíduo coletado foi preenchida uma ficha de campo (Anexo 8). Os indivíduos restantes foram identificados com colar de plástico e anilha (Anilha Capri, Brasil) e soltos (Figura 6). Fêmeas prenhas, lactantes ou com filhotes não foram coletadas.

Através de um termohigrômetro obteve-se as médias mensais de temperatura e umidade de cada local do estudo.



Figura 6: Procedimento de campo: A: Captura do morcego na rede de neblina B: Morcegos acondicionados em saco de algodão. C: Triagem e identificação das espécies; D: Morcego *Desmodus rotundus* identificado com anilha.

4.4. Atividades realizadas no laboratório

4.4.1. Eutanásia e coleta de amostras biológicas dos morcegos

Os morcegos coletados foram conduzidos ao laboratório de Parasitologia situado no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus de Montes Claros. Utilizando luvas apropriadas, óculos e máscara especial para proteção de inalantes, os morcegos coletados foram anestesiados utilizando Cloridrato de Ketamina (peso/volume), por via intramuscular no músculo peitoral (Portaria CFBio N° 148/2012). Para a coleta de sangue, o animal foi colocado com as asas abertas em decúbito dorsal sobre uma superfície rígida, forrada com plástico branco, para a realização da punção cardíaca, utilizando seringa de 1mL acoplada a agulha 25x7mm.

Posteriormente o animal foi sacrificado com superdosagem do anestésico (Portaria CFBio N° 148/2012).

Durante a necropsia, ao lado da chama, coletou-se um fragmento de pele, o baço, o fígado e a medula de cada morcego. As amostras foram acondicionadas em microtubos com RNAlater (RNAlater®, Quiagen) e armazenadas a -4°C (Figura 7).

Coletaram-se também ectoparasitos, helmintos e amostras de sangue, swab salivar e swab anal dos morcegos. Estas amostras foram encaminhadas a colaboradores da Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade de São Paulo (USP) no intuito de pesquisar a ocorrência de vírus, bactérias, protozoários e helmintos.



Figura 7: Procedimentos de laboratório. A: Realização da eutanásia e necropsia dos morcegos. B: Coleta das amostras biológicas, ao lado da chama, para a cultura. C: Coleta do baço para pesquisa de tripanossomatídeos. D: Coleta de sangue para pesquisa de tripanossomatídeos.

4.4.2 Carcaças dos morcegos

Para maior segurança da equipe as carcaças dos espécimes coletados foram encaminhadas, refrigeradas, pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Montes Claros para o Setor de Diagnóstico da Raiva, do Laboratório de Zoonoses do CCZ de Belo Horizonte (BH) para realização de exames para detecção do vírus rábico através da Imunofluorescência Direta e do método da Inoculação Intracerebral em camundongos (prova biológica), conforme metodologia estabelecida no laboratório.

Posteriormente as carcaças foram depositadas e tombadas na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.5 Pesquisa de Tripanossomatídeos

4.5.1 Isolamento dos parasitos

De todos os morcegos coletados amostras de sangue, baço e fígado foram inoculadas em meio de cultura NNN/LIT para a tentativa de isolamento de parasitos. Os tubos foram acondicionados em estufa biológica à temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$ e examinados, por microscopia óptica para pesquisa de formas flageladas. Os exames foram realizados quinzenalmente durante dois meses no laboratório Biologia de *Leishmania* do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

As culturas positivas foram criopreservadas em nitrogênio líquido, de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório de Biologia de *Leishmania* do ICB/UFMG.

4.5.2 Diagnóstico Molecular

As amostras dos morcegos coletados e analisados tiveram seu DNA extraído e submetido a testes moleculares, os quais estão apresentados no organograma (Figura 8) e descritos nos subtópicos abaixo.

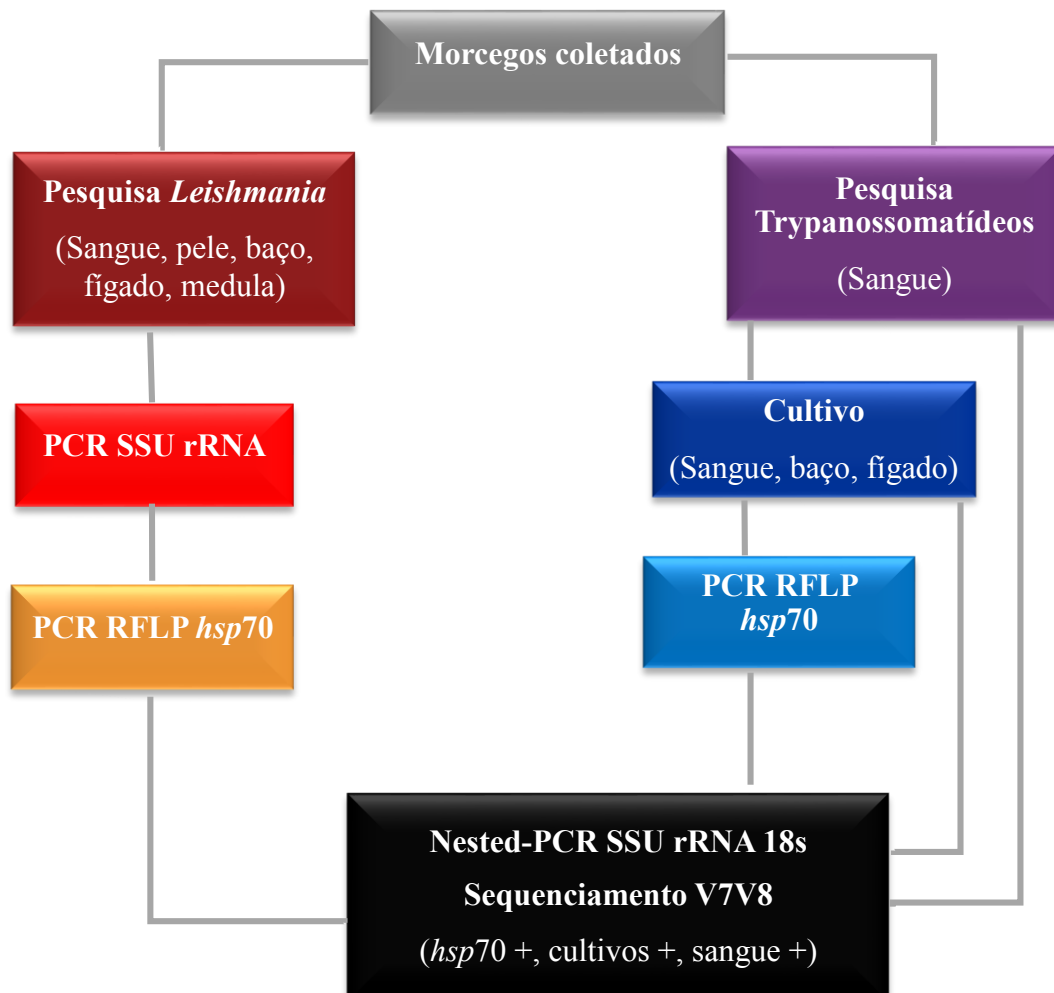












Figura 8: Organograma dos testes moleculares realizados no estudo. Legenda:

-  Morcegos coletados no Município de Montes Claros.
-  Metodologias usadas para a pesquisa de espécies de *Leishmania*.
-  PCR SSU rRNA – Realizada a partir do DNA extraído das amostras de pele, sangue, baço, fígado e medula (Van Eys et al., 1992).
-  PCR RFLP hsp70 - Realizada a partir do DNA extraído das amostras positivas selecionadas pela PCR SSU rRNA (Garcia et al., 2004).
-  PCR SSU rRNA 18 S e sequenciamento - Realizada a partir das amostras positivas selecionadas pelo *hsp70* (Noyes et al. 1999,2000).
-  Metodologias usadas para a pesquisa de espécies de *Trypanosoma*.
-  Cultivo – Realizado a partir de fragmentos das amostras de sangue, baço e fígado.
-  PCR hsp70 - Realizado a partir do DNA extraído dos tripanossomatídeos isolados nos cultivos.
-  PCR SSU rRNA 18 S e sequenciamento - Realizada a partir do DNA extraído dos tripanossomatídeos isolados nos cultivos.
-  Sequenciamento da região SSU rRNA 18S - Realizado a partir do DNA extraído das amostras de sangue.

4.5.2.1 Extração de DNA

Extraíu-se o DNA dos isolados e das amostras de sangue, baço, fígado, medula e pele dos morcegos utilizando o kit de extração “PureLink™ Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen®), conforme protocolo descrito pelo fabricante. O DNA foi dosado (NanoDrop®), aliquotado e estocado a -20° C.

4.5.3 Pesquisa de *Leishmania*

Para detecção de *Leishmania* sp., alíquotas de DNA extraído de todas as amostras biológicas (pele, sangue, baço, fígado, medula) foram submetidas a reações de amplificação utilizando o alvo SSU-rRNA. As amostras positivas foram submetidas a uma nova PCR direcionada ao gene *hsp70* utilizando a enzima de restrição *Hae* III para

análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição e identificação das espécies de *Leishmania*.

DNA das amostras positivas pela PCR *hsp70* também foram submetidas a detecção de *Leishmania* por PCR SSU-rRNA e identificação por sequenciamento, porém essas metodologias serão descritas no tópico 4.5.4.1 e 4.5.4.2.

4.5.3.1 Detecção de *Leishmania* por PCR SSU-rRNA

A PCR direcionada ao alvo SSU-rRNA (subunidade menor do ribossomo) foi realizada utilizando os iniciadores R223 5' TCCCATCGCAACCTCGGTT 3' e R333 5' AAAGCGGGCGCGGTCTG 3' gerando um fragmento de 350 pb (VAN EYS et al., 1992). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL, sendo 5µL de DNA da amostra, utilizando o kit Illustra puReTaq ready-to-Go PCR Beads (GE Healthcare) nas seguintes concentrações finais dos reagentes: 200µM de cada dNTP em 10mM Tris-HCl (pH9.0), 50mM KCl e 1,5mM de MgCl₂, 2,5U de Taq DNA polimerase e 10 pmol de cada iniciador (IDT, prodimol). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 65°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 6 min.

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, visualizados no transluminador, e fotografados para documentação e análise dos resultados.

4.5.3.2 Identificação das espécies de *Leishmania* por PCR RFLP *hsp70*

A PCR direcionada ao gene *hsp70* utilizou os iniciadores HSP70 senso: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e *hsp70* anti senso: 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3', que gera um fragmento de 1300pb (Garcia et al., 2004). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µL do DNA molde, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 1,5 µl de DMSO 5,0% (Invitrogen), 0,25 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl

(Invitrogen), 1µl do iniciador HSP70 for a 10 pmol e 1µl do iniciador HSP70 rev a 10 pmol (IDT, prodimol). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídeo. A visualização e a captura das imagens foram obtidas através do Transilluminador L Pix – Loccus Biotecnologia.

As amostras que apresentaram a banda específica de 1300 pb na PCR foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) (Garcia et al., 2004). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de *HaeIII* (New England) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.5.4 Pesquisa de Tripanossomatídeos

Alíquotas de DNA das amostras positivas na PCR-RFLP *hsp70*, dos isolados em cultura e do sangue de todos os morcegos coletados foram submetidas a reações de Nested-PCR direcionadas a região V7V8 do gene ribossômico 18S para a detecção de tripanossomatídeos. As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento para identificação das espécies da família Trypanosomatidae (NOYES et al. 1999, 2000).

4.5.4.1 Detecção de tripanossomatídeos por Nested-PCR

Para a realização da Nested-PCR utilizou-se os iniciadores TRY927F (5' GAAACAAGAAACACGGGAG 3') e TRY927R (5' CTA CTGGGCAGCTTGGGA 3'), gerando um fragmento de 900pb (NOYES et al. 1999, 2000). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 3µL do DNA, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 1,5 µl de DMSO 5,0% (Invitrogen),

0,25 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl (Invitrogen), 1µl do iniciador TRY92 for a 10 pmol e 1µl do iniciador TRY92 rev a 10 pmol. A amplificação do DNA foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e alternando 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e 30 seg, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 10 min.

Dos produtos da primeira PCR, 2µL de cada amostra foi usado para a segunda reação, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores SSU 561F (5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3') e SSU 561R (5' CTGAGACTGTAACCTCAAAGC 3') que amplifica 561pb (Noyes et al., 1999). O protocolo foi o mesmo descrito para a primeira reação, em volume final de 25 µL.

Os produtos amplificados na Nested-PCR foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo. A visualização e a captura das imagens foram obtidas através do Transluminador L Pix – Loccus Biotecnologia. As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento.

4.5.4.2 Identificação das espécies da família Trypanosomatidae

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a 30 ciclos: 15 s 96 °C; 15 s 50 °C; 4 min 60 °C, com um ciclo inicial de 1 min 96°C. Nas reações de sequenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos correspondentes ao gene amplificado.

Os cromatogramas das sequências foram analisados no programa Seqman do pacote de programas DNASTar (Nicholas et al., 1997). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas as sequencias depositadas no banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a fim de identificar os tripanossomatídeos.

4.6 Análise dos dados

Todos os espécimes de morcegos foram analisados de acordo com os índices de diversidade, para a curva do coletor foi utilizado o método Mau Tau e para a estimativa de riqueza entre as áreas foi utilizado o Jacknife de primeira ordem, com o auxílio do programa estatístico Estimetes (Colwell, 2013).

A estimativa de riqueza é um método de avaliar a riqueza total da área amostrada, com base em uma única amostra (Heltsh; Forrester, 1983). A curva de acumulação de espécies consiste na relação do número de espécies capturadas com o esforço amostral e tende a se estabilizar conforme o aumento deste esforço, quanto maior a estabilidade da curva, mais próximo da riqueza total do local (Gotelli; Golwell, 2001).

Para calcular a diversidade foi utilizado o índice proposto por Shannon-Winer. O índice da diversidade de Shannon (H') provém da teoria da informação (Ludwig; Reynolds, 1988) e fornece a ideia do grau de incerteza em prever, qual seria a espécie pertencente a um indivíduo da população, se retirado aleatoriamente (Lamprecht, 1990).

O Teste de Independência foi utilizado para verificar se a taxa de infecção é dependente das áreas estudadas. E o teste de correlação entre as variáveis foi utilizado para verificar a associação entre o número de animais coletados com a temperatura e umidade de cada área estudada.

5. Resultados

5.1 Fauna de morcegos

5.1.1 Morcegos capturados

Foram realizadas 52 capturas com cinco pontos amostrados por noite, somando 260 capturas com esforço amostral total de 1.300 horas/redes. Nos bairros e nos parques estudados foram capturados 1100 espécimes, dos quais foram identificados 29 espécies pertencentes às famílias Emballonuridae (3,5%), Molossidae (10,3%), Phyllostomidae (75,9%), Vespertilionidae, (10,3%) (Tabela 3). As espécies *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus* e *Carollia* sp. foram as mais abundantes no estudo.

De acordo com o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Winer (H') a comunidade de morcegos das áreas mais urbanizadas apresentaram a diversidade $H' = 1,15$ (VL) e $1,68$ (NSG), e as áreas mais preservadas $H' = 1,65$ (PMS) e $2,11$ (PELG). O município apresentou diversidade $H' = 1,94$, e a curva de acumulação de espécies do mesmo não atingiu a assíntota, foram capturadas 29 espécies (Figura 09).

As áreas consideradas preservadas, PMS e PELG, apresentaram maior abundância de quirópteros, 289 e 286 espécimes, e riqueza de espécies 16 e 18, respectivamente, em relação as áreas mais urbanizadas, Vila Luiza (273 e 7) e Nossa Senhora das Graças (252 e 13). O local considerado mais preservado (PELG) apresentou a maior riqueza de espécies, e o local mais urbanizado (VL) a menor riqueza (Figura 10).

Dentre as espécies capturadas 7% possuíam hábito alimentar hematófago, 21% nectarívoro, 28% frugívoro, 3% carnívoro, 3% onívoro e 38% insetívoro. Ao considerar o total de indivíduos capturados 2,3% possuíam hábito alimentar hematófago, 10,3% nectarívoro, 81,4% frugívoro, 0,1% carnívoro, 0,2% onívoro e 5,7% insetívoro (Figura 11).

Através do teste de correlação linear, apenas o bairro Vila Luiza obteve relação entre o número de indivíduos capturados e os índices de umidade ($P = 0,000$). O mês de dezembro apresentou um evento atípico de captura no VL, e nos meses abril e maio no PMS (Figura 12).

Tabela 3: Lista das espécies de morcegos capturados nas quatro áreas de estudo do município de Montes Claros, no período de abril 2014 a abril de 2015.

| Família | Subfamília | Dieta | VL | NSG | PMS | PELG | Total |
|-----------------------------------|-------------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
| Família Emballonuridae | | | | | | | |
| Família Emballonuridae | | I | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Família Phyllostomidae | | | | | | | |
| Subfamília Desmodontinae | | | | | | | |
| <i>Desmodus rotundus</i> | | H | 0 | 0 | 8 | 17 | 25 |
| <i>Diphylla eucaudata</i> | | H | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Subfamília Glossophaginae | | | | | | | |
| <i>Anoura caudifer</i> | | N | 0 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| <i>Anoura geoffroyi</i> | | N | 0 | 1 | 1 | 20 | 22 |
| <i>Glossophaga soricina</i> | | N | 6 | 46 | 11 | 20 | 83 |
| <i>Glossophaga sp</i> | | N | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| <i>Lionycteris spurrelli</i> | | N | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Lonchophylla sp.</i> | | N | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Subfamília Phyllostominae | | | | | | | |
| <i>Chrotopterus auritus</i> | | C | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Glyphonycteris behnii</i> | | I | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Lonchorhina aurita</i> | | I | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Micronycteris megalotis</i> | | I | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| <i>Mimon bennetti</i> | | I | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Phyllostomus hastatus</i> | | O | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| Subfamília Carollinae | | | | | | | |
| <i>Carollia sp.</i> | | F | 0 | 7 | 35 | 77 | 120 |
| Subfamília Stenodermatinae | | | | | | | |
| <i>Artibeus lituratus</i> | | F | 129 | 58 | 49 | 9 | 245 |
| <i>Artibeus planirostris</i> | | F | 99 | 59 | 140 | 64 | 362 |
| <i>Artibeus sp</i> | | F | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| <i>Chiroderma villosum</i> | | F | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 |
| <i>Dermanura cinerea</i> | | F | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Platyrrhinus lineatus</i> | | F | 34 | 70 | 28 | 22 | 154 |
| <i>Sturnira lilium</i> | | F | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 |
| Família Molossidae | | | | | | | |
| <i>Molossops neglectus</i> | | I | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Molossops temnickii</i> | | I | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Molossus molossus</i> | | I | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| Família Vespertilionidae | | | | | | | |
| <i>Epitesicus furinalis</i> | | I | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Lasiurus blossevilli</i> | | I | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Myotis nigricans</i> | | I | 1 | 1 | 7 | 37 | 46 |
| Total | | - | 273 | 252 | 289 | 286 | 1100 |

Legenda: C – Carnívoro, F - Frugívoro, H – Hematófago, I – Insetívoro, N – Nectarívoro, O – Onívoro. VL - Vila Luiza, NSG - Nossa Senhora das Graças, PMS - Parque Municipal da Sapucaia, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande.

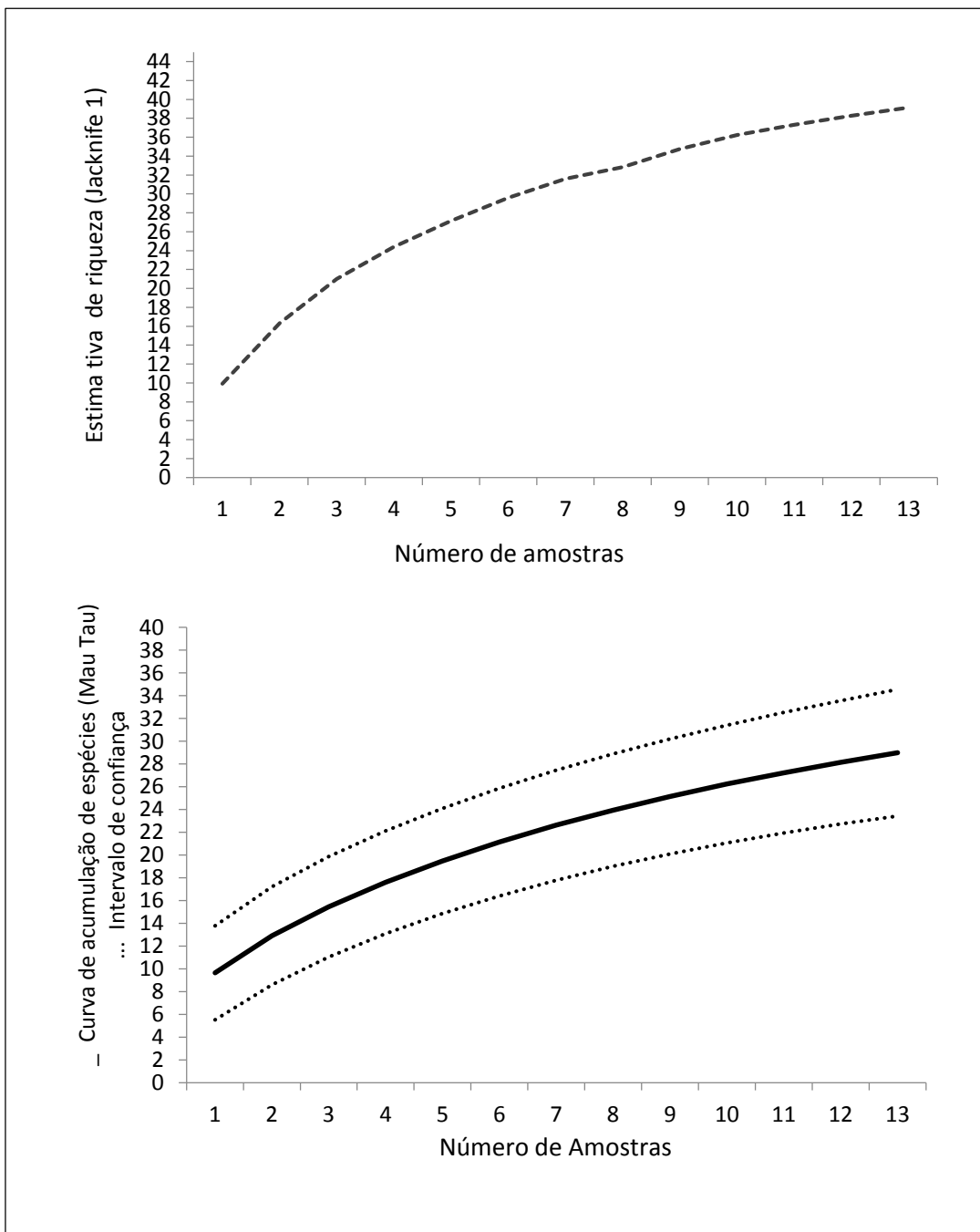


Figura 09: Estimativa de riqueza e curva de acumulação de espécies dos morcegos capturados entre abril de 2014 a abril de 2015 no município de Montes Claros, MG.

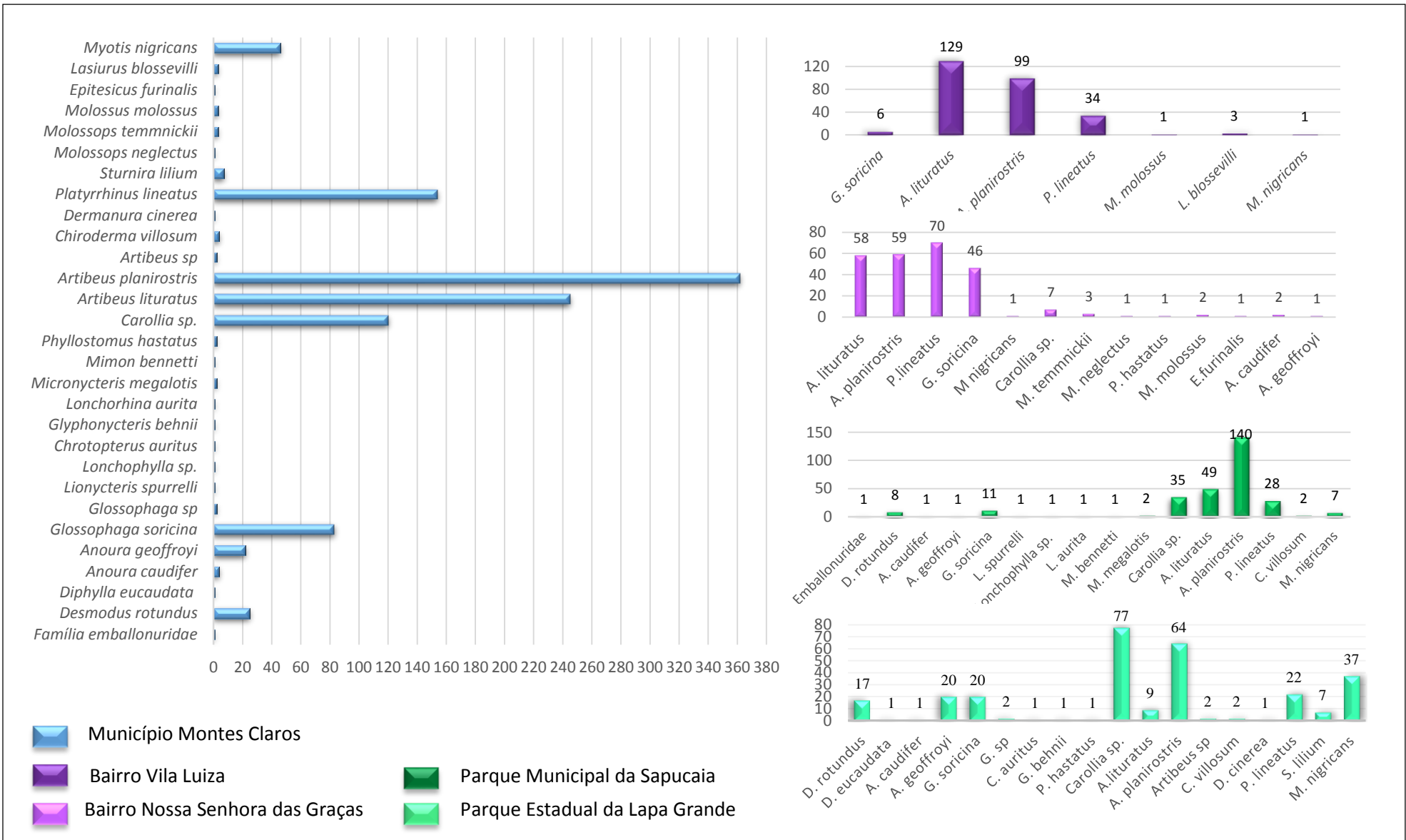


Figura 10: Morcegos capturados segundo a abundância e riqueza e de espécies por área de estudo.

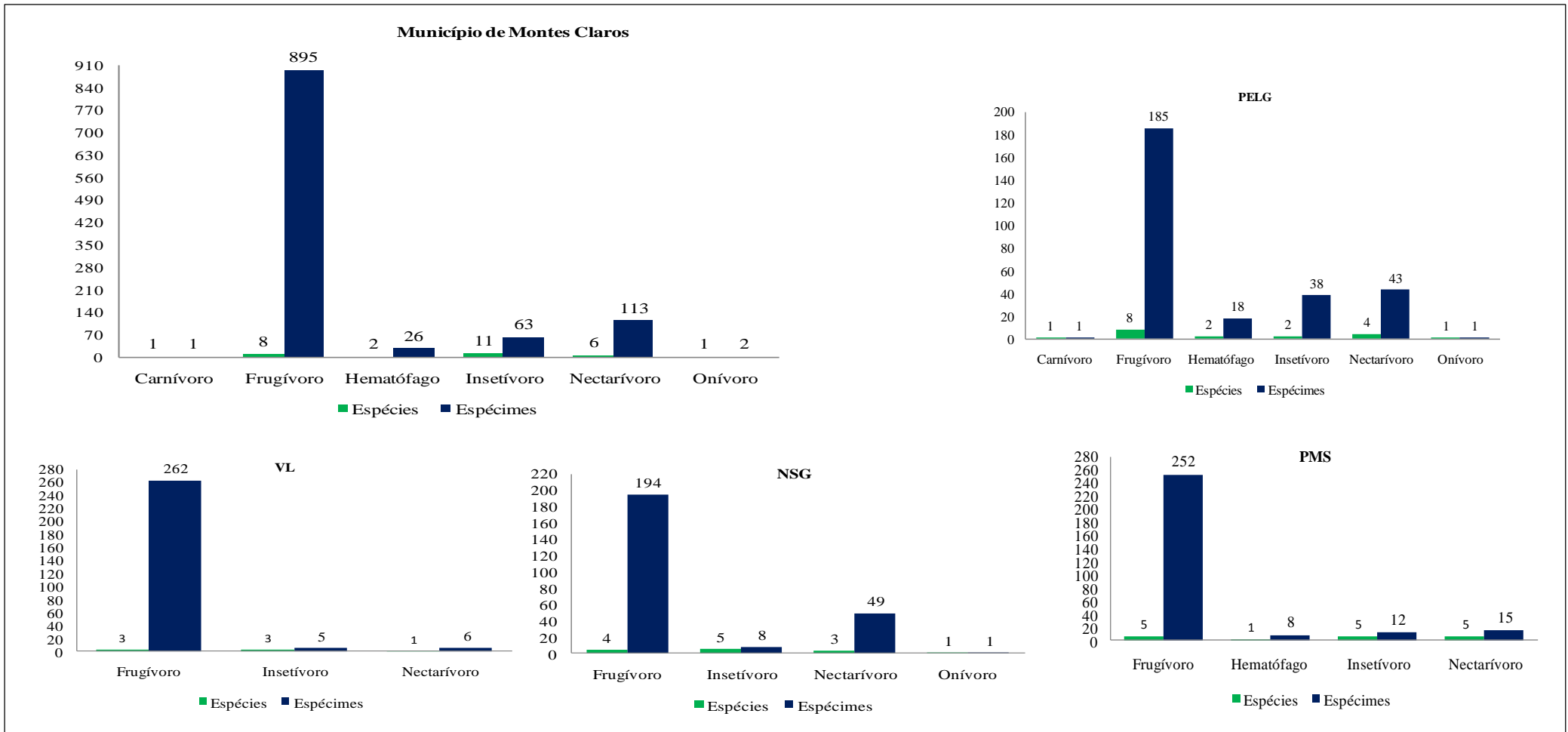


Figura 11: Morcegos capturados segundo o hábito alimentar por área de estudo.

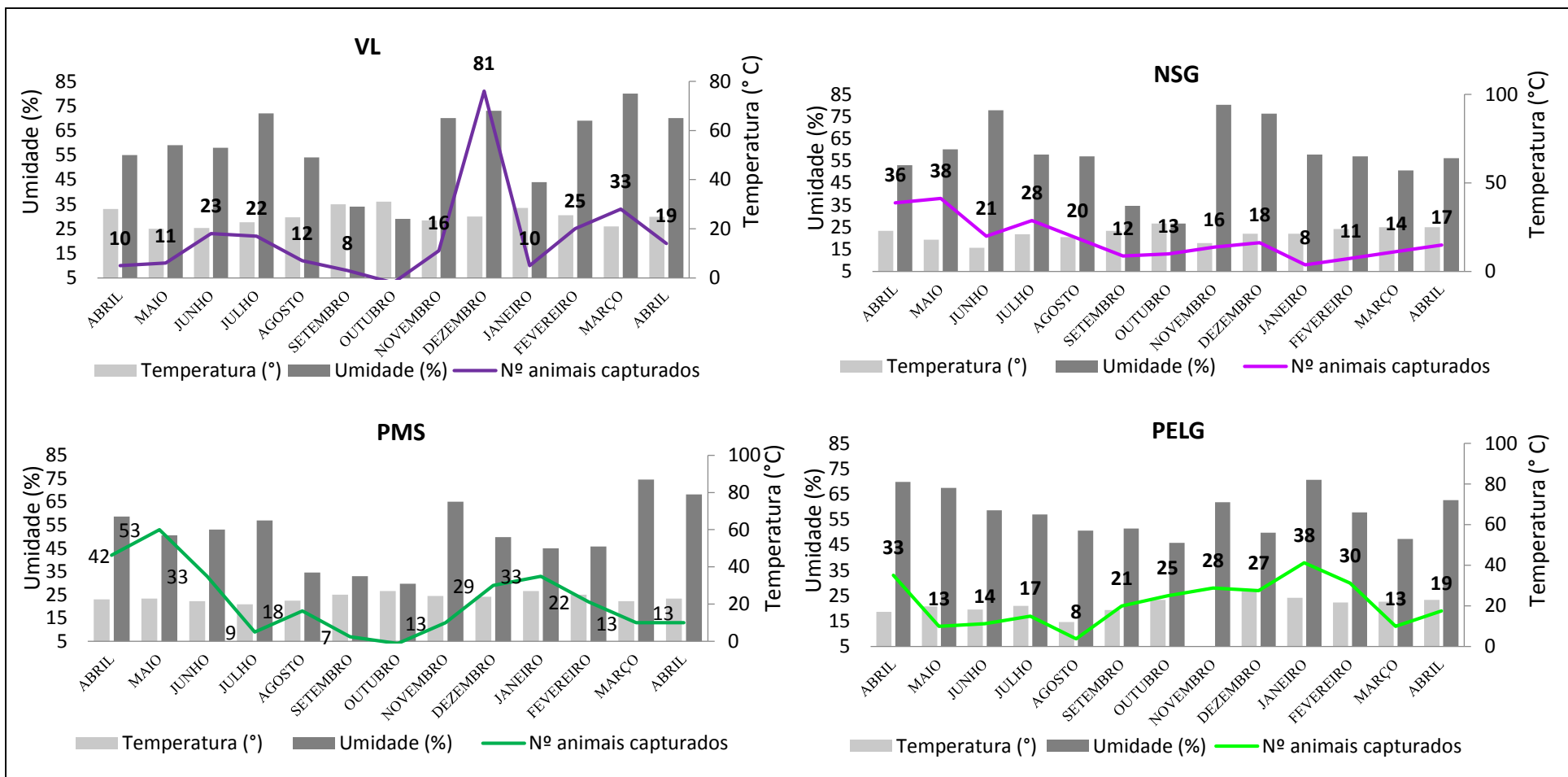


Figura 12: Correlação do número de morcegos capturados com a médias mensais de temperatura e umidade nos quatro locais de captura do município de Montes Claros, entre o período de abril de 2014 a abril de 2015.

5.1.2. Morcegos coletados e utilizados para a pesquisa de tripanossomatídeos

Para a investigação da ocorrência de protozoários, dentre os 1100 morcegos capturados foram coletados 122 espécimes nos bairros e 125 espécimes nos parques, totalizando 247 espécimes de 19 espécies pertencentes às famílias Phyllostomidae (79,0%), Molossidae (10,5%) e Vespertilionidae (10,5%) (Tabela 4).

Coletou-se 60 espécimes de sete espécies no VL, 62 espécimes de 8 espécies no NSG, 61 espécimes de 10 espécies no PMS e 64 espécimes de 14 espécies no PELG (Figura 13).

Acompanhando a tendência dos morcegos capturados, 37% das espécies coletadas no município possuíam hábito alimentar frugívoro, 32% hábito insetívoro, 21% nectarívoro, 5% hematófago e 5% carnívoro (Figura 14). Nas quatro áreas amostradas coletou-se mais morcegos de hábito frugívoro.

Tabela 4: Lista das espécies de morcegos coletadas nas quatro áreas de estudo do município de Montes Claros, no período de abril 2014 a abril de 2015.

| Família | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|-----------|------------|------------|-------------|--------------|
| Subfamília | Dieta | VL | NSG | PMS | PELG | Total |
| Espécie | | | | | | |
| Família Phyllostomidae | | | | | | |
| Subfamília Desmodontinae | | | | | | |
| <i>Desmodus rotundus</i> | H | 0 | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Subfamília Glossophaginae | | | | | | |
| <i>Anoura caudifer</i> | N | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Anoura geoffroyi</i> | N | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 |
| <i>Glossophaga soricina</i> | N | 1 | 13 | 5 | 4 | 23 |
| <i>Lionycteris spurrelli</i> | N | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Subfamília Phyllostominae | | | | | | |
| <i>Chrotopterus auritus</i> | C | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Glyphonycteris behnii</i> | I | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Micronycteris megalotis</i> | I | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Subfamília Carollinae | | | | | | |
| <i>Carollia</i> sp. | F | 0 | 1 | 12 | 13 | 26 |
| Subfamília Stenodermatinae | | | | | | |
| <i>Artibeus lituratus</i> | F | 30 | 13 | 14 | 2 | 59 |
| <i>Artibeus planirostris</i> | F | 17 | 13 | 13 | 6 | 49 |
| <i>Chiroderma villosum</i> | F | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Dermanura cinerea</i> | F | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Platyrrhinus lineatus</i> | F | 7 | 19 | 6 | 6 | 38 |
| <i>Sturnira lilium</i> | F | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| Família Molossidae | | | | | | |
| <i>Molossops temmnickii</i> | I | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Molossus molossus</i> | I | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Família Vespertilionidae | | | | | | |
| <i>Lasiurus blossevilli</i> | I | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Myotis nigricans</i> | I | 1 | 1 | 3 | 13 | 18 |
| Total | - | 60 | 62 | 61 | 64 | 247 |

Legenda: C – Carnívoro, F - Frugívoro, H – Hematófago, I – Insetívoro, N – Nectarívoro, O – Onívoro. VL - Vila Luiza, NSG - Nossa Senhora das Graças, PMS - Parque Municipal da Sapucaia, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande.

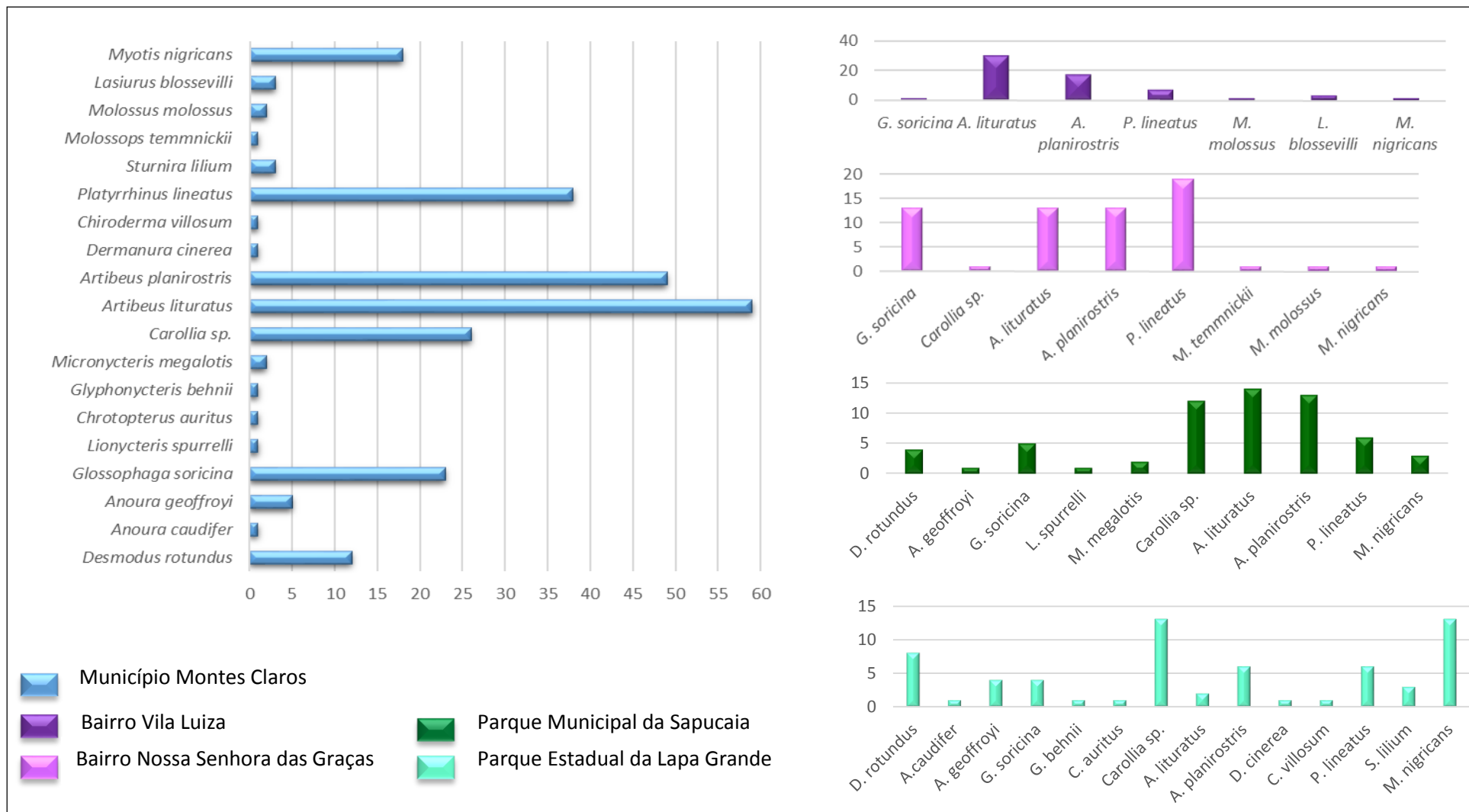


Figura 13: Morcegos coletados segundo a abundância e riqueza de espécies por área de estudo.

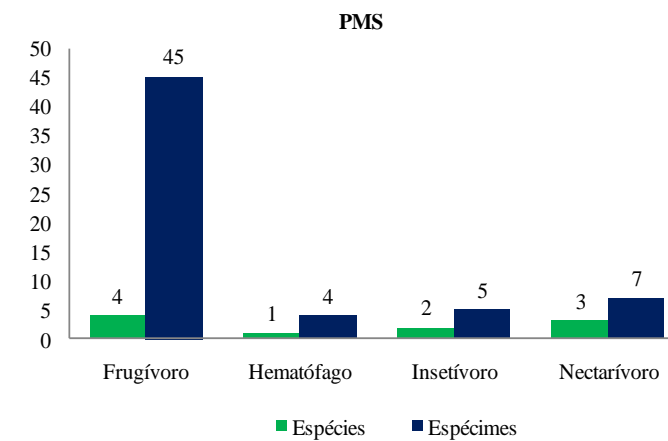
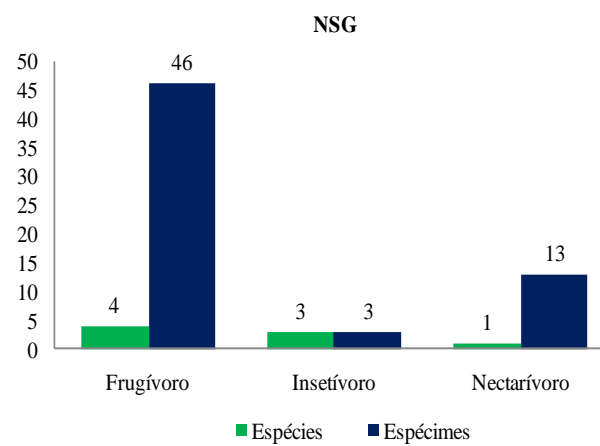
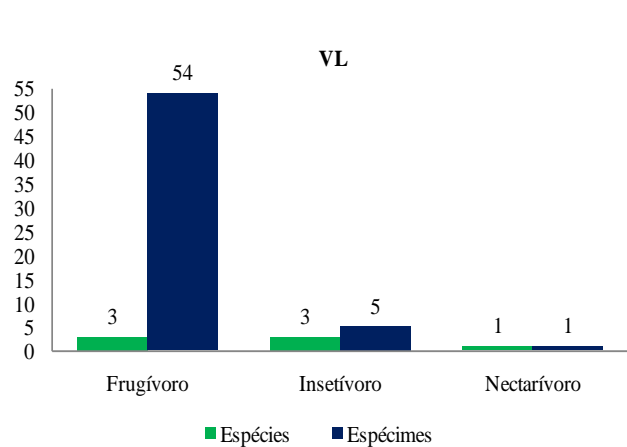
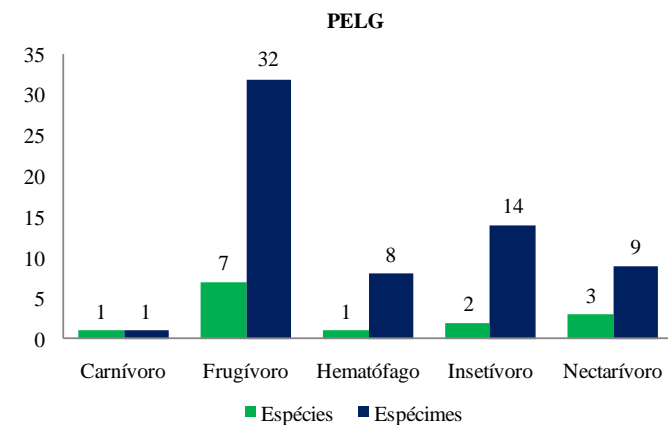
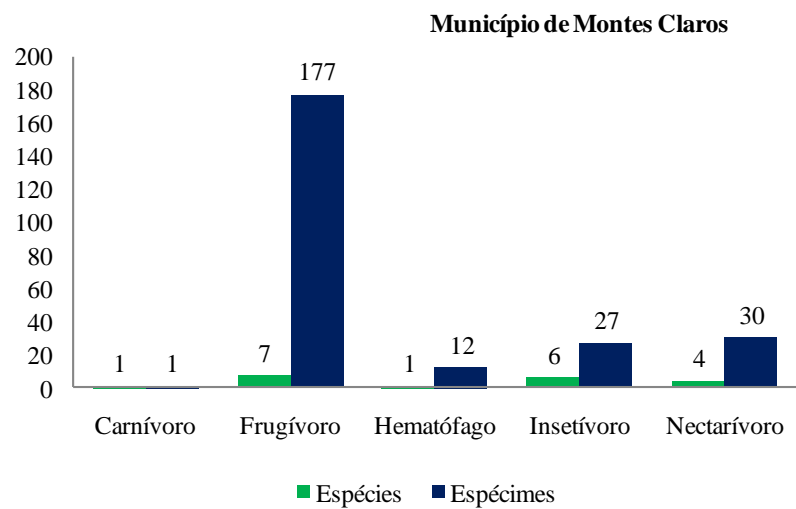


Figura 14: Morcegos coletados segundo hábito alimentar por área de estudo.

5.2. Infecção por tripanossomatídeos

5.2.1 Infecção dos morcegos por *Leishmania*

Serão apresentados os resultados da detecção de *Leishmania* utilizando a PCR direcionada ao alvo SSU- rRNA, seguidos dos resultados da identificação das espécies de *Leishmania* realizada com a metodologia da PCR-RFLP direcionada ao alvo *hsp70* das amostras selecionadas pela triagem com o alvo SSU rRNA. Posteriormente, os resultados do sequenciamento da região V7V8 do gene SSU- rRNA 18S, voltados para o gênero *Leishmania*, realizado a partir do DNA extraído das amostras de sangue e das amostras de tecido positivas pelo *hsp70*.

5.2.2 Detecção de *Leishmania* pelo alvo SSU rRNA e identificação das espécies pela PCR RFLP *hsp70*

Para uma triagem inicial da infecção por *Leishmania*, dos 247 indivíduos coletados, alíquotas de DNA de 1.235 amostras provenientes de diferentes tecidos (pele, sangue, baço, fígado, medula) foram submetidas à PCR dirigida ao alvo SSU-rRNA. Destas, 14,7% (181/1235) foram positivas, sendo duas amostras de sangue, 33 de baço, 130 de fígado e 16 de pele correspondentes a 144 (58,3%) indivíduos positivos, dos quais 2,1% apresentavam positividade em mais de um tecido (Figura 15).

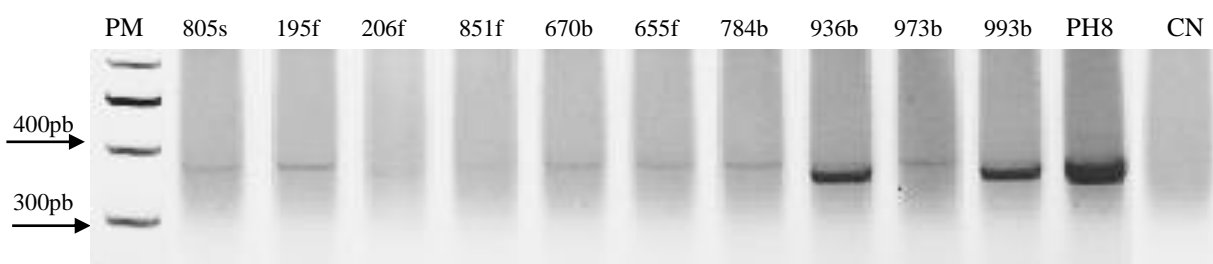


Figura 15: Resultado representativo da triagem realizada através da PCR SSU-rRNA em amostras de DNA extraído dos morcegos coletados em Montes Claros. PM – 100pb, PH8 – cepa referência de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e CN – controle negativo.

Todas as amostras que apresentaram banda no intervalo correspondente a 300-400pb na PCR SSU rRNA, foram selecionadas e submetidas à PCR dirigida ao alvo *hsp70* para identificação das espécies. A positividade nas amostras foi de 3,9% (7/181) e nos indivíduos de 4,9% (7/144). Para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição e identificação das espécies de *Leishmania*, as amostras positivas no *hsp70* foram submetidas à digestão utilizando a enzima de restrição *Hae* III. Dentre estas, quatro apresentaram perfis condizentes com a cepa de referência de *Leishmania braziliensis*, e três não tiveram as espécies identificadas (Figuras 16 e 17, Tabela 5).

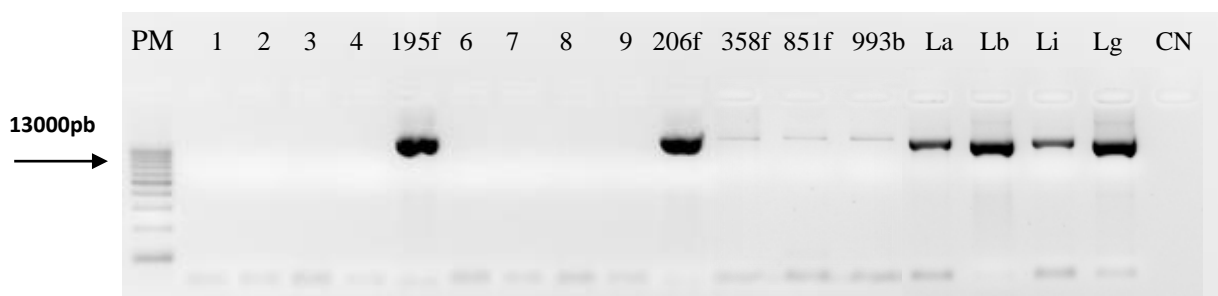


Figura 16: Perfil representativo da PCR *hsp70* de amostras de DNA extraído dos morcegos. PM – 100pb. 1 a 993 b – amostras de DNA provenientes de tecidos dos morcegos coletados em Montes Claros. La – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Lg – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e CN – controle negativo.

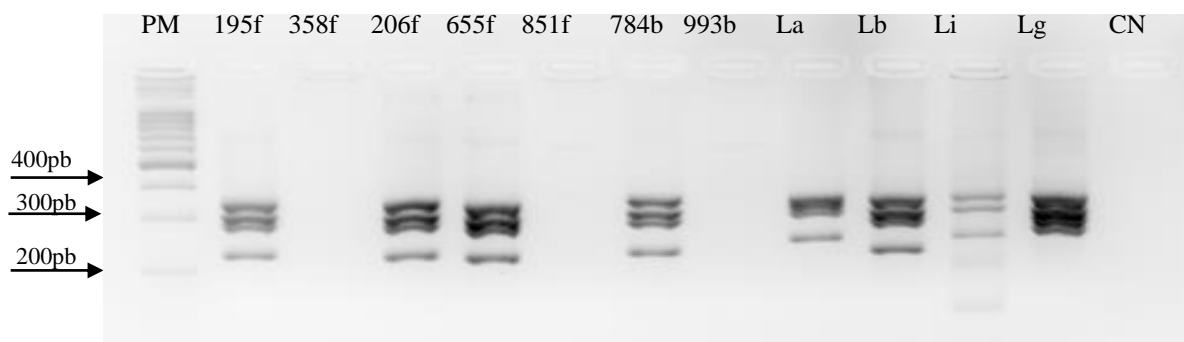


Figura 17: Perfil representativo da digestão com *Hae*III de amostras positivas na PCR *hsp70* de DNA extraído dos morcegos. PM – 100pb. 195f a 993b – amostras de DNA provenientes de tecidos dos morcegos. La – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Lg – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e CN – controle negativo.

Tabela 5: Espécie de *Leishmania*, identificada através da RFLP-*hsp70*, por espécie de morcego, local de coleta, dieta, sexo, idade e tecido infectado.

| Identificação | Espécie de morcego | Local de coleta | Dieta | Sexo | Idade | Tecido | RFLP – <i>hsp70</i> |
|---------------|------------------------------|-----------------|-------|------|-------|--------|------------------------|
| 195 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | F | F | A | Fígado | <i>L. braziliensis</i> |
| 993 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | F | M | J | Baço | NI |
| 206 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | F | M | A | Fígado | <i>L. braziliensis</i> |
| 358 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | F | M | A | Fígado | NI |
| 784 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | F | F | SA | Baço | <i>L. braziliensis</i> |
| 655 | <i>Chiroderma villosum</i> | PELG | F | M | SA | Fígado | <i>L. braziliensis</i> |
| 851 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | NSG | F | M | SA | Fígado | NI |

Legenda: VL - Vila Luiza, NSG - Nossa Senhora das Graças, PMS - Parque Municipal da Sapucaia, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande. F - Frugívoro. A – Adulto, SA – Subadulto, J – Jovem. NI – Não identificado.

5.2.3 Detecção de *Leishmania* pelo alvo SSU rRNA 18 S e identificação das espécies pela sequenciamento

Para a pesquisa da detecção de tripanossomatídeos através do alvo SSU-rRNA, amostras de DNA de 247 amostras de DNA de sangue, 7 amostras de tecido positivas pelo alvo hsp70 e 12 amostras de tripanossomatídeos isolados em cultivo (descrito no tópico 5.3.1) foram analisados. Dentre as 266 amostras, 30% (80/266) apresentaram algum perfil de banda correspondente a 561pb e foram submetidas ao sequenciamento.

Foram identificados 14 indivíduos infectados por *Leishmania* sp. e 50 por *Trypanosoma* sp., aquelas amostras que não obtiveram sequencias de qualidade foram identificadas a nível de gênero. As identificações referentes a *Leishmania* serão abordadas abaixo (Figura 18), as demais serão abordadas no tópico sobre *Trypanosoma* sp. (6.4).

Das 12 amostras de sangue positivas (5%), 50% correspondeu a espécie *L. amazonensi*, 8% a *L. braziliensis*, 25% a *L. infantum* e 16% a *Leishmania* sp. Analisando as sequencias das amostras de tecidos positivas pelo hsp70, apenas cinco (71%) apresentaram resultados. Duas amostras (993 B e 655 B) não geraram sequências de qualidade para análise, portanto não foram identificadas.

Dentre as amostras de tecido positivas, 40% correspondeu a *L. braziliensis*, 40% a *T. dionisii* e 20% a *Leishmania* sp. Observou-se coinfeção em dois indivíduos (195, 206) (Tabela 06).

Observando as características da positividade dos morcegos infectados por *Leishmania* sp. em relação aos morcegos capturados, podemos observar que houve maior positividade entre os morcegos frugívoros, fêmeas e jovens, coletados no PELG e NSG. Destacam-se as espécies *Dermanura cinerea* (100% - 1/1) e *Chiroderma villosum* (100% - 1/1). Analisando apenas as espécies de morcegos infectadas, nota-se maior infecção entre os machos, adultos de hábito frugívoro. Sendo a espécie *Artibeus lituratus* a mais infectada.

Tabela 06: Resultados do sequenciamento da região V7V8 do gene SSU- rRNA, realizado a partir das amostras de sangue e das amostras positivas pelo *hsp70*.

| | Identificação | Espécie | Local | Sexo | Idade | Sequenciamento | |
|----|----------------------|------------------------------|--------------|-------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 861 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | F | J | <i>Leishmania</i> sp.(S) | |
| 2 | 195, 195F | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | F | A | <i>Trypanosoma</i> sp. (S) | <i>L. braziliensis</i> (F) |
| 3 | 1109 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | SA | <i>L. amazonensis</i> (S) | |
| 4 | 993B | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | J | NI (S) | NI (F) |
| 5 | 206, 206 F | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | M | A | <i>L. amazonensis</i> (S) | <i>L. braziliensis</i> (F) |
| 6 | 553 | <i>Artibeus planirostris</i> | NSG | M | A | <i>L. infantum</i> (S) | |
| 7 | 700 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | F | SA | <i>L. infantum</i> (S) | |
| 8 | 848 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | F | A | <i>L. braziliensis</i> (S) | |
| 9 | 888 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | F | A | <i>L. amazonensis</i> (S) | |
| 10 | 969 | <i>Artibeus planirostris</i> | VL | M | A | <i>L. amazonensis</i> (S) | |
| 11 | 981 | <i>Artibeus planirostris</i> | VL | M | SA | <i>L. amazonensis</i> (S) | |
| 12 | 358, 358 F | <i>Carollia</i> sp. | PMS | M | A | <i>T. dionisii</i> (S) | <i>T. dionisii</i> (F) |
| 13 | 851, 851 F | <i>Carollia</i> sp. | PELG | M | SA | <i>T. dionisii</i> (S) | <i>T. dionisii</i> (F) |
| 14 | 655 F | <i>Chiroderma villosum</i> | PELG | M | A | <i>L. infantum</i> (S) | NI (F) |
| 15 | 942 | <i>Dermanura cinerea</i> | PELG | F | A | <i>L. amazonensis</i> (S) | |
| 16 | 277 | <i>Glossophaga soricina</i> | NSG | M | A | <i>Leishmania</i> sp. (S) | |
| 17 | 784 B | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | NSG | F | SA | NI (S) | <i>Leishmania</i> sp.(B) |

Legenda: VL - Vila Luiza, NSG - Nossa Senhora das Graças, PMS - Parque Municipal da Sapucaia, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande. F - Frugívoro. A – Adulto, SA – Subadulto, J – Jovem. NI – Amostra não identificada. (S) – Amostra de sangue, (B) – Amostra de baço, (F) – Amostra de fígado.

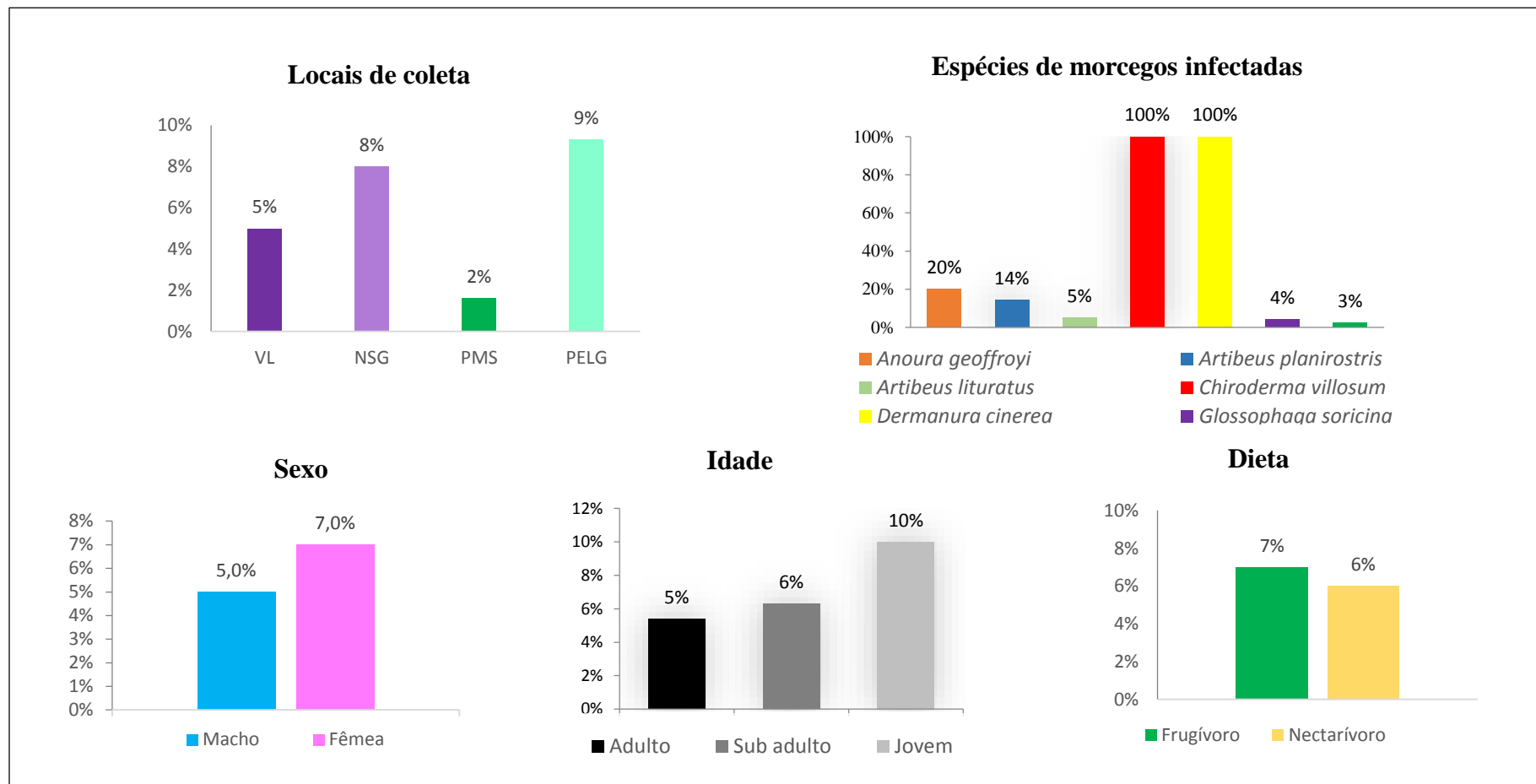


Figura 18: Característica da positividade dos morcegos infectados por *Leishmania*, por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar, em relação aos morcegos coletados.

5.3 Infecção dos morcegos por *Trypanosoma*

Serão apresentados os resultados da detecção do DNA extraído dos isolados de tripanossomatídeos em cultura pela PCR-RFLP direcionada ao alvo *hsp70* e pela PCR direcionada ao alvo SSU- rRNA, seguido da identificação das espécies de *Trypanosoma* pelo sequenciamento. Posteriormente serão expostos os resultados do sequenciamento da região V7V8 do gene SSU- rRNA 18S, realizado do DNA das amostras de sangue e das amostras de tecido positivas pelo *hsp70*.

5.3.1 Isolamento de tripanossomatídeos em cultura

Avaliou-se a ocorrência de tripanossomatídeos por tentativa de isolamento em meio de cultura em um total de 741 amostras de sangue, baço e fígado, correspondentes a 247 espécimes coletados no município de Montes Claros. Obteve-se 197 culturas perdidas por contaminantes, 528 negativas e 16 positivas para a família Trypanosomatidae (Figura 19).

De acordo com o teste de independência, há evidências para se afirmar que existe diferença entre parques e bairros no que se refere a taxa de infecção por *Trypanosoma* sp. e Tripanossomatídeos.

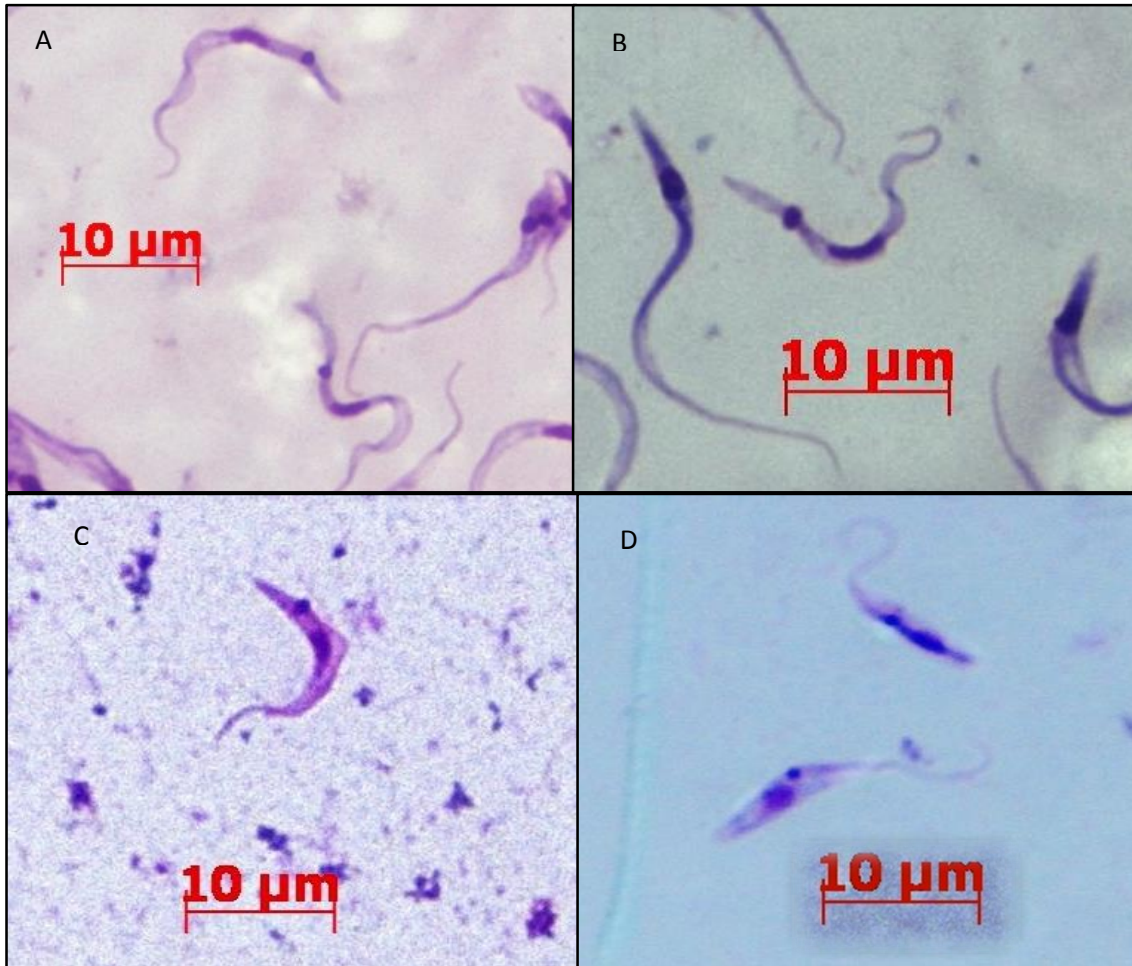


Figura 19: Fotomicrografia de flagelados tripanossomatídeos isolados em cultivo, corados pelo Giemsa, isolados de morcegos capturados no município de Montes Claros (1000x). A e B: Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, C: Forma tripomastigota de *Trypanosoma dionisii*, D: Forma epimastigota de *Trypanosoma dionisii*.

Das amostras isoladas em meio de cultura, 14 foram provenientes do sangue e duas do baço, referentes a 12 espécimes de morcegos. Os morcegos infectados foram coletados no PELG (8%), no PMS e no bairro NSG (7% cada) e no bairro VL (2%) (Tabela 7, Figura 20).

Tripanossomatídeos foram isolados de amostras provenientes do sangue dos morcegos *A. lituratus* (1,6% - 1/59), *A. planirostris* (6% - 3/49), *Carollia* sp (15% - 4/26), *Platyrrhinus lineatus* (5,2% - 2/380), *C. auritus* (100% - 1/1) e *Anoura geofroyi* (20% - 1/5). Em dois espécimes insetívoros fêmeas, adultas, da espécie *Myotis nigricans* (840 e 1022), uma coletada no bairro Nossa Senhora das Graças e outra coletada no Parque Estadual da Lapa Grande, obtivemos parasitos isolados de amostras do sangue e do baço.

Ao relacionar a positividade dos morcegos infectados pelos tripanossomatídeos isolados dos cultivos, pelo número de animais coletados, observa-se que a espécie carnívora *Chrotopterus auritus* foi a mais prevalente, seguida da nectarívora *Anoura geoffroyi* e do insetívoro *Myotis nigricans*. O PELG e o VL apresentaram maior e menor positividade, respectivamente. Verificou-se mais indivíduos insetívoros, fêmeas, adultos e jovens (Figura 20). Ao analisar apenas os morcegos infectados, verifica-se maior infecção entre os morcegos frugívoros, adultos e subadultos. Não houve relação entre os sexos, e o gênero *Carollia* sp. foi a que apresentou maior infecção.

No item 5.3.2 há a descrição da identificação molecular dos isolados de tripanossomatídeos em cultura.

Tabela 7: Características dos morcegos dos quais foram isolados espécies de tripanossomatídeos.

| | Identificação | Espécie de morcego | Local de captura | Dieta | Sexo | Idade | Parasito isolado |
|----|----------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|
| 1 | 567 | <i>Anoura geoffroyi</i> * | PELG | N | M | A | <i>T. cruzi</i> |
| 2 | 537 | <i>Artibeus lituratus</i> * | PMS | F | M | A | <i>T. dionisii</i> |
| 3 | 731 | <i>Artibeus planirostris</i> * | VL | F | M | J | P |
| 4 | 892 | <i>Artibeus planirostris</i> * | PMS | F | F | A | <i>T. dionisii</i> |
| 5 | 731 | <i>Artibeus planisrostris</i> * | NSG | F | F | A | P |
| 6 | 540 | <i>Carollia</i> sp. * | PMS | F | M | A | <i>T. dionisii</i> |
| 7 | 910 | <i>Carollia</i> sp. * | PMS | F | F | A | <i>T. dionisii</i> |
| 8 | 569 | <i>Carollia</i> sp. * | PELG | F | M | SA | <i>T. dionisii</i> |
| 9 | 936 | <i>Carollia</i> sp. * | PELG | F | M | A | <i>T. dionisii</i> |
| 10 | 557 | <i>Chrotopterus auritus</i> * | PELG | C | M | A | <i>T. cruzi</i> |
| 11 | 784 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> * | NSG | F | F | SA | P |
| 12 | 785 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> * | NSG | F | F | A | P |
| 13 | 840 | <i>Myotis nigricans</i> */** | NSG | I | F | A | <i>T. dionisii</i> |
| 14 | 1022 | <i>Myotis nigricans</i> */** | PELG | I | F | A | <i>T. dionisii</i> |

* Parasitos isolados do sangue. ** Parasitos isolados do baço.

Legenda: Sexo: M - Macho, F - Fêmea; Idade: A - Adulto, SA – Subadulto, J - Jovem; Local de captura: VL – Vila Luiza, NSG – Nossa Senhora das Graças, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande, PMS - Parque Municipal da Sapucaia; Dieta: F – Frugívoro, I – Insetívoro, C – Carnívoro. P – Cultura perdida.

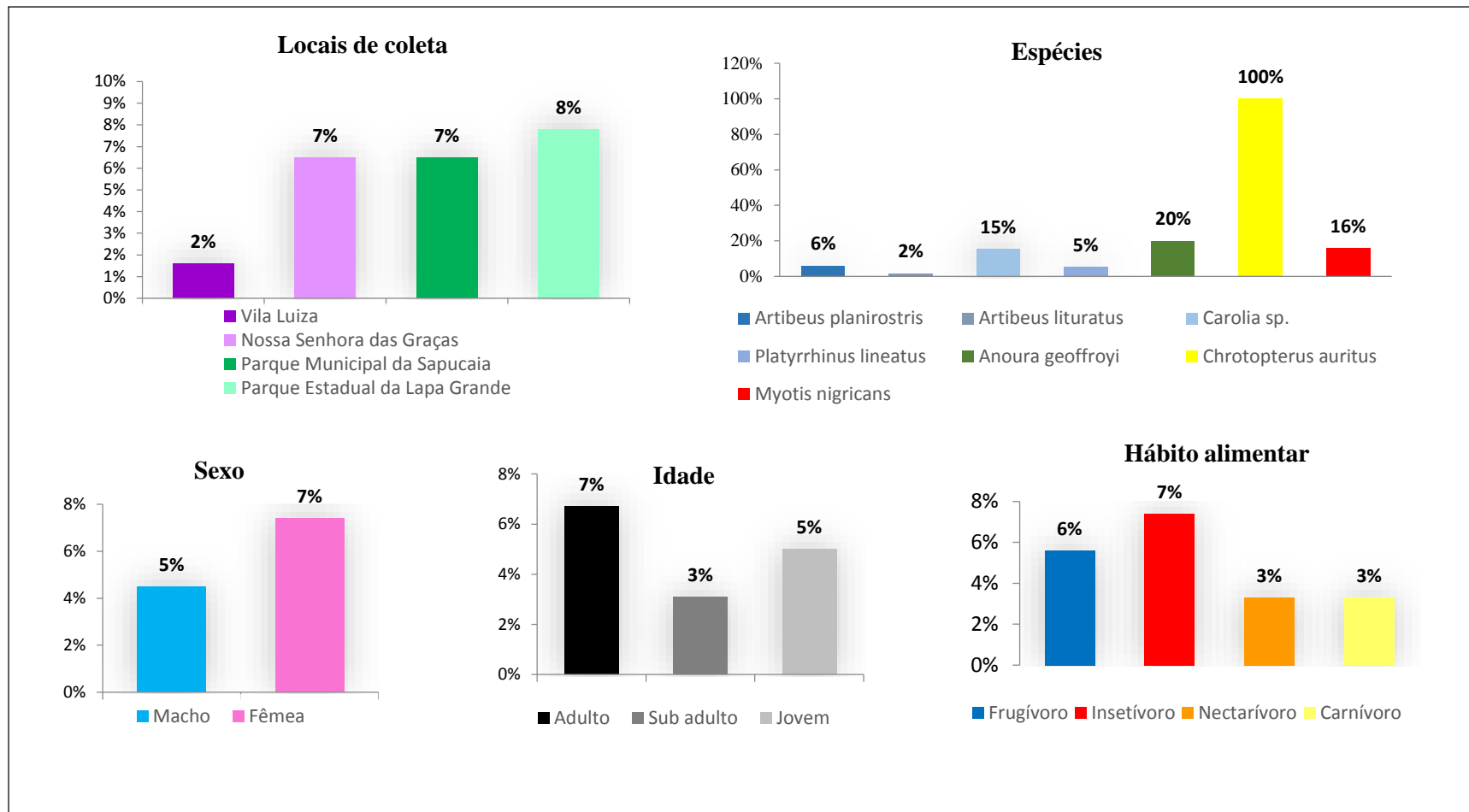


Figura 20: Características da positividade dos morcegos infectados por Tripanossomatídeos isolados em cultura, por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar, em relação aos morcegos coletados.

5.3.2 Identificação molecular dos isolados de tripanossomatídeos em cultura

Alíquotas de DNA de todos os isolados foram submetidas a PCR-RFLP direcionada ao alvo *hsp70* e a Nested-PCR V7V8 seguida de sequenciamento. Verificou-se que todos os isolados apresentaram perfil semelhante ao de *Trypanosoma cruzi* (Figuras 21 e 22). Das 12 amostras (10 de sangue e 2 de baço) submetidas ao sequenciamento, 10 (83,33%) foram identificadas como *Trypanosoma dionisii* e 2 (16,67%) como *T. cruzi* correspondentes a 10 indivíduos.



Figura 21: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados na PCR direcionada ao alvo *hsp70* das amostras de DNA extraídas dos isolados cultivados. PM – 100pb. 537 a 1022s – amostras de DNA provenientes dos isolados obtidos de tecidos dos morcegos coletados em Montes Claros. Tc – *Trypanosoma cruzi*, La – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Lg – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e CN – controle negativo. s – Isolado do sangue, b – Isolado do baço.

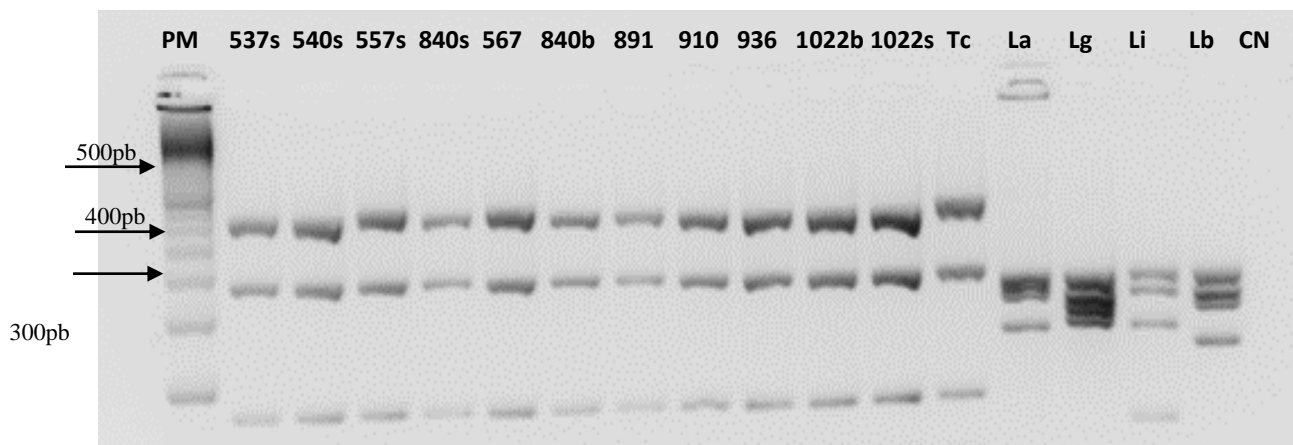


Figura 22: Perfis da digestão com *HaeIII* de fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos isolados cultivados. PM – 100pb. 537 a 1022s – amostras de DNA provenientes dos isolados obtidos de tecidos dos morcegos coletados em Montes Claros. Tc – *Trypanosoma cruzi*, La – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Lg – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e CN – controle negativo. s – Isolado do sangue, b – Isolado do baço.

5.3.3 Detecção de *Trypanosoma* pelo alvo SSU rRNA 18 S e identificação das espécies pela sequenciamento

DNA de 266 amostras, referentes ao sangue (247), aos isolados das culturas (12) e amostras de tecido positivas pelo alvo *hsp70* (7), foram analisados pela PCR SSU rRNA (V7V8) que detecta a família Trypanosomatidae (Figura 23).

Analisando a positividade de *Trypanosoma* sp., verifica-se 22,1% (59 - 266) entre as amostras de sangue analisadas, e 20,2 % (50/247) entre os indivíduos. A maioria dos tripanossomatídeos identificados pertenciam ao gênero *Trypanosoma* e foram identificados como *T. dionisi* (40,6%), como *T. cruzi* (4,6%) e como *Trypanosoma* sp. (32,8%). Com relação ao local de coleta, os parques foram as áreas onde se detectou o maior número de exemplares infectados (PMS 31,2% e PELG 32,7% e) e no bairro VL o menor (7%) (Tabela 8).

No PMS foi observado a ocorrência de morcegos infectados por *T. dionisii*, *T. cruzi* e *Trypanosoma* sp.. Os machos, adultos e subadultos foram os mais infectados. A espécie carnívora *C. auritus* foi a mais prevalente (100%), seguida do hematófago *Desmodus rotundus* (67%) e do insetívoro *Anoura geoffroyi* (Figura 24).

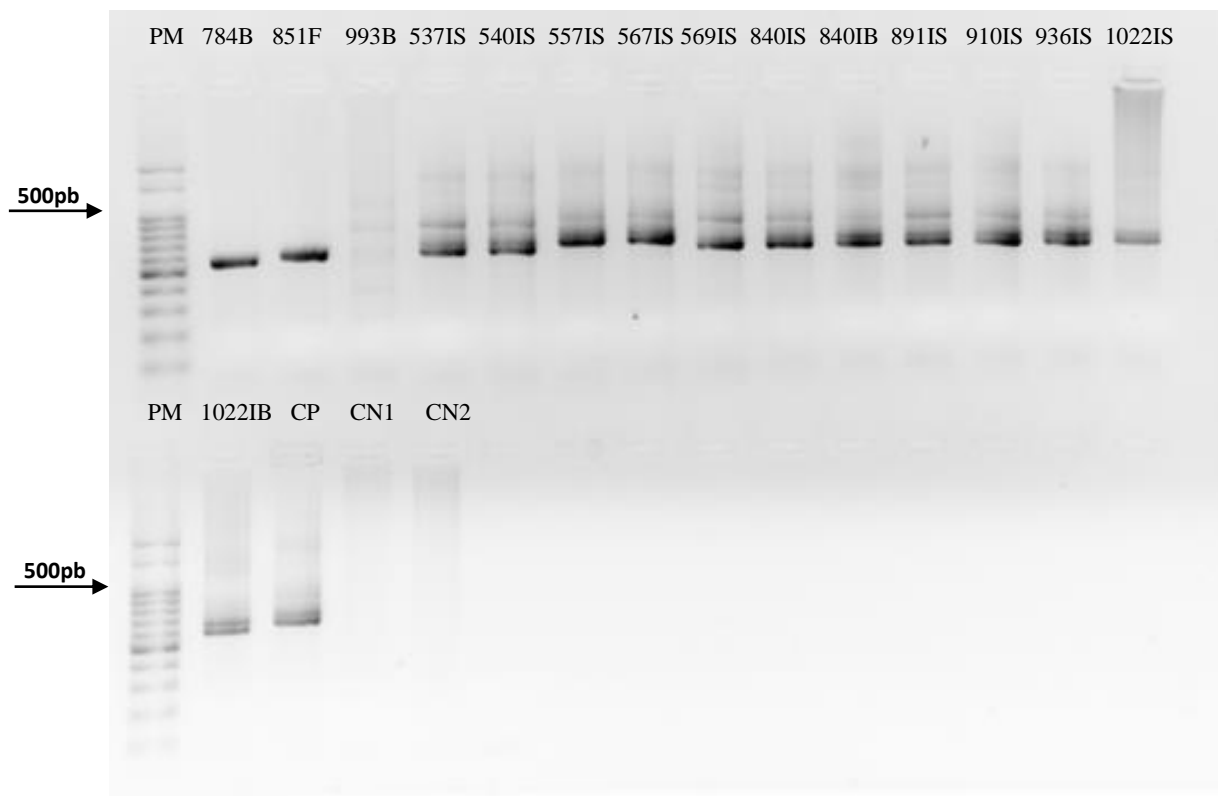


Figura 23: Resultado representativo dos produtos amplificados na PCR dirigida a região V7V8 do gene SSU rRNA de amostras de DNA extraídas dos morcegos. PM – 100pb. 784B a 1022IB – amostras de DNA provenientes de tecidos dos morcegos. CP - Controle positivo, DNA de *Trypanosoma cruzi*, e CN1 e CN2 - Controles negativos.

Tabela 8: Espécies de Trypanosoma identificadas através do sequenciamento, por morcego (espécie, sexo, idade), amostra sequenciadas (sangue, isolados cultivados, tecidos positivos no alvo *hsp70*), e por área de estudo.

| | Morcego | | | | | Sequenciamento | | | |
|----|---------------|-----------------------------|--------------|------|-------|----------------|-----------|-------------------|---------------------------------|
| | Identificação | Espécie | Local coleta | Sexo | Idade | Dieta | Sangue | Isolados | Tecido positivo no <i>hsp70</i> |
| 1 | 195 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | F | A | F | T | | |
| 2 | 310 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | M | A | F | Td | | |
| 3 | 531 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | M | A | F | T | | |
| 4 | 835 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | M | A | F | Td | | |
| 5 | 577 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | A | F | T | | |
| 6 | 629 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | A | F | T | | |
| 7 | 786 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | F | A | F | Td | | |
| 8 | 840 | <i>Myotis nigricans</i> | NSG | F | A | I | Td | Td (s) (b) | |
| 9 | 846 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | A | F | Td | | |
| 10 | 847 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | M | J | F | Td | | |
| 11 | 81 | <i>Carollia sp</i> | PMS | M | SA | F | T | | |
| 12 | 82 | <i>Carollia sp</i> | PMS | F | SA | F | T | | |
| 13 | 108 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | M | SA | H | T | | |
| 14 | 231 | <i>Glossophaga soricina</i> | PMS | F | SA | N | T | | |
| 15 | 353 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | M | A | H | T | | |
| 16 | 354 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | F | A | F | T | | |
| 17 | 356 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | M | A | F | Td | | |
| 18 | 358 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | M | A | F | Td | | Td (f) |

| | | | | | | | | |
|----|-----|------------------------------|------|---|----|---|-----------|---------------|
| 19 | 461 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | M | A | F | Tc | |
| 20 | 466 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | M | A | F | T | |
| 21 | 537 | <i>A.lituratus</i> | PMS | M | A | F | | Td (s) |
| 22 | 540 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | M | A | F | T | Td (s) |
| 23 | 672 | <i>Myotis nigricans</i> | PMS | M | A | I | Td | |
| 24 | 803 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | M | A | F | Td | |
| 25 | 805 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | M | A | H | T | |
| 26 | 807 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PMS | F | SA | N | T | |
| 27 | 812 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | M | SA | F | Td | |
| 28 | 892 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | M | A | F | | Td(s) |
| 29 | 910 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | F | A | F | Td | Td (s) |
| 30 | 916 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | M | A | F | T | |
| 31 | 185 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | M | SA | H | T | |
| 32 | 210 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | M | A | F | T | |
| 33 | 380 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | PELG | F | A | F | Td | |
| 34 | 386 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | F | SA | H | T | |
| 35 | 431 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | M | A | F | T | |
| 36 | 504 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | M | A | I | Td | |
| 37 | 506 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | M | A | H | Td | |
| 38 | 507 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | M | A | H | T | |
| 39 | 557 | <i>Chrotopterus auritus</i> | PELG | f | NL | C | Tc | Tc (s) |
| 40 | 567 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | M | A | N | T | Tc (s) |
| 41 | 569 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | m | SA | F | T | Td (s) |
| 42 | 618 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | F | A | H | T | |

| | | | | | | | | | | |
|----|-------|------------------------------|------|---|----|---|---------------|---------------------------------|-----------|----------|
| 43 | 646 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | M | SA | N | Td | | | |
| 44 | 652 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | M | SA | F | T | | | |
| 45 | 686 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | F | A | I | Td | | | |
| 46 | 851 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | M | SA | F | Td | Td (f) | | |
| 47 | 879-1 | <i>Artibeus lituratus</i> | PELG | M | A | F | Td | | | |
| 48 | 936 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | M | A | F | Td | Td (s) | | |
| 49 | 943 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | PELG | F | SA | F | Td | | | |
| 50 | 1022 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | F | A | I | | Td (s) (b) | | |
| | | | | | | | Total: | 47 | 12 | 2 |
| | | | | | | | | 59 amostras infectadas | | |
| | | | | | | | | 50 indivíduos infectados | | |

Legenda: Local de captura: VL – Vila Luiza, NSG – Nossa Senhora das Graças, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande, PMS - Parque Municipal da Sapucaia; Sexo: M - Macho, F - Fêmea; Idade: A - Adulto, SA – Subadulto, J - Jovem; Dieta: F – Frugívoro, I – Insetívoro, C – Carnívoro. Espécie: T - *Trypanosoma sp.*, Td - *T. dionisii*, Tc – *Trypanosoma cruzi*; Amostra: (s) - sangue, (b) – baço, (f) – fígado.

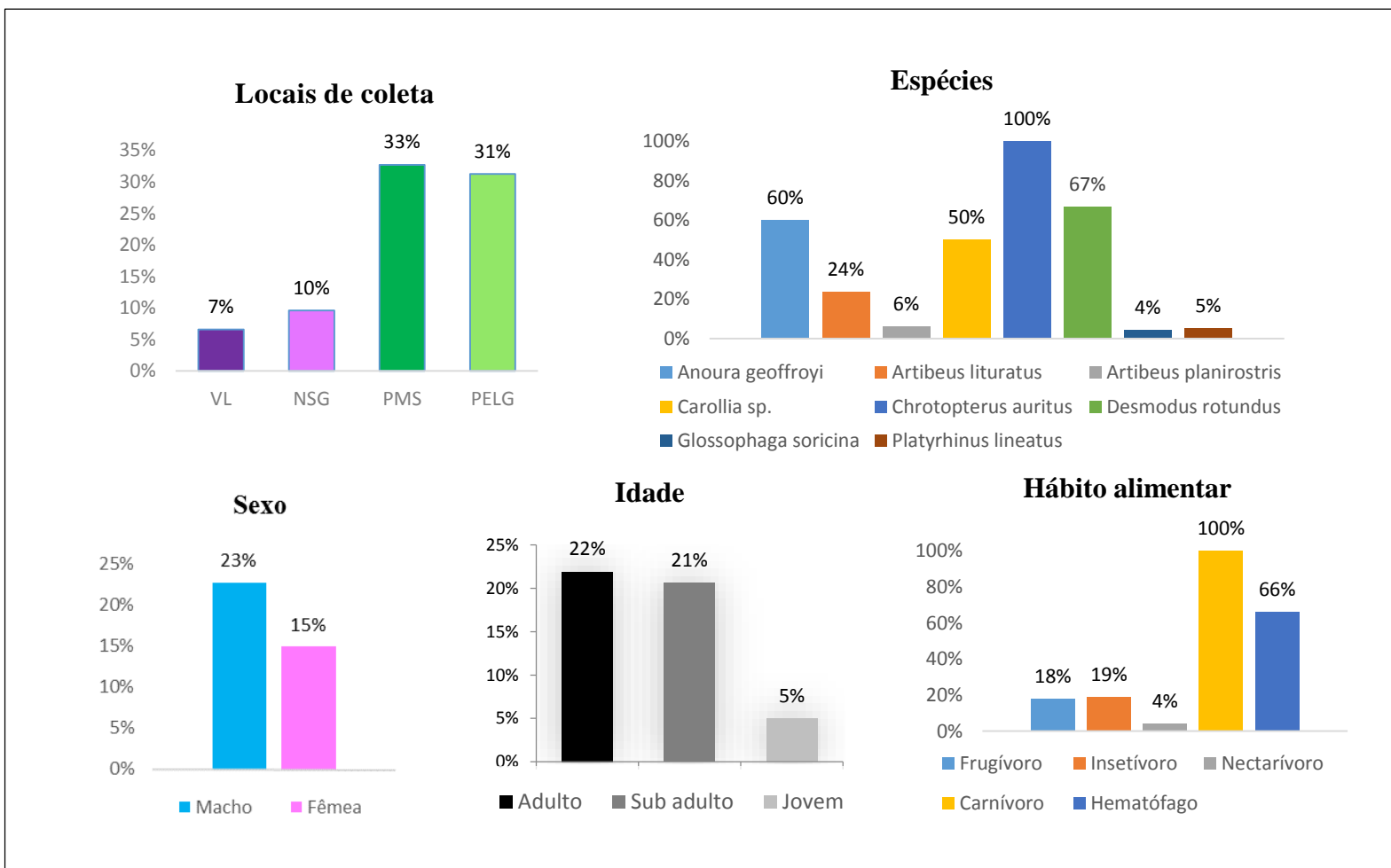


Figura 24: Característica da positividade dos morcegos infectados por espécies de *Trypanosoma* por local de coleta, espécie de morcego, sexo, idade e hábito alimentar, em relação aos animais coletados.

5.3.4 Tripanossomatídeos

Ao considerarmos todos os resultados das análises moleculares das diferentes amostras, pode ser verificada uma prevalência de 25,9 % (64/247) de infecção por tripanossomatídeos nos morcegos coletados no município de Montes Claros (Tabela 9).

A figura 25, compila os nossos resultados e representa a distribuição das espécies de morcegos e espécies de tripanossomatídeos nas quatro áreas estudadas no município de Montes Claros. A área mais preservada e mais distante do centro urbano, PELG, apresentou maior abundância de espécimes e riqueza de espécies de morcegos infectados. Em 26 indivíduos de hábito frugívoro (*Anoura geoffroyi*, *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia* sp., *Chiroderma villosum*, *Dermanura cinérea*, *Platyrrhinus lienatus*), nectarívoro (*Anoura geoffroyi*), insetívoro (*Myotis nigricans*), hematófago (*Desmodus rotundus*) e carnívoro (*Chrotopterus auritus*), observou-se a infecção por 12 tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania* sp.) e *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma* sp.). Cinco indivíduos apresentaram coinfeção (*Leishmania braziliensis*/ *Leishmania amazonenses*, *Trypanosoma cruzi*/*Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma* sp./ *Trypanosoma cruzi*, Tripanossomatídeo não identificado/ *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*). A espécie *Carollia* sp. foi a mais infectada.

Parque Sapucaia, uma área menos preservada inserida dentro da área urbana de Montes Claros, apresentou 21 indivíduos de hábitos frugívoro (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia* sp.), nectarívoro (*Anoura geoffroyi*), insetívoro (*Myotis nigricans*) e hematófago (*Desmodus rotundus*). Observou-se a infecção por seis tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* (*Leishmania amazonenses*) e *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma* sp.). Dois indivíduos apresentaram coinfeção (Tripanossomatídeo não identificado/ *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma cruzi*/*Trypanosoma dionisii*) A espécie *Carollia* sp. também foi a mais infectada.

Analisando os bairros, podemos observar que o bairro VL mais urbanizado, apresentou seis indivíduos de hábito frugívoro (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*),

infectados por quatro tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*) e *Trypanosoma* (*Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma* sp.). Apenas um indivíduo apresentou coinfeção (*Leishmania amazonenses*/*Trypanosoma* sp.) A espécie *Artibeus lituratus* foi a mais infectada.

O bairro menos urbanizado, NSG, apresentou 11 indivíduos de hábito frugívoro (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lienatus*), nectarívoro (*Glossophaga soricina*) e insetívoro (*Myotis nigricans*) infectados por sete tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania* sp.) e *Trypanosoma* (*Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma* sp.) e um indivíduo infectado por tripanosomatídeo não identificado. Apenas um indivíduo apresentou coinfeção por *Leishmania* sp./ *Leishmania braziliensis*. A espécie *Artibeus lituratus* foi a mais infectada nos bairros e espécie *Carollia* sp. foi a espécie mais infectada nos parques.

Tabela 9: Positividade para Tripanossomatídeos, utilizando as metodologias de sequenciamento e PCR RFLP *hsp70*, por espécie e área de estudo dos morcegos coletados no município de Montes Claros no período de abril de 2014 a abril de 2015.

| Identificação | Espécie | Local | RFLP <i>hsp70</i> | | | Sequenciamento (SSU - rRNA V7V8) | | amostra + no <i>hsp70</i> |
|---------------|------------------------------|-------|-------------------|--------------|-----------|-------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| | | | Sangue | Baço | Fígado | Sangue | Isolados | |
| 1 195 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | | | <i>Lb</i> | <i>T</i> | | <i>Lb</i> (f) |
| 2 310 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | | | | <i>Td</i> | | |
| 3 531 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | | | | <i>T</i> | | |
| 4 835 | <i>Artibeus lituratus</i> | VL | | | | <i>Td</i> | | |
| 5 969 | <i>Artibeus planirostris</i> | VL | | | | <i>La</i> | | |
| 6 981 | <i>Artibeus planirostris</i> | VL | | | | <i>La</i> | | |
| 7 277 | <i>Glossophaga soricina</i> | NSG | | | | <i>L</i> | | |
| 8 553 | <i>Artibeus planirostris</i> | NSG | | | | <i>Li</i> | | |
| 9 577 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>T</i> | | |
| 10 629 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>T</i> | | |
| 11 784 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | NSG | | <i>Lb</i> | | | | <i>L</i> (b) |
| 12 786 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>Td</i> | | |
| 13 840 | <i>Myotis nigricans</i> | NSG | | | | <i>Td</i> | <i>Td</i> (s) (b) | |
| 14 846 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>Td</i> | | |
| 15 847 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>Td</i> | | |
| 16 993 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | <i>Trip.</i> | | | | |
| 17 1109 | <i>Artibeus lituratus</i> | NSG | | | | <i>La</i> | | |
| 18 81 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | | | <i>T</i> | | |
| 19 82 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | | | <i>T</i> | | |

| | | | | | | |
|----|-----|------------------------------|------|--------------|-----------|---------------|
| 20 | 108 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | | T | |
| 21 | 231 | <i>Glossophaga soricina</i> | PMS | | T | |
| 22 | 353 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | | T | |
| 23 | 354 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | | T | |
| 24 | 356 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | | Td | |
| 25 | 358 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | Trip. | Td | Td (f) |
| 26 | 461 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | | Tc | |
| 27 | 466 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | T | |
| 28 | 537 | <i>Artibeus lituratus</i> | PMS | | | Td (s) |
| 29 | 540 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | T | Td (s) |
| 30 | 672 | <i>Myotis nigricans</i> | PMS | | Td | |
| 31 | 803 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | | Td | |
| 32 | 805 | <i>Desmodus rotundus</i> | PMS | | T | |
| 33 | 807 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PMS | | T | |
| 34 | 812 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | | Td | |
| 35 | 888 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | | La | |
| 36 | 892 | <i>Artibeus planirostris</i> | PMS | | | Td (s) |
| 37 | 910 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | Td | Td (s) |
| 38 | 916 | <i>Carollia sp.</i> | PMS | | T | |
| 39 | 185 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | | T | |
| 40 | 206 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | Lb | La | Lb (f) |
| 41 | 210 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | T | |
| 42 | 380 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | PELG | | Td | |
| 43 | 386 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | | T | |
| 44 | 431 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | T | |
| 45 | 504 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | | Td | |
| 46 | 506 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | | Td | |
| 47 | 507 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | | T | |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|------------------------------|----------|----------|--------------|-----------|-------------------|---------------|
| 48 | 557 | <i>Chrotopterus auritus</i> | PELG | | | <i>Tc</i> | <i>Tc (s)</i> | |
| 49 | 567 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | | | <i>T</i> | <i>Tc (s)</i> | |
| 50 | 569 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | | <i>T</i> | <i>Td (s)</i> | |
| 51 | 618 | <i>Desmodus rotundus</i> | PELG | | | <i>T</i> | | |
| 52 | 646 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | | | <i>Td</i> | | |
| 53 | 652 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | | <i>T</i> | | |
| 54 | 655 | <i>Chiroderma villosum</i> | PELG | | <i>L. b</i> | <i>Li</i> | | |
| 55 | 686 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | | | <i>Td</i> | | |
| 56 | 700 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | | | <i>Li</i> | | |
| 57 | 848 | <i>Artibeus planirostris</i> | PELG | | | <i>Lb</i> | | |
| 58 | 851 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | <i>Trip.</i> | <i>Td</i> | | <i>Td (f)</i> |
| 59 | 861 | <i>Anoura geoffroyi</i> | PELG | | | <i>L</i> | | |
| 60 | 879 | <i>Artibeus lituratus</i> | PELG | | | <i>Td</i> | | |
| 61 | 936 | <i>Carollia sp.</i> | PELG | | | <i>Td</i> | <i>Td (s)</i> | |
| 62 | 942 | <i>Dermanura cinerea</i> | PELG | | | <i>La</i> | | |
| 63 | 943 | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | PELG | | | <i>Td</i> | | |
| 64 | 1022 | <i>Myotis nigricans</i> | PELG | | | | <i>Td (s) (b)</i> | |
| Total | | | 0 | 2 | 5 | 59 | 12 | 5 |
| Indivíduos positivos | | | 7 | | | 62 | | |
| | | | | | | | | 64 |

Legenda: Local de captura: VL – Vila Luiza, NSG – Nossa Senhora das Graças, PELG - Parque Estadual da Lapa Grande, PMS - Parque Municipal da Sapucaia; Dieta: F – Frugívoro, I – Insetívoro, C – Carnívoro; Espécies: L - *Leishmania sp.*, Lb - *L. braziliensis*, La - *L. amazonensis*, Li - *L. infantum*, T - *Trypanosoma sp.*, Td - *T. dionisii*, Tc – *Trypanosoma cruzi*, Trip. - Tripanossomatídeo; Amostras: (s) - sangue, (b) – baço, (f) – fígado.

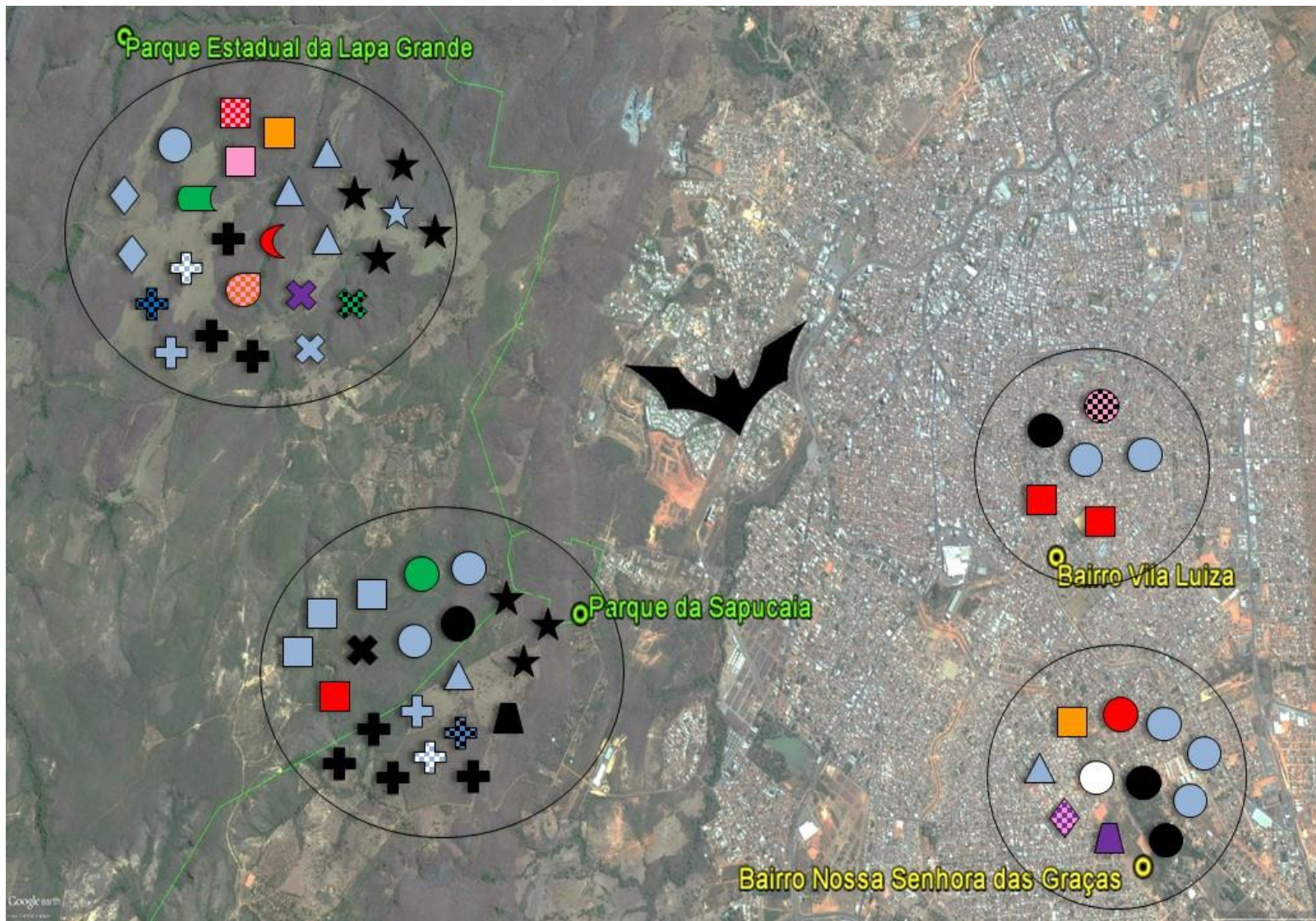


Figura 25: Distribuição das espécies de morcegos e espécies de tripanossomatídeos nas quatro áreas estudadas no município de Montes Claros

Espécies de morcegos

- ✕ *Anoura geoffroyi*
- *Artibeus lituratus*
- ◻ *Artibeus planirostris*
- ⊕ *Carollia* sp.
- ◐ *Chiroderma villosum*
- ◑ *Chrotopterus auritus*
- ☾ *Dermanura cinerea*
- ☆ *Desmodus rotundus*
- ◒ *Glossophaga soricina*
- ▲ *Myotis nigricans*
- ◊ *Platyrrhinus lineatus*

Espécies de parasitos

- ▲ *Leishmania amazonensis*
- ▲ *Leishmania braziliensis*
- ▲ *Leishmania infantum*
- ▲ *Leishmania* sp.
- ▲ *Trypanosoma cruzi*
- ▲ *Trypanosoma dionisii*
- ▲ *Trypanosoma* sp.
- △ Tripanossomatídeo não identificado

6. DISCUSSÃO

6.1. Fauna de Morcegos

6.1.1 Morcegos Capturados

No Brasil e no Cerrado, ocorrem cerca de 175 e 103 espécies de morcegos, respectivamente, sendo que no presente estudo capturou-se 16% das espécies que pertencem a fauna de morcegos do Brasil e aproximadamente 28% da fauna de morcegos conhecidas como presentes no Cerrado (AGUIAR; ZORTÉA, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2014; MORATELLI; DIAS, 2015).

A curva de acumulação de espécies de morcegos para o município indica que ainda são necessárias mais coletas para que seja atingida a assíntota, ou seja, foram capturadas 29 espécies das trinta e nove estimadas. De acordo com o estimador JACKKNIFE 1, cerca de 75% das espécies estimadas para toda a cidade foram amostradas. Tendo em vista a complexidade do nosso trabalho e espaço de tempo para realização do mesmo (18 meses), acreditamos que outras pesquisas em longo prazo complementaríamos nossas informações e abrangeriam todas as espécies.

O município apresentou diversidade H' de 1,94. Outras cidades localizadas no domínio Cerrado, como Belo Horizonte (De Knecht *et al.*, 2005) e Campo Grande (Ferreira *et al.*, 2010) obtiveram índice H' menores (1,3 e 1,65, respectivamente), e mais semelhantes à diversidade do bairro VL ($H' = 1,15$), bairro NSG ($H' = 1,68$) e PMS ($H' = 1,65$). O PELG apresentou a maior diversidade ($H' = 2,11$). Como o índice de diversidade incorpora a riqueza e a distribuição da abundância entre as espécies que compõe uma comunidade, os maiores valores indicam comunidades com maior equitabilidade, ou seja, o PELG possui menor dominância de uma espécie qualquer, enquanto o Vila Luiza possui maior dominância.

O bairro NSG apresentou maior diversidade que o PMS, embora as áreas mais preservadas obtiveram maior riqueza que as áreas mais urbanizadas. Dentre os parques, o parque mais preservado PELG, no final de 13 meses de captura apresentou 62% ($n =$

18) da riqueza de espécies do município, enquanto o PMS apresentou 55% (n= 16). Com relação aos bairros, observou-se 44% (n = 13) de riqueza no NSG e (n = 7) 24% no VL.

Estes resultados se assemelham aos encontrados em outras localidades, embora não haja muitos estudos sobre a quiropterofauna em áreas urbanas. Além disso, sabe-se que a atividade global dos morcegos e a riqueza de espécies são maiores em áreas mais preservadas e diminuem com o aumento da influência urbana (Avila-flores; Fenton, 2005, Jung; Kalko, 2011, Pacheco *et al.*, 2010, Siles *et al.*, 2005). Os estudos que obtiveram maior sucesso de captura em áreas urbanas em comparação com as zonas suburbanas e rurais, observaram pouca riqueza nas áreas urbanas (Nadeem *et al.*, 2013).

Avaliando a diversidade de morcegos em parques urbanos, ruas arborizadas e ruas não arborizadas, Oprea *et al.* (2009) verificaram, que apesar dos morcegos possuírem pouca restrição ao ambiente urbano, os parques urbanos possuem maior riqueza e abundância em relação às ruas, evidenciando que a cobertura vegetal influencia a diversidade dos morcegos. Assim, paisagens urbanas heterogêneas podem representar ilhas de habitat para alguns morcegos (Gehrt & Chelsvig 2003). Algumas espécies são ecologicamente adaptáveis e podem utilizar vários tipos de abrigo, como forros, telhados ou árvores e se alimentar de variadas espécies vegetais urbanas nativas ou exóticas. Essa flexibilidade promove algumas implicações, além do maior contato dos morcegos com humanos e animais domésticos, como a propagação de espécies vegetais exóticas encontradas em áreas urbanas, para habitats naturais (Bredt *et al.*, 1996, Taddei, 1983).

Embora não tenha diferenças estatisticamente significativas entre a abundância de morcegos e os locais de coleta, notou-se um maior número de morcegos nas áreas mais preservadas dos parques do que nas áreas mais urbanizadas dos bairros. A ausência de diferenças significativas provavelmente está relacionada à três eventos atípicos, um no bairro Vila Luiza, outro no Parque Municipal da Sapucaia e outro no Parque Estadual da Lapa Grande. Durante 12 meses de coleta a média de morcegos capturados no bairro Vila Luiza foi 16, porém durante o mês de dezembro houve captura de 81 indivíduos, fato que elevou a média de captura (21), e conseqüentemente elevou o número total de animais capturados do local e das áreas urbanizadas. No mês de alta incidência observou-se que algumas árvores próximas às redes estavam iniciando sua frutificação, e os morcegos

capturados podem ter sido atraídos pelos frutos (Sato *et al.*, 2015). O índice pluviométrico de Montes Claros durante o ano 2014-2015 também foi atípico, embora tenha chovido em novembro, o período foi caracterizado por apresentar poucas chuvas (Inmet, 2015). O início das chuvas pode ter influenciado a frutificação de árvores de Oiti (*Licania tomentosa*) presentes no local de coleta, embora não tenha sido realizados estudos fenológicos. Nos dois primeiros meses do estudo, as redes de neblina ficaram localizadas, na rota de um abrigo de morcegos, portanto nesses meses a taxa de captura foi maior. O abrigo foi identificado durante a coleta de maio e não mais visualizado no mês de junho.

A família Phyllostomidae foi a mais representada no município de Montes Claros, apresentando a maior abundância e riqueza, e a maior variedade de guildas alimentares, compreendendo espécies frugívoras, nectarívoras, insetívoras, carnívora, onívora e hematófagas. Esse resultado era expectável, pois dentre os mamíferos de regiões neotropicais, a família Phyllostomidae é a mais diversificada e abundante, com grandes variações morfológicas e alimentares (Fenton *et al.*, 1992, Gomes *et al.*, 2008), sendo comumente mais registrada em levantamentos da quiropterofauna (Zortéa & Alho 2008). Os indivíduos foram amostrados em todos os locais de coleta, exceto os hematófagos e o carnívoro que foram observados apenas nos parques.

Os filostomídeos foram representados por cinco subfamílias: Desmodontinae (2,3%), Glossophaginae (10%), Caroliinae (11%), Phyllostominae (0,7%), Stenodermatinae (70%). A maior abundância de espécimes observada na Subfamília Stenodermatinae compreendeu as espécies *Artibeus planirostris* (32% dos indivíduos capturados), *Artibeus lituratus* (22%), e *Platyrrhinus lineatus* (14%), correspondendo juntas a 68% do total amostrado. *Artibeus planirostris* foi a espécie mais abundante no município de Montes Claros e no Parque da Sapucaia, e nos demais locais amostrados foi a segunda espécie mais abundante. Já no parque NSG a espécie mais abundante foi *Platyrrhinus lineatus*, e no PELG *Carollia* sp.. Todas essas espécies possuem hábito predominante frugívoro e foram capturadas nos quatro locais estudados.

Reis *et al.*, (2000), em um estudo realizado no Paraná – Brasil, observaram que *Artibeus lituratus* (35,8%), *Carollia perspicillata* (18,2%), *Sturnira lilium* (11,5%), *Myotis nigricans* (11,5%) e *Desmodus rotundus* (4,8%) representaram 81,8% de todos os

indivíduos coletados. Em estudo realizado em Campo Grande, MS, também foi encontrado grande abundância de *A. planirostris* (Ferreira *et al.*, 2010). *Artibeus lituratus* é a espécie predominante em áreas urbanas do Brasil, decorrente da elevada adaptação da espécie em se alimentar de plantas que frutificam nas cidades durante todo o ano (Bredt; Uieda, 1996, Barros *et al.*, 2006, Lima, 2008, Oprea *et al.*, 2009; Gazarini).

A família Molossidae possui 29 espécies de 8 gêneros, todos exclusivamente insetívoros, e em geral capturam suas presas em pleno voo (NOGUEIRA *et al.*, 2014). Dificilmente aparece nos registros de coletas com rede por ter um voo rápido e alto (Gregorin; Taddei, 2002). A espécie *Molossus molossus* é uma das espécies insetívoras mais comuns em áreas urbanas, portanto uma das mais registradas através da busca ativa na região sudeste do Brasil. Comumente se abriga em forros de residências, ocos de árvores e construções (Esbérard *et al.*, 1999; Esbérard, 2003b; Esbérard, 2004; Nogueira *et al.*, 2014). O bairro urbanizado que apresentava mais áreas verdes mostrou maior sucesso de captura de Molossideos. Nos parques não foi capturado nenhum indivíduo dessa família.

Outra família que possui hábito exclusivamente insetívoro é a Vespertilionidae. No Brasil existe cerca de 28 espécies pertencentes a cinco gêneros bem distribuídos pelo país (Nogueira *et al.*, 2014). A espécie *Myotis nigricans* é tolerante a alterações ambientais, abriga-se em ocos de árvores, palmeiras, fendas em rochas, cavernas e edificações humanas. Como a maioria dos insetívoros, a espécie *Lasiurus blossevilli* costuma evitar as redes de neblina, no entanto capturamos três espécimes desta espécie. No presente estudo as áreas urbanizadas obtiveram maior riqueza de espécies dessa família, e o PELG o maior sucesso de captura.

Os bairros apresentaram quatro guildas alimentares (insetívoros, frugívoros, nectarívoros e onívoro), sendo que espécimes onívoros foram capturadas apenas no NSG. Os parques apresentaram uma maior variedade de dietas, tendo sido observados morcegos hematófagos em ambos os parques e carnívoros apenas no PELG.

A presença de *C. auritus* apenas no PELG indica qualidade ambiental, pois além de não suportar alterações ambientais tais como, redução dos fragmentos florestais e

depredação de seus locais de abrigo, principalmente cavernas, sua ocorrência depende de ambientes com grande diversidade de presas e abrigo (Medellin, 1989; Bordignon, 2005).

Os morcegos hematófagos foram encontrados apenas nos parques porque a principal fonte de alimento desses é sangue de mamíferos ou aves silvestres (Reis et al 2013). Uieda et al., relatou em 1995 a ocorrência de morcegos hematófagos nas cidades de São Paulo (Estado de São Paulo), Rio de Janeiro (Estado do Rio de Janeiro), Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais) e Salvador (Estado da Bahia), porém o primeiro registro de um hematófago alimentando de animal doméstico foi realizado por Dantas torres et al., em 2005 na área urbana de Olinda. Em nosso trabalho, observamos maior captura de espécies insetívoras nos bairros do município, já os parques apresentaram maior captura de espécies frugívoras. Ao analisar o número de espécimes capturadas em relação à fonte alimentar, esse cenário muda, observa-se que o maior número de morcegos capturados foram frugívoros (895 indivíduos), seguido de nectarívoros (113), insetívoros (62), hematófagos (26), onívoros (2) e carnívoro (1).

Embora tenhamos capturado mais espécies insetívoras (maior riqueza) nos bairros, todos os locais tiveram um maior número de indivíduos frugívoros (maior abundância). Outros trabalhos realizados no Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica, têm observado o mesmo padrão de inversão da estrutura trófica, com os insetívoros apresentando maior riqueza de espécies e os frugívoros maior frequência de capturas registradas em ambientes como o Cerrado (Zortéa & Alho, 2008, Bernard & Fenton 2002, Schittini 2005). Os frugívoros possivelmente foram favorecidos pela disponibilidade de recurso alimentar fornecido pelas plantas nativas e exóticas encontradas nas ruas, nos quintais das residências e nas áreas verdes dos parques. Aliado à flexibilidade que tais espécies mostram em relação a abrigo e os diversos níveis de perturbação (ruído, poluição química, luminosidade excessiva, desmatamento (Pedrozo, 2014).

A menor frequência de indivíduos insetívoros capturados deve-se ao fato de que a metodologia de captura por redes de neblina, não favorece a amostragem de morcegos insetívoros, já que, apesar da sua elevada riqueza, estes apresentam voo acima do alcance da rede de captura, ao nível das fontes de iluminação artificial (Kalko; Handley, 2001) e detectam as redes com maior facilidade (Muller; Reis, 1992).

6.1.2 Morcegos coletados

Embora tenha sido estabelecido na metodologia que seriam coletados cinco animais por noite e área, durante 13 meses, totalizando 65 indivíduos por local e 260 indivíduos das quatro áreas, foram coletados 60 indivíduos no VL, 62 no NSG, 61 no PMS e 64 no PELG. Houve meses da estação seca que a taxa de captura foi baixa, e dentre os animais capturados tinham muitas fêmeas prenhas, lactantes e/ou com filhotes que não poderiam ser incluídas no presente trabalho. O PELG teve maior número de indivíduos capturados, distribuídos ao longo do estudo, diferente da VL e do PMS que apresentaram taxa de captura elevada devido eventos atípicos naturais em um e dois meses, respectivamente.

Em reflexo da quiropterofauna amostrada, foram coletadas espécies pertencentes às famílias Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae. Como a escolha dos espécimes que iriam ser coletados era aleatória, acompanhou-se a tendência de captura. Dentre os animais coletados, os parques apresentaram maior abundância e riqueza de espécies, sendo que o local mais preservado apresentou a maior riqueza de espécies analisadas, e o local mais urbanizado a menor riqueza. Com a fragmentação ambiental os animais silvestres têm mais predisposição a contrair e dispersar doenças zoonóticas, humano-patogénicas, além de prestar menos serviços ecológicos, e podem introduzir espécies exóticas das áreas urbanas em áreas nativas, gerando problemas ecológicos (Chapman et al., 2005, Carvalho *et al.* 2011).

Nas quatro áreas amostradas obtivemos mais morcegos de hábito frugívoro, seguido de insetívoros nos bairros e nectarívoros nos parques. Como os indivíduos insetívoros foram mais capturados nos bairros, analisou-se mais indivíduos insetívoros provenientes dos bairros.

As espécies *Artibeus lituratus* (59), *Artibeus planirostris* (49) e *Platyrrhinus lineatus* (38) foram as mais coletadas e analisadas durante o estudo, pois foram as mais abundantes no município e no Parque da Sapucaia, nos demais locais amostrados foi a segunda espécie mais abundante. Sendo que primeira espécie no NSG foi *Platyrrhinus lineatus*, e no PELG *Carollia* sp.. Todas as espécies em questão possuem hábito predominante frugívoro.

A análise da relação entre o número de animais capturados, a temperatura e a umidade do ar não foi significativa para o PMS, PELG E NSG. As áreas mais preservadas e arborizadas mantêm um microclima mais estável, a temperatura e umidade avaliadas nesses locais foram mais homogêneas. Graham et al., (1983) afirma que em estudos de macroescala, onde existem maiores variações, essas correlações são mais evidentes. Arruda filho et al. (2007) também não observaram relação entre temperatura, umidade e padrões de diversidade, entre morcegos capturados durante 12 meses em Vitória Conquista – Brasil.

Como locais mais úmidos tendem a possuir grande riqueza de espécies para a família Phyllostomidae (Willig et al, 2000), os parques apresentaram ambientes mais úmidos, sendo que o parque mais preservado, apresentou menores variações de umidade e maior riqueza. A área e o bairro mais urbanizado (VL) apresentou maior variação de umidade comparado aos outros locais, e foi possível observar uma relação entre o número de animais capturados e a umidade do ar. O número de espécimes coletadas aumentou no período em que a umidade do ar estava mais elevada e diminuiu no período de umidade mais baixa. Entretanto, no mês de dezembro o número de capturas apresentou um comportamento individualizado, com 81 indivíduos coletados, modificando o padrão em relação à umidade, que mesmo assim se manteve elevada.

6.2 Infecção de morcegos por tripanossomatídeos

Nesse tópico serão abordados os resultados referentes à detecção da possível infecção dos morcegos por espécies de tripanossomatídeos em quirópteros coletados em quatro áreas distintas do município de Montes Claros. Primeiramente serão discutidos os aspectos da infecção por espécies de *Leishmania*, seguida da infecção por espécies de *Trypanosoma* e por fim uma análise conjunta considerando a ocorrência da infecção em morcegos por tripanossomatídeos e suas possíveis implicações na saúde pública do município de Montes Claros.

6.2.1 A infecção em morcegos por espécies de *Leishmania* no município de Montes Claros

No presente estudo foram avaliados 247 exemplares de quirópteros e destes 14 apresentaram infecção por espécies de *Leishmania* com positividade de 5,6%. Para o cálculo da positividade foram consideradas as análises moleculares utilizando como alvos a região variável V7V8 do SSUrRNA (\approx 560pb, Noyes et al., 1999) e um fragmento de 1300pb do gene *hsp70* (Garcia et al., 2004). Não foram incluídos os resultados obtidos com a metodologia de triagem que utilizou como alvo outro fragmento do SSUrRNA (van Eys et al., 1992). Não houve significância estatística entre as áreas do estudo e taxa de infecção por *Leishmania* sp.

A metodologia proposta por van Eys foi utilizada no estudo como triagem das 1235 amostras (5 tecidos de cada um dos 247 exemplares) por ser uma técnica simples, rápida e sensível na detecção da região conservada entre espécies de *Leishmania*. Todas as amostras que apresentaram bandas fortes ou fracas correspondentes ao intervalo de 300-400 pb foram selecionadas e submetidas a PCR *hsp70*. Com a técnica da PCR RFLP *hsp70* a positividade nas amostras foi de 3,9% (7/181) e nos indivíduos de 4,9% (7/144). Os resultados sugerem que as positivities para as amostras (14,7%, 181/1235) e principalmente para os indivíduos (58,3%, 144/247) pela metodologia do SSU rRNA foram superestimadas, pois mesmo as bandas muito claras foram consideradas positivas. Estas diferenças observadas podem ser explicadas pela utilização de alvos diferentes que podem apresentar performances distintas. Hitakarun *et al.* (2014) compararam diferentes métodos de PCR para a detecção de *Leishmania siamensis* e observaram que a PCR direcionada ao gene SSU rRNA obteve maior sensibilidade e especificidade (100% e 82,4%) em relação a PCR dirigida ao alvo *hsp70* (87,5% e 79,4%). Através do teste de detecção limitante foi observado que a PCR SSU-rRNA detectou 0,05 parasitos/ μ l ou uma concentração 2,3 pg/mL de DNA. Já o *hsp70* detectou 0,5 parasitos/ μ l e 23 pg/mL de DNA. Apesar dos resultados encontrados no presente estudo corroborarem com Hitakarun *et al.* (2014) não era esperado encontrar uma discrepância tão acentuada na positividade entre os alvos utilizados.

O estudo da infecção de quirópteros por espécies de *Leishmania* no Brasil é escasso e recente, além disso as taxas de infecção são muito variáveis. Já foram realizadas

pesquisas com o objetivo de investigar a ocorrência da infecção por *Leishmania* nos estados do Maranhão (Da Costa et al., 2015), Espírito Santo (Acosta et al., 2014), São Paulo (Savani et al., 2010; Oliveira et al., 2015) e Mato Grosso do Sul (Shapiro et al., 2013). Somente nos estudos realizados no Espírito Santo não foi encontrado nenhum exemplar de morcego infectado por *Leishmania*. A maior positividade encontrada (40%) foi no Mato Grosso do Sul, mas apenas 5 exemplares foram analisados por PCR RFLP do ITS1 e a única espécie identificada foi a *L. braziliensis*. Os resultados encontrados em São Paulo por Savani et al. (2010), de 3,1% de positividade, foram semelhantes aos observados em nosso estudo. Entretanto, ao investigar áreas urbanas endêmicas para leishmaniose visceral também em São Paulo, o estudo de Oliveira et al. (2015) registraram uma prevalência de 23,9% para a infecção por espécies de *Leishmania* em morcegos.

Em nosso trabalho, observamos um maior número de indivíduos detectados molecularmente com *Leishmania amazonensis* (6/64 - 9,3%), seguido de *Leishmania braziliensis* (5/64 - 7,8%) e *Leishmania infantum* (3/64 - 4,6%). Dentre os 6 morcegos infectados por *L. amazonensis* 3 foram coletados nos bairros e 3 nos parques. Já os indivíduos infectados por *L. infantum* foram coletados no PELG (2) e no bairro NSG (1). A maioria (4/5) dos morcegos infectados por *L. braziliensis* foi coletada no PELG e apenas um no bairro VL. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou lesão macroscópica na pele, ou baço e fígado.

Vale ressaltar que em três amostras o sequenciamento da região V7V8 não obteve sequências de qualidade, não sendo possível a identificação específica (amostras de sangue de 277, 861, e baço de 784) consideradas apenas *Leishmania* sp. As amostras do indivíduo 993 não obtiveram sucesso na identificação da infecção. A amostra de baço apesar de apresentar uma banda fraca na PCR *hsp70* na RFLP não foi observado nenhum perfil de restrição e quando as amostras de sangue e baço deste mesmo indivíduo foram submetidas ao sequenciamento (V7V8) não geraram sequências de qualidade para análise. Estas limitações da identificação por métodos moleculares podem ocorrer devido a uma série de fatores, como a sensibilidade em detectar pequenas quantidades de DNA na amostra. Vários autores já relataram que a carga parasitária de *Leishmania* em hospedeiros silvestres é geralmente baixa, o que leva a dificuldade em sua detecção.

Um fato interessante observado foi a ocorrência de infecção mista por espécies de *Leishmania* em dois indivíduos: o indivíduo 206, macho, adulto, coletado no PELG, apresentou infecção por *L. amazonensis* no sangue (sequenciamento) e *L. braziliensis* no fígado (*hsp70* e sequenciamento); o indivíduo 665 macho, subadulto da espécie *Chiroderma villosum* coletado no PELG apresentou coinfeção por *L. infantum* no sangue (sequenciamento) e *L. braziliensis* no fígado (*hsp70*). A ocorrência de infecção mista por diferentes espécies de *Leishmania* em quirópteros já foi relatada por Oliveira et al. (2015), onde as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* foram encontradas infectando a mesma amostra de baço do morcego insetívoro *Molossus rufus*.

Já a fêmea subadulta da espécie *Artibeus lituratus* (195) coletada no bairro mais urbanizado VL apresentou coinfeção por *Trypanosoma* sp. no sangue (sequenciamento) e *L. braziliensis* no fígado (*hsp70*). Comparando-se os resultados do sequenciamento e da RFLP direcionada ao *hsp70* observou-se que a identificação das amostras de fígado dos indivíduos 195 e 206 pelas técnicas são coincidentes, isto é, ambas detectaram *L. braziliensis*. Essas amostras serão clonadas, em estudos posteriores, para melhor entendimento desta ocorrência.

Há relatos da ocorrência de diferentes espécies de tripanossomatídeos coinfectando uma mesma amostra ou amostras diferentes de um mesmo indivíduo. Madeira et al. (2005, 2006), relataram casos de cães com *L. braziliensis* encontrada em lesão cutânea e *L. infantum* no sangue, linfonodos e baço; Infecção mista por *L. infantum* em amostras de medula óssea e *L. braziliensis* em lesão no focinho e na pele da orelha de cães (Quaresma et al. 2011); *L. braziliensis* em lesão cutânea no focinho e *L. infantum* em fragmento do baço (Silva et al. 2011); Savani (2005) relatou a coinfeção de *L. chagasi* e *T. evansi* em um cão no Mato Grosso do Sul; De Araújo et al. (2013), através de testes moleculares detectaram infecção mista em um tamanduá-mirim por *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* e *L. infantum* no estado do Pará; Por fim, Ferreira et al., 2015 observaram infecção mista por *L. infantum* e *L. braziliensis* em roedores capturados em Belo Horizonte.

Casos de coinfeção em humanos também já foram relatados. Estudo realizado no Maranhão por meio de técnicas moleculares, diagnosticou 11 (1%) indivíduos com infecção mista por *T. cruzi* e *L. braziliensis*, sete indivíduos (0,6%) com infecção mista

para *T. cruzi* e *L. infantum* e dois (0,18%) com infecção tripla por *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Mendes *et al.*, 2007). Mebrahtu *et al.* (1991) relatou que um paciente diagnosticado com LV apresentou *L. donovani* e *L. major* em cultura de aspirado do baço.

Ibrahim *et al.* (1994) relataram quatro casos de infecção mista nas amostras de aspirado de linfonodos de pacientes diagnosticados com LV, sendo infectados por *L. donovani* e *L. major* e um por *L. donovani* e *L. aethiopica*. Martinez *et al.* (2002) observaram um paciente com leishmaniose cutânea difusa infectado por *L. amazonensis* e *L. infantum* na mesma lesão. E Monroy-Ostria *et al.* (2014) identificou pacientes com lesões infectados tanto por *L. mexicana* e *L. braziliensis*, quanto por *L. amazonensis* e *L. mexicana*. A infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania* no mesmo indivíduo, especialmente em áreas de sobreposição de espécies, pode ser mais prevalente do que previamente relatado (Ibrahim *et al.* 1994).

6.2.2 Infecção em morcegos por espécies de *Trypanosoma* no município de Montes Claros

As culturas positivas (2% - 16/741) e culturas estabilizadas isoladas (1,6% - 12/741), referentes a 247 espécimes de morcegos coletados nesse trabalho, foi baixa comparada a outros estudos. Barros *et al.* (2008) ao avaliar 86 culturas de sangue obtiveram 25,5% de positividade. Do mesmo modo, Costa *et al.* (2014) analisaram 154 culturas, 10,3% destas foram positivas, porém apenas 5,8% estabilizaram. Cavazzana *et al.* (2010) avaliaram 1.043 morcegos capturados nos Biomas Amazônia, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica e observaram que a prevalência da positividade foi de 12,9%. Contudo, Savani *et al.* (2010) obteve 340 culturas, em que 21 destas foram excluídas por possuírem contaminantes e todas as demais foram negativas.

A sensibilidade do cultivo é diretamente associada às condições da cultura e ao tamanho da amostra semeada, embora seja altamente específico (Chiari *et al.*, 1989). Assim, a quantidade de amostra coletada dos indivíduos que possuíam pequena massa corporal, a contaminação de alguns cultivos por fungos e bactérias e a temperatura de 25°C mantida podem ter influenciado o sucesso dos isolamentos.

Há poucos estudos sobre a coinfeção por parasitos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* em cultura. Duran et al. (2009) avaliaram o comportamento de *L. chagasi* e *T. cruzi* em uma cultura mista, e observaram diferenças estatisticamente significativas entre as culturas mistas e as puras. Houve diferença na quantidade de organismos, na evolução da estrutura da população, nos níveis de colesterol, glicose e proteínas totais, além de diferença no pH. O pH do cultivo misto decresceu acompanhando o pH do cultivo de *Trypanosoma*.

Barros et al. (2008) e A Costa et al. (2014) mantiveram a temperatura do cultivo a 28°C e obtiveram maiores prevalências de positividade (25,5% e 5,8%). Savani et al. (2010) mantiveram a mesma temperatura do nosso estudo (25°C) e não obteve cultivos positivos. Sugere-se que apesar do gênero *Trypanosoma* sp. possuir maior positividade nos morcegos, o pH do cultivo pode ter inibido o desenvolvimento de uma possível cultura de *Leishmania* sp.. No entanto, a temperatura parece não ter favorecido o desenvolvimento de *Trypanosoma* sp., já que a temperatura foi mantida voltada para o crescimento de *Leishmania* sp.

Tripanossomatídeos foram mais isolados de amostras provenientes do sangue dos morcegos *A. lituratus* (1,6% - 1/59), *A. planirostris* (6% - 3/49), *Carollia* sp (15% - 4/26), *Platyrrhinus lineatus* (5,2% - 2/38 *C. auritus* (100% - 1/1) e *Anoura geofroyi* (20% - 1/5). Em dois espécimes insetívoros fêmeas, adultas, da espécie *Myotis nigricans* (840 e 1022), uma coletada no bairro Nossa Senhora das Graças e outra coletada no Parque Estadual da Lapa Grande, obtivemos parasitos isolados de amostras do sangue e do baço. Avaliando o habito alimentar, embora nota-se mais morcegos frugívoros dentre os morcegos infectados com espécies de *Trypanosoma* sp., nos isoladas em cultura, houve maior prevalência de insetívoros.

Ao avaliar os morcegos infectados por tripanossomatídeos isolados de cultura, observamos que espécies *Carollia* sp. e *Artibeus planirostris* tiveram maior infecção e a área mais urbanizada (VL) apresentou o menor número de animais infectados. Além disso, não observamos diferença na proporção de machos e fêmeas infectados. A maior positividade ocorreu nos animais frugívoros, adultos e subadultos. Quando se analisa a positividade da infecção por *Trypanosoma* sp. nos indivíduos, em relação aos indivíduos coletados, verifica-se que há maior positividade entre fêmeas, apesar da maior taxa de

captura ter sido de machos, adultos e jovens. Sendo as espécies com maior positividade, a carnívora *C. auritus*, e a nectarívora *A. geoffroyi*, decorrente do pequeno número de indivíduos amostrados, seguidas pelas espécies *M. nigricans* e *P. lineatus*.

Testes moleculares direcionados aos alvos *hsp70* e SSU rRNA foram utilizados no intuito de detectar e caracterizar os tripanossomatídeos isolados nas culturas. Na PCR-RFLP direcionada ao *hsp70* a qual identifica e distingue infecções por espécies de *Leishmania* (300-400pb) e *T. cruzi* (500pb), todas as amostras do cultivo apresentaram o mesmo perfil de banda do *T. cruzi*. Verificou-se que outras espécies de *Trypanosoma* não são diferenciadas pela digestão da enzima de restrição *Hae* III. Deste modo, esta técnica não é indicada para inquéritos epidemiológicos de amostras coletadas no campo, pois outras espécies de *Trypanosoma* podem ser consideradas como *T. cruzi* por apresentarem o mesmo padrão de bandas.

A metodologia proposta por Noyes et al. (1999) foi utilizada no estudo como triagem de 266 amostras (12 amostras dos isolados da cultura, 247 amostras de sangue, 7 amostras tecido positivas no *hsp70*) para o sequenciamento. Vários autores têm utilizado os fragmentos da SSU rRNA que compreendem as regiões V7-V8 como marcadores para análises de DNA *barcoding* (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990; Fermino et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Lima, 2011; Lima et al., 2012a; 2013; Viola et al., 2009b).

Com o método de sequenciamento foi possível discriminar as espécies dos flagelados tripanossomatídeos isolados em cultura. Os morcegos frugívoros *A. lituratus*, *A. planirostris* e *Carollia* sp. coletados em todas as áreas do estudo, apresentaram infecção por *Trypanosoma dionisii*. Adicionalmente, as espécies *C. auritus* e *Anoura geoffroyi*, ambos machos adultos coletados no PELG, apresentaram infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Analisando os resultados provenientes do sequenciamento das amostras de DNA sanguíneas, dos 247 morcegos, observamos positividade de *Trypanosoma* sp. em 50 indivíduos (20%). Este resultado reforça a ideia que os cultivos apresentaram baixa positividade, porém a transmissão de espécies do gênero *Trypanosoma* encontra-se ativa entre os morcegos capturados no município de Montes Claros.

Observou-se um maior número de indivíduos infectados por *Trypanosoma dionisii* (26/64 – 40,6%), seguido de *Trypanosoma* sp. (21/64 – 32,8%) e *Trypanosoma cruzi* (3/64 – 4,6%). Os morcegos infectados por *T. dionisii* foram coletados em todas as áreas do estudo. Já os indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* foram coletados apenas no PELG. Esse dado corrobora com outros autores, os quais também encontraram maior ocorrência de *T. dionisii* em morcegos (Cavazzana et al. 2010; Maia da Silva et al., 2009; Hamilton et al., 2012).

A maioria dos morcegos infectados por *Trypanosoma* sp. foram coletados nos parques PMS e PELG. Verificou-se significância estatística entre os parques e a infecção por *Trypanosoma* sp. e Tripanossomatídeos.

Em algumas amostras de sangue foram identificadas *Trypanosoma* sp. e identificados como *T. dionisii* ou *T. cruzi* quando isolados em cultura. Sugere-se que as amostras 569 e 540 sejam *T. dionisii* e a 567 seja *T. cruzi*. Pois, o sequenciamento da cultura pode ter selecionado essas espécies para o crescimento, e a maior concentração e qualidade do DNA facilitou o sequenciamento.

As espécies de parasitos do subgênero *Schizotrypanum* são as únicas que infectam células de mamíferos e se multiplicam intracelularmente como amastigotas. Porém, apenas *T. cruzi* infecta o homem e outras ordens de mamíferos, as demais espécies são parasitas exclusivos de morcegos. *Trypanosoma dionisii*, *T. erneyi* e *T. cruzi marinkellei* (espécies *T. cruzi*-like) são espécies muito relacionadas e cujas formas sanguíneas são praticamente indistinguíveis morfológicamente das de *T. cruzi*. (Hoare et al., 1972; Molyneux et al., 1991).

Trypanosoma dionisii já foi identificada em todos os biomas brasileiros (Cavazanna et al., 2010). Embora se assemelhe ao *T. cruzi* pelas suas formas amastigotas e o seu desenvolvimento em cultura, é a espécie do subgênero *Schizotrypanum* mais distante filogeneticamente de *T. cruzi*. A espécie é capaz de produzir “pseudocistos” contendo formas epimastigotas no coração, diafragma, músculos do esterno no morcego (Baker et al., 1972; Glauert et al., 1982; Baker, 1985; Molyneux, 1991; Oliveira et al., 2009).

O *Cimex pipistrelli* é o vetor natural de *T. dionisii* e de *T. vespertilionis* na Europa

e no Canadá, respectivamente, e o desenvolvimento no vetor é semelhante ao de *T. cruzi* em triatomíneos. No entanto, não é conhecido o vetor de *T. dionisii* nas Américas e de *T. erneyi* na África. Há poucos estudos sobre os Cimicídeos no Brasil, os quais são menos abundantes se comparados aos do Velho Mundo (Bower e Woo, 1982; Gardner e Molyneux, 1988; Cavazanna et al., 2010; Lima et al., 2012b). O *Cimex limai* (Pinto, 1927) já foi observado sugando morcegos em Pernambuco e alimentando-se em humanos em domicílios no Pará (Lent & Proença, 1927).

Trypanosoma cruzi é caracterizado por apresentar uma estrutura populacional multiclonal que resulta em uma extrema diversidade genética e ecletismo tanto no que se refere aos seus hospedeiros mamíferos quanto aos nichos por eles colonizados (Anonymous, 1999). Os triatomíneos que vivem em buracos de árvores, cavernas, telhados de folhas de palmeiras, tocas de animais silvestres, palmeiras e forros de residência são os responsáveis pelas infecções e os principais vetores de *T. cruzi* entre os morcegos (Marinkelle, 1977). Os morcegos infectados por *T. cruzi* podem atuar como reservatórios domésticos (Barnabé et al., 2003; Cavazzana et al., 2010; Grisard et al., 2003; Lisboa et al., 2008; Maia da Silva et al., 2008; Marcili et al., 2009b; Steindel et al., 1998.).

Thomas et al. (2007) observaram que *Rhodnius prolixus* foram capazes de realizar repastos sanguíneos completos no morcego frugívoro *Carollia perspicillata*, insetívoro *Glossophaga soricina* e hematófago *Desmodus rotundus*, o que sugere que essa via também possa ser efetiva para a transmissão do parasito. Já Añez et al. (2009) propôs a via de transmissão congênita de *T. cruzi* na espécie insetívora *Molossus molossus*. Os insetos do gênero *Cavernicola* (*C. lenti* e *C. pilosa*), são frequentes em cavernas, e o gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius* em ocos de árvores, locais que servem de abrigo e são muito frequentados por morcegos.

Dentre os tecidos de fígado dos indivíduos 195, 358 e 851, analisados pelo *hsp70* que foram sequenciados, observou-se infecção por *Trypanosoma dionisii* (358 e 851), e coinfeção no indivíduo 195 por *Trypanosoma* sp. no sangue (sequenciamento) e a *L. braziliensis* no fígado (*hsp70*), como já citado no tópico acima sobre *Leishmania*.

Analisando as características dos morcegos infectados por *Trypanosoma* sp., observamos que o sexo, o hábito alimentar, e a idade podem ter sido influenciados pelo

maior número de indivíduos machos, adultos e frugívoros coletados. Foi observado maior infecção nas espécies *Artibeus lituratus* e *Carollia* sp, seguida do hematófago *Desmodus rotundus*. Observando a positividade de positividade por *Trypanosoma* sp. , nota-se maior infecção de morcegos macho, adulto e subadulto, coletados no PMS e PELG. A espécie mais prevalente foi o carnívoro *C. auritus* e o hematófago *D. rotundus*.

6.2.3 Morcegos infectados por tripanossomatídeos e sua implicação para a saúde pública no município de Montes Claros

6.2.3.1 Infecção nas áreas estudadas

Em levantamentos epidemiológicos é importante pesquisar não só as espécies de *Leishmania*, mas também de *Trypanosoma*, pois há ocorrência de ambos na América Latina, podendo ser especialmente frequente em amostras de morcegos (Schoenian 2009, Lima et al., 2015).

A confirmação, apenas, da presença do parasito no animal, através de técnicas moleculares não é suficiente para definir um animal infectado como sendo reservatório, mas apenas como um hospedeiro. Pois, considera-se reservatório um sistema que pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção do agente infeccioso na natureza, e não apenas uma única espécie de mamífero infectado (Ashford, 1996; Ashford, 1997; Haydon et al., 2002). Deste modo, cada espécie de mamífero desempenha um papel na manutenção do parasito nos sistemas reservatórios, sendo em uma escala espaço-temporal restrita, específica para cada local e cada momento (Roque et al., 2010).

Roque e Jansen (2014) definem um sistema como reservatório quando uma ou mais espécies de mamíferos, que podem apresentar ou não sintomas, são responsáveis por manter o parasito na natureza. De acordo com Silva et al., 2005, para ser empregado o termo reservatório, é necessário que o hospedeiro preencha alguns critérios, como: superposição espaço/tempo com os vetores; sobreviver o suficiente para garantir a transmissão; apresentar uma prevalência de infecção de pelo menos 20%; manter o parasito na pele ou no sangue em quantidade suficiente para infectar facilmente o vetor; e apresentar a mesma espécie de parasito encontrada no homem.

Em relação aos indivíduos coletados, observou-se maior positividade de *Leishmania* sp. em frugívoros, que pode ter ocorrido devido ao maior número de animais frugívoros coletados. Outros estudos indicam maior infecção nos insetívoros, nestes estudos se analisou mais insetívoros provenientes de Centros de Controle de Zoonoses (Oliveira et al., 2015; Savani et al., 2010).

Embora tenha sido coletado mais indivíduos machos e adultos, obtivemos maior positividade para *Leishmania* sp. em fêmeas jovens. Esses resultados divergem dos de Berzunza-Cruz et al., (2015) que observaram maior número de morcegos machos infectados por espécies de *Leishmania*. No entanto, para inferir sobre relação sexo com infecção são necessários mais estudos. Não há estudos sobre transmissão vertical de *Leishmania* sp. em morcegos.

Avaliando os morcegos que apresentaram infecção por *Trypanosoma* sp., em relação aos morcegos coletados, observou-se maior positividade na espécie carnívora *C. auritus*, e na hematófaga *D. rotundus*. Este fato pode ser atribuído ao cálculo da positividade devido ao pequeno n amostral coletado dessas espécies. Apesar dos hematófagos alimentarem de sangue de mamíferos que podem conter formas infectantes do parasito, a infecção é raramente relatada (Roque et al., 2008). Houve maior positividade entre os indivíduos machos e adultos, resultado que pode ter ocorrido devido ao maior número de machos e adultos coletados.

Estudos observando a relação do parâmetro sexo em relação a infecção devem ser mais aprofundados e correlacionados com os hábitos comportamentais de cada espécie. A idade deve influenciar na taxa de positividade, pois à medida que aumenta a idade, aumenta a probabilidade de infecção, devido ao maior tempo de exposição ao parasito. A existência de indivíduos jovens infectados indica que a infecção dos morcegos é recente, portanto pode estar circulante tanto nos parques como nos bairros estudados.

Além dos morcegos insetívoros, alguns morcegos que possuem hábito preferencialmente frugívoro, nectarívoro, carnívoro e onívoro, ocasionalmente também se alimentam de insetos (Reis, 2013). Deste modo, os morcegos podem se infectar por espécies de *Leishmania*, ao alimentarem-se de flebotomíneos ou serem infectados por flebotomíneos. Lampo et al., (2000) observaram que *Lutzomyia longipalpis* é capaz de se alimentar em pelo menos quatro espécies de morcegos de três famílias diferentes:

Pteronotus parnellii (Mormoopidae), *Glossophaga longirostris* (Phyllostomidae), *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) e *Myotis oxyotus* (Vespertilionidae). Observou-se nesse estudo que três dessas famílias ocorrem no município de Montes Claros, área endêmica para a forma tegumentar e visceral de leishmaniose.

Na natureza a via oral é provavelmente a mais antiga e eficiente via de dispersão do parasito em morcegos, podendo ocorrer através da ingestão de barbeiros por mamíferos que se alimentam de insetos, da ingestão de fezes dos triatomíneos quando o animal coça com a boca o local da picada ou através da ingestão de frutos e sementes contaminados por fezes de barbeiros ou material de glândula de cheiro de *Didelphis* sp.. A predação ou brigas com perfurações também podem promover a infecção oral através do contato do sangue de um mamífero infectado com a mucosa oral de outro (Paho, 2009).

Comparando a fauna de flebotomíneos das zonas urbanas, de transição, e silvestres de Várzea da Palma - MG observou-se maior sucesso de captura no ambiente urbano e maior diversidade na zona de transição e ambiente silvestre (De Castilho Sanguinette et al., 2015). O estudo evidencia um perfil de urbanização gradual das espécies de flebotomíneos encontradas no norte do estado de Minas Gerais, onde situa nossa área de estudo.

A família Phyllostomidae, mais prevalente no Brasil, apresenta alta taxa de infecção por tripanossomatídeos. Os morcegos das famílias Molossidae e Vespertilionidae que possuem hábito alimentar insetívoro exclusivo, já foram encontrados infectados por *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. infantum* e são frequentemente encontrados em habitações humanas. Portanto, é necessário a realização de mais estudos para avaliar a verdadeira importância destes mamíferos na dispersão do parasito nas áreas silvestres e urbanas (Roque & Jansen 2014; Oliveira et al. 2015).

Apesar de se obter morcegos infectados em todas as áreas estudadas, a maior positividade e diversidade de espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* foi encontrada no PELG. O que era esperado, já que o parque é um ecossistema preservado que possui maior ocorrência de hospedeiros, reservatórios e vetores, além de possuir cavidades, rochas e plantas que servem de abrigo e permitem a coabitação de flebotomíneos, triatomíneos e morcegos, permitindo assim uma maior probabilidade de infecção (Figura 26).

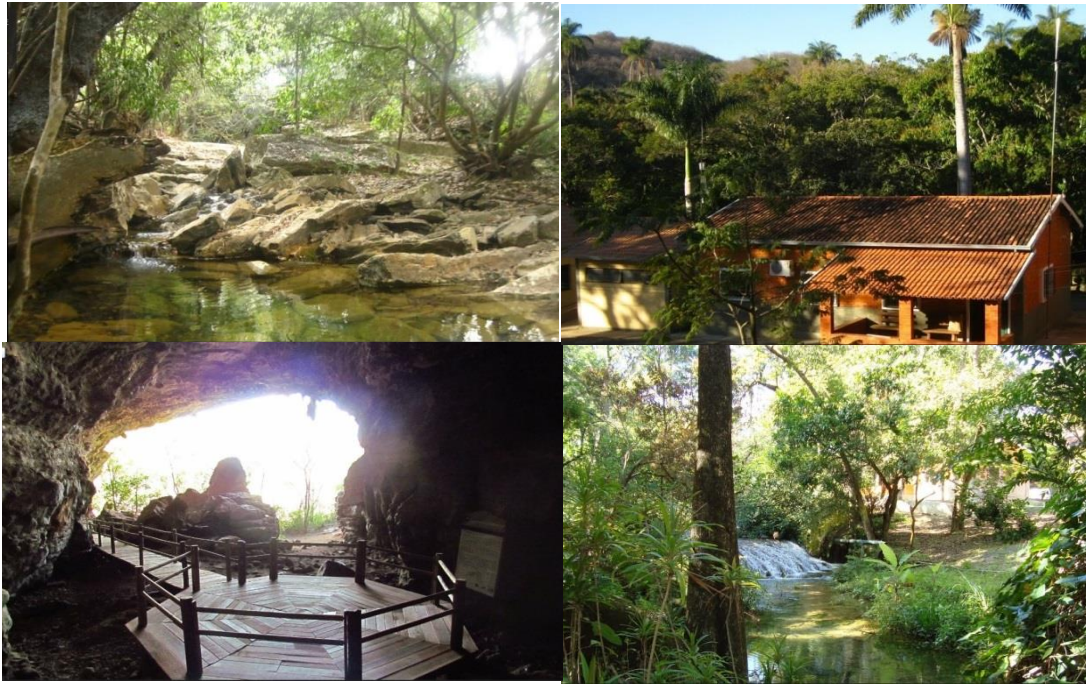


Figura 26: Perfil do Parque Estadual da Lapa Grande, Montes Claros -MG.

O Parque Municipal da Sapucaia (Figura 27) também apresentou grande riqueza de espécies de morcegos infectadas com tripanossomatídeos. No entanto, houve maior quantidade de morcegos infectados por *Trypanosoma* sp. que por *Leishmania* sp. Apesar de terem sido notificados casos humanos de LT em escaladores que visitam o local com frequência, e em moradores (Vigilância Epidemiológica de Montes Claros, 2015).

Os morcegos que ocorrem em regiões com vegetação mais heterogênea, apresentam maiores taxas de infecção por parasitos. A alta diversificação de nichos, abrigos, habitats, e as migrações, somados aos diversos sistemas sociais vivenciados pelos morcegos, que vão desde pequenos grupos familiares até colônias de milhões de indivíduos, resultam consideravelmente em sua maior susceptibilidade a contrair diferentes patógenos (Hill & Smith, 1984; Kalko 1997; Patterson et al., 2008).



Figura 27: Perfil do Parque Municipal da Sapucaia, Montes Claros -MG.

O bairro mais preservado, NSG, apresentou ocorrência de tripanossomatídeos e de todas as espécies de *Leishmania* relatadas no estudo. Devido aos determinantes ambientais e socioeconômicos encontrados no bairro em questão, como a presença de uma grande área verde próximo das residências, frequente ocorrência de roedores e marsupiais nas residências que possuem lotes grandes, muitas árvores frutíferas, palmeiras, acúmulo de lixo e matéria orgânica na área peridomicilar, entulhos, galinheiros, currais e chiqueiros, criação de cães e gatos que reproduzem constantemente. O bairro NSG apresenta condições para o estabelecimento de criadouros de flebotomíneos e triatomíneos, vetores da LT, LV e Doença de Chagas (Figura 28).



Figura 28: Perfil de algumas residências localizadas no bairro Nossa Senhora das Graças, Montes Claros.

O bairro Vila Luiza também apresentou ocorrência de tripanossomatídeos, no entanto foi a área que teve menor riqueza de morcegos coletados e morcegos infectados. Observou-se positividade em apenas duas espécies de morcegos (*Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris*), sendo essas as espécies mais capturadas e mais adaptadas a área urbana.

O VL é o bairro mais urbanizado dentre as áreas estudadas, está inserido próximo a área central da cidade, porém em algumas residências há criação de galinhas e cavalos. O cemitério da cidade localiza-se nesse bairro e nele há acúmulo de matéria orgânica, além da presença de palmeiras, gambá e grande quantidade de baratas e ratos (Figura 29).

Embora o VL apresenta alta prevalência de LV canina, foi verificado morcego infectado pela espécie *L. amazonensis*. Por se tratar de um bairro pouco arborizado e com poucos relatos de moradores sobre a existência de abrigos de morcegos nas residências, sugere-se que os morcegos habitualmente encontrados no bairro se abrigam em outros

locais, não sendo tão expostos aos vetores da *L. infantum*. No cemitério da cidade, foi observado presença de roedores e marsupiais, indicando que no bairro mais urbanizado há ocorrência de animais sinantrópicos e a possível circulação de espécies de *Leishmania amazonensis*. Não ocorreram casos de LV e LT humana nos bairros Vila Luiza (Vigilância Epidemiológica de Montes Claros, 2015).



Figura 29: Perfil de algumas residências e do cemitério localizados no bairro Vila Luiza, Montes Claros.

6.2.3.2 Perfil epidemiológico

Gusmão et al., 2014, avaliaram o perfil epidemiológico, de 2007 a 2011, de leishmaniose visceral no norte do Estado de Minas Gerais, e verificou que os casos notificados no período (71%) aconteceram na área urbana e o município de Montes Claros registrou o maior número de casos (29,5%).

Em relação a Doença de Chagas, também na região do Norte de Minas, onde se localiza a cidade de Montes Claros, a mesma é considerada endêmica, porém existem poucos trabalhos publicados sobre a epidemiologia dessa doença na região (Camargo, 1984). Nos últimos cinco anos, não consta relatos de triatomíneos infectados e nenhum caso humano notificado no município de Montes Claros pelo PCDCh (Programa de Controle da Doença de Chagas). Somente é de notificação compulsória os casos agudos, e a atenção do PCDCh é mais voltada para a região rural. O PCDCh foi instituído pelo Ministério da Saúde, sendo sua execução a cargo do município, o qual dispõe de uma equipe de servidores para realizar a busca ativa dos triatomíneos nas localidades e borrifação das habitações (Vigilância Epidemiológica de Montes Claros, 2015).

A prevalência de LV canina no bairro Vila Luiza (45%) foi maior que a prevalência do bairro Nossa Senhora das Graças (25%). Embora o bairro apresentasse alta prevalência de LV canina, foi verificado apenas a ocorrência das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* nos morcegos.

Durante as coletas, uma das residências amostradas no NSG apresentou cão infectado por LT canina que era mantido sem tratamento ou uso da coleira com deltametrina. Nesta residência foi detectado um morcego com coinfeção por *L. braziliensis* e *L. sp.* (indivíduo 784). Entretanto, não ocorreram casos de LV e LT humana no bairro Vila Luiza.

No ano de 2013 já haviam sido notificados no NSG dois casos de LT, um foi confirmado a autoctonia e outro caso alternava a moradia no NSG e na zona rural. Outro caso foi notificado em 2014, cuja autoctonia não foi confirmada (Vigilância Epidemiológica de Montes Claros, 2015).

O gênero *Artibeus*, além de mais abundante e dominante no município de Montes Claros e em outros estudos, apresentou alta positividade de infecção por *L. amazonensis* (5 indivíduos), *L. braziliensis* (3) e *L. infantum* (2). Outros autores também

diagnosticaram esse gênero infectado por *L. mexicana* (Berzunza-Cruz et al. 2015) e *L. amazonensis* (Savani et al. 2010; Oliveira et al. 2015).

Apesar das espécies de *Leishmania* terem um ciclo de vida complexo que envolve reservatórios, vetores e hospedeiros suscetíveis, dependendo do meio ambiente, a extensão de infecção por *Leishmania* em morcegos permanece desconhecida, e até agora não foi possível demonstrar a participação de morcegos no ciclo desses parasitos. Entretanto, as características biológicas e ecológicas dos morcegos relacionadas com a infecção por *Leishmania*, como a grande abundância de espécimes e riqueza de espécies, ampla distribuição geográfica (alta mobilidade, hábito migratório), e estratégias de vida distintas (ampla diversidade de habitats e hábitos alimentares), contato com o vetor, capacidade de se infectar, manter uma infecção e transmitir o parasito, evidencia que esses animais possuem competência como potenciais reservatórios de *Leishmania* (De Lima et al., 2008; Roque & Jansen, 2010; Millán et al., 2014,; Roque & Jansen, 2014; Berzunza - Cruz et al., 2015).

Os morcegos também são comumente encontrados infectados por diversos tripanosomatídeos, dentre os quais o *Trypanosoma cruzi*. Seus refúgios incluem ocos de árvores, folhas de bananeiras, forros de habitações humanas e construções rurais. Estes mamíferos podem ser importantes reservatórios do parasito, visto que em determinadas áreas são abundantes, adaptam-se bem ao domicílio humano e podem apresentar elevadas prevalências de infecção.

Há evidências estatísticas para se afirmar que existe diferença entre parques e bairros no que se refere a taxa de infecção por *Trypanosoma* e *Tripanossomatídeos*, ou seja, os morcegos coletados nos parques apresentaram maior infecção por *Trypanosoma* sp. No entanto, embora não apresentou significância em relação à *Leishmania*, observa-se que, entre as áreas urbanas estudadas, houve maior diversidade de espécies de morcegos e de tripanossomatídeos no Bairro Nossa Senhora das Graças, o que pode ser explicado pelas características rurais encontradas nesse bairro. Vale destacar que nesse bairro, em relação a diversidade de espécies de tripanossomatídeos, o resultado foi semelhante ao encontrado nos parques, o que pode confirmar a ocorrência da urbanização das doenças causadas por esses parasitos.

O estabelecimento de populações de morcegos nas cidades pode tornar um problema de saúde pública e sanidade animal, já que pouco se sabe sobre as possíveis

implicações desses animais nos ciclos de diferentes tripanossomatídeos. Sugerimos que os morcegos possam carregar patógenos da fauna silvestre para a cidade e vice e versa, pois, além de serem os únicos mamíferos com a capacidade real do voo, cobrindo longas distâncias durante as migrações sazonais, eles possuem uma ampla gama de abrigos que varia entre as áreas florestais e as áreas urbanas (Muhldorfer, 2012). Deste modo, através da presente pesquisa foi possível conhecer melhor a biologia dos quirópteros, a ecologia parasitária (ocorrência de tripanossomatídeos) e a epidemiologia de algumas zoonoses.

Assim, para que seja possível estabelecer atividades profiláticas eficazes, é preciso ampliar o conhecimento sobre a biologia e a ecologia parasitária que envolve os parasitos, os vetores e os morcegos. Outros estudos sobre o perfil ecoepidemiológico dos morcegos dentro dos ciclos das leishmanioses e das tripanossomíases, sobre a infecção experimental por diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, e o estudo sobre a fonte alimentar de flebotomíneos e triatomíneos devem ser realizados.

7. CONCLUSÕES

- A quiropterofauna de Montes Claros foi inventariada e apresentou 29 espécies distribuídas em quatro famílias, Phyllostomidae (22 espécies), Vespertilionidae (03 espécies), Molossidae (03 espécies) e Emballonuridae (01 espécie). As áreas preservadas apresentaram 18 (Parque Estadual da Lapa Grande) e 16 (Parque Municipal da Sapucaia) espécies, e as áreas urbanizadas apresentaram 13 (bairro Nossa Senhora das Graças) e 07 (Vila Luiza) espécies de morcegos.
- Foi verificado uma positividade de 25,9% (64/247) de infecção por tripanosomatídeos nos morcegos coletados no município de Montes Claros.
- Os tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* foram representados pelas espécies *Leishmania amazonensis* (9,3%), *Leishmania braziliensis* (7,8%), *Leishmania infantum* (4,6%) e *Leishmania* sp. (4,6%). E o gênero *Trypanosoma* pelas espécies *Trypanosoma dionisii* (40,6%), *Trypanosoma* sp. (32,8%) e *Trypanosoma cruzi* (4,6%).
- O Parque Estadual da Lapa Grande, área mais preservada entre os parques, e o bairro Nossa Senhora das Graças, área menos urbanizada entre os bairros, apresentaram o maior número de morcegos infectados por *Leishmania*, sugerindo a participação destes hospedeiros nos ciclos silvestre e urbano das espécies do gênero *Leishmania*.
- A maior positividade da infecção de morcegos por espécies do gênero *Trypanosoma* nos parques, Parque Estadual da Lapa Grande e o Parque Municipal da Sapucaia, foi significativa. Indicando que existe diferença entre parques e bairros no que se refere a taxa de infecção por espécies de *Trypanosoma*, e que o ciclo de transmissão destes parasitos entre os morcegos ocorre predominantemente nas áreas mais preservadas.

- Em relação aos morcegos coletados, observou-se maior positividade por *Leishmania* sp. em morcegos fêmeas, jovens e frugívoros, e maior positividade por *Trypanosoma* sp. em morcegos machos e adultos. Quanto ao hábito alimentar observou-se que os morcegos de hábito carnívoro (1/1) e hematófago (8/12) apresentaram maior positividade, no entanto o número de animais coletados foi pequeno. Avaliando o hábito alimentar entre os morcegos infectados, observou-se maior positividade nos morcegos frugívoros (32/50).

8. Anexos

Anexo 1- Aprovação do CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 333 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Investigação do papel de morcegos como hospedeiros de Leishmania spp. em área endêmica de LV no Município de Montes Claros, MG, Brasil”, que tem como responsável Maria Norma Melo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/06/2014. Este certificado espira-se em 10/06/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 333 / 2013, related to the Project entitled “Investigation of the role of bats as hosts of Leishmania spp. in an endemic area of VL in the city of Montes Claros, Brazil”, under the supervision of Maria Norma Melo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/06/2014. This certificate expires in 10/06/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 10/06/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2 - Licença de coleta e sacrifício dos quirópteros - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 41709-3 | Data da Emissão: 13/05/2014 10:35 | Data para Revalidação*: 12/06/2015 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Thalylta Maria Vieira | CPF: 074.416.676-40 |
| Título do Projeto: Investigação da Ocorrência de Leishmania spp. em Morcegos e Flebotomíneos na Cidade de Montes Claros - Minas Gerais - Brasil | |
| Nome da Instituição : UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS | CNPJ: 17.217.985/0001-04 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|---|------------------|---------------|
| 1 | Coletas dos morcegos, Processamento das amostras coletadas, Publicação dos resultados | 01/2014 | 02/2015 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosspecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/igen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Outras ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. |
|---|---|

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|-------------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| 1 | Renato Gregorin | Coordenador e colaborador | 108.981.798-31 | 171435655 SSP-GP-GP | Brasil |
| 2 | José Dilermando Andrade Filho | Colaborador | 835.584.546-34 | M-4 627226 SSP-MG | Brasil |
| 3 | Eduardo Robson Duarte | Colaborador | 005.897.926-36 | 6299867 ssp-MG | Brasil |
| 4 | Célia Maria Ferreira Gontijo | Coordenadora | 392.318.796-34 | M663908 SSP-MG | Brasil |
| 5 | Sabrina Miranda Lima | Colaboradora | 016.358.546-60 | MG14819008 SSP-MG | Brasil |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-----------|----|--------------------|------|
|---|-----------|----|--------------------|------|

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53551989



Página 1/4

Anexo 3 - Licença de coleta e captura de morcegos em caverna – SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 41245-1 | Data da Emissão: 29/10/2013 10:28 | Data para Revalidação*: 28/11/2014 |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Thalyta Maria Vieira | CPF: 074.416.676-40 |
| Título do Projeto: INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE LEISHMANIA spp. EM MORCEGOS E FLEBOTOMÍNEOS NA CIDADE DE MONTES CLAROS ? MINAS GERAIS ? BRASIL | |
| Nome da Instituição : UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS | CNPJ: 17.217.985/0001-04 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Realização do diagnóstico parasitológico e molecular | 11/2013 | 12/2014 |
| 2 | Coleta de morcegos e flebotomíneos para pesquisa de infecção de leishmaniose | 11/2013 | 12/2015 |
| 3 | Publicação dos resultados | 12/2014 | 06/2015 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/icgen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Outras ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. |
| 2 | As coordenadas das cavernas deverão constar no relatório. Solicita-se a atenção para que a coleta dos pontos seja realizada na maior proximidade de sua entrada principal e na maior precisão possível, atentando para o registro do datum utilizado, do número de satélites e erro associados aos pontos coletados. |

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|------------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| 1 | José Dilemardo Andrade Filho | Colaborador | 835.584.546-34 | M-4 627226 SSP-MG | Brasileira |
| 2 | Sabrina Miranda Lima | Colaboradora | 016.358.546-60 | MG14919008 SSP-MG | Brasileira |
| 3 | Renato Gregorin | Coordenador e colaborador | 108.981.798-31 | 171435655 SSP-SP-SP | Brasileira |
| 4 | Célia Maria Ferreira Gontijo | Coordenadora | 392.318.796-34 | M663908 SSP-MG | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 27739338



Página 1/4

Anexo 4 - Autorização para coleta no Parque Estadual da Lapa Grande



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS
DIRETORIA DE PESQUISA E PROTEÇÃO À BIODIVERSIDADE
GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS

AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Numero da Autorização
012/2014 (2ª via)

Data da Emissão
19/05/2014

Prazo de Validade
19/05/2015

INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL E DO PROJETO

| | | | | | | | |
|-------------------|--|-------------|---------|----------------|-------------------|----------------|--------------------------|
| Título do Projeto | Investigação da ocorrência de <i>Leishmania</i> spp. em morcegos de Montes Claros - MG | | | | | | |
| Instituição | Universidade Federal de Minas Gerais | | | | | | |
| Responsável | Thallyta Maria Vieira | | | | | CPF | 074.416.676-40 |
| Logradouro | Rua São Pedro e São Paulo | | | | | | |
| Nº/KM | 22 | Complemento | --- | | Bairro/Localidade | Santo Expedito | |
| Município | Montes Claros | | | UF | MG | CEP | 39400-495 Cx. Postal --- |
| Telefone | (38) 3214-1727 - (31) 3409-2850 | | Celular | (31) 9195-4594 | | | |
| E-mail | thallytabio@gmail.com / normamello@gmail.com | | | | | | |

INTEGRANTES DA EQUIPE

| Nome | Instituição | CPF/RG | Função |
|---------------------------|-------------|---------------|--------------|
| Sabrina Miranda Oliveira | UFMG | MG 14919008 | Colaboradora |
| Enila Flávia | UFMG | MG 14641540 | Colaboradora |
| Patricia Doerl Barroso | UFMG | MG 14534548 | Estagiária |
| Cristieli Matos Gonçalves | UFMG | SP 41135200-8 | Estagiária |
| Juliana Costa Neri | UFMG | MG 14790199 | Estagiária |
| Thiago Neves Silva | UFMG | MG 10899482 | Guia |
| Gilberto Sabino | USP | SP 871334551 | Colaborador |

INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES (COLETA/CAPTURA/TRANSPORTE)

| | | | | | |
|--------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------------|
| Tipo de Atividade: | Coleta Botânica | Coleta e/ou Captura Zoológica | <input checked="" type="checkbox"/> | Coleta Abiótica | <input type="checkbox"/> |
| | Coleta de Fungo | Coleta de Microorganismos | <input type="checkbox"/> | Sem Coleta/Captura | <input type="checkbox"/> |

OBSERVAÇÕES

Esta autorização permite:
(i) a coleta/transporte de 05 indivíduos/espécie/ano (totalizando 60 exemplares) de Morcegos (Mammalia: Chiroptera) através da instalação de 05 redes de neblina (01 rede por ponto amostral) Totali. As redes de neblina deverão ser vistoriadas de 30 em 30 minutos. Os demais indivíduos capturados deverão ser soltos (Autorização do SISBIO nº 41709-1);
(ii) a coleta/transporte de amostras biológicas (sangue, fragmento de tecido/órgão, ectoparasitas e fezes) originárias dos indivíduos de Morcegos coletados (Autorização do SISBIO nº 41709-1);
(iii) a coleta/transporte de 60 indivíduos/espécie/ano de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) através da instalação de 05 armadilhas luminosas (01 por ponto amostral) (Autorização do SISBIO nº 41245-1).

As autorizações do SISBIO deverão ser Revalidadas no caso de Prorrogação desta Autorização.

LOCAL DA ATIVIDADE - EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL

| Unidade de Conservação | Responsável pela UC | Endereço da UC | Contato (Telefone e e-mail) | Assinatura do Responsável pela UC |
|-----------------------------|-----------------------|--|--|-----------------------------------|
| Parque Estadual Lapa Grande | Elisângela Alves Mota | Estrada do Alfeirão, KM 5, saída pelo B. Vila Atlântida, Zona Rural. | elisangela.mota@meioambiente.mg.gov.br (38) 3224-7550 / (31) 9159-0249 / (38) 9106-0447 | |

Esta autorização será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.

LOCAL DA ATIVIDADE - FORA DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL (apenas para material botânico)

| | |
|--------------|---------------|
| Município(s) | Não se aplica |
|--------------|---------------|

Assinatura do responsável pela Autorização

Número do Processo SIGED - IEF/DPBIO/GPROP

CONFERE COM ORIGINAL

Janaina A. B. Aguiar
Gerente de Projetos e Pesquisas do IEF
Masp: 1131556-0

SIGED



00000809 2101 2014

3612 1370 014-0
Anote abaixo o número do SIPRO

Cidade Administrativa Tancredo Neves, Edifício Minas - Gerência de Projetos e Pesquisas
Rodovia Prefeito Américo Gianetti, s/n - Bairro Serra Verde - Belo I
Telefones: (31) 3915-1326 e (31) 3915-1327 E-mail: pesquisa_

Anexo 5 - Autorização para coleta no Parque Municipal da Sapucaia



PREFEITURA DE MONTES CLAROS
SECRETARIA ADJUNTA DE MEIO AMBIENTE

AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Fica autorizada a realização de PESQUISA sob responsabilidade da Sra, Thallyta Maria Vieira, RG MG 13611916 nas dependências do Parque da Sapucaia, sendo feitas pesquisas durante um dia de cada mês durante o ano de 2014 à março de 2015, conforme solicitação em Ofício da Universidade Federal de Minas Gerais. .

São condicionantes a esta autorização:

1. Recolhimento de resíduos sólidos gerados no evento e sua disposição de forma adequada;
2. Manutenção da estrutura utilizada para que a mesma seja entregue da mesma forma que recebeu;
3. Ser responsável por quaisquer acidentes/incidentes que por ventura venham a acontecer durante as pesquisas;
4. Apresentar após as pesquisas o trabalho final para arquivo desta Secretaria;
5. Esta autorização não desobriga da obtenção de outras necessárias para a realização das pesquisas.

Por ser verdade, declaro estar ciente da responsabilidade e das penalidades impostas para o desrespeito destas condicionantes.

Montes Claros, 07 de fevereiro de 2014


Rafael Lopes Nogueira Guimaraes

Gerente de Preservação e Conservação Ambiental


Thallyta Maria Vieira

Responsável pela pesquisa

Tel: 91954594

Anexo 6 - Folder

Projeto: Investigação da Ocorrência de *Leishmania* spp. em Morcegos e Flebotomíneos no Município de Montes Claros – MG.

Instituições responsáveis:

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ René Rachou.



Instituições colaboradoras:

USP e Centro de Controle de Zoonoses.

OBJETIVO: Investigar se os Morcegos e os Mosquitos palha (flebotomíneos), encontrados em Montes Claros, possuem o parasito causador da Leishmaniose.



PORQUE PESQUISAR?

Os morcegos são muito importantes para o meio ambiente. Eles polinizam flores como a flor do pequi, são eficientes dispersores de sementes e ainda controlam populações de insetos. Mas com os desmatamentos, os morcegos e os flebotomíneos (ou mosquito palha) estão migrando para as cidades. Queremos pesquisar espécies de morcegos e flebotomíneos existem, e se os morcegos e os flebotomíneos de Montes Claros estão infectados com o parasito causador da Leishmaniose



QUAL A IMPORTÂNCIA DESSE ESTUDO?

Através dos resultados deste estudo será possível conhecer mais sobre os morcegos, os flebotomíneos e as diferentes espécies de *Leishmania* spp. encontrados em Montes Claros. **Tendo estas informações será possível estabelecer medidas mais eficazes de prevenção e controle às Leishmanioses.**



COMO SERÃO AS COLETAS?

Os morcegos serão coletados de 18h às 23h. E os flebotomíneos de 18h às 6h. As coletas serão realizadas durante 1 ano, sendo um dia por mês. Devendo ser um desses dias mostrados na tabela:

| Ano | Meses | Possíveis datas para coleta |
|-----------|-----------|-----------------------------|
| 2014 | Fevereiro | Dias 01 – 02 – 03 - 04 |
| | Março | Dias 05 – 06 - 07 - 08 |
| | Abril | Dias 01 - 02 - 03 - 04 |
| | Maio | Dias 28 – 29 – 30 - 31 |
| | Junho | Dias 01 - 02 - 03 - 04 |
| | Julho | Dias 28 – 29 – 30 - 31 |
| | Agosto | Dias 26 – 27 - 28 - 29 |
| | Setembro | Dias 24 – 25 – 26 - 27 |
| | Outubro | Dias 27 – 28 – 29 - 30 |
| | Novembro | Dias 24 – 25 – 26 - 27 |
| | Dezembro | Dias 22 - 23 - 26 - 27 |
| | 2015 | Janeiro |
| Fevereiro | | Dias 19 – 20 - 21 - 22 |



Qualquer dúvida ou informação entre em contato:

Thallyta Maria Vieira

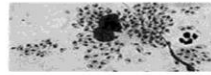
Bióloga - Doutoranda em Parasitologia - UFMG

Tim:(38)91954594 Vivo:(38)98040492 Casa:(38)32141727

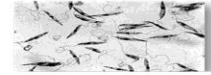
Projeto: Investigação da Ocorrência de *Leishmania* spp. em Morcegos e Flebotomíneos no Município de Montes Claros – MG.

O que é Leishmaniose?

É uma doença causada pelo parasito chamado *Leishmania* spp.



Forma Amastigota de *Leishmania* spp

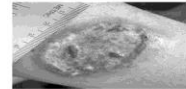


Forma Promastigota de *Leishmania* spp

Quais as formas clínicas da doença mais comuns no Brasil?

Leishmaniose Tegumentar:

causa ferida na pele ou na mucosas.



Leishmaniose Visceral:

conhecida como calazar, atinge os órgãos, principalmente o baço e fígado.



Como é transmitida a Leishmaniose?

Apenas através da picada da fêmea, infectada, do inseto chamado flebotomíneo .

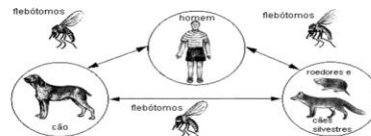
Popularmente conhecido como Mosquito Palha.

(O morcego não é vetor (não transmite) leishmaniose!!!)



Quais são os principais hospedeiros do parasito causador da Leishmaniose?

Mamíferos: canídeos, felinos, eqüinos, roedores, edentados (tatu, preguiça, tamanduá), marsupiais (gambá) e primatas, incluindo o homem.



Como prevenir a Leishmaniose?

Usar repelente quando exposto ao ambiente onde é encontrado o mosquito palha.

Uso de mosquiteiros de malha fina.

Não deixar acumular matéria orgânica e lixo, limpar sempre os quintais e terrenos.

Manter limpo os abrigos de animais, principalmente galinheiros e canis.

Procurar auxílio médico quando suspeitar estar com leishmaniose, a leishmaniose tem tratamento e cura!

Avisar o Centro de Controle de Zoonoses quando suspeitar que um cão esteja doente.

Deixar o CCZ entrar e dedetizar a residência.

Anexo 7 - Palestras e oficinas



Palestra “Ecologia e importância dos morcegos” realizada na Faculdade de Saúde Ibituruna para os alunos de Biologia, durante a semana do biólogo.



Palestra e prática “Morcegos” realizada na Faculdade ISEIB-FAVENORTE para os alunos de Biologia.



Exposição ‘‘Morcegos, Flebotomíneos e *Leishmania*’ realizada na Faculdade ISEIB-FAVENORTE para os alunos de Biologia, no dia do Biólogo.



Palestra e trabalho lúdico sobre a importância dos morcegos realizada no Colégio São José para jovens de 7 a 10 anos do 19º Grupo Escoteiro São José.



Palestra e vivência sobre o “ O que é um projeto de doutorado com morcegos, flebotomíneos e parasitos”, realizada no Parque da Sapucaia para jovens de 11 a 14 anos do 19º Grupo Escoteiro São José.



.Palestra “A importância dos morcegos” realizada na Escola Municipal Eunice Carneiro para jovens de 7 a 17 anos do 99º Grupo Escoteiro Nova Geração.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Mortara RA, Tedesco RC, Cardoso FO, Carvalho LOP, Gonçalves da Costa SC. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection *Parasitology* 2004; 128: 385–390.
- Aguiar LMS & Zortéa M. A diversidade de morcegos conhecida para o Cerrado. In II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais. ParlaMundi, Brasília, Brasil 2008.
- Aguilar CM, Rangel EF & Deane LM. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 471-472.
- Almeida J, Serra-Freire N, Peracchi A. Anatomical location of *Periglischrusiheringi* (Acari: Spinturnicidae) associated with the great fruit-eating bat (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev. Bras. Parasitol Vet* 2015; 24p.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*; 127: 227-232.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7: 35671.
- Alves VR, Freitas RA, Barret T. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodiade), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(3): 251-3.
- Añez N, Crisante G, Romero M. Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. *Bol Mal SaludAmb* 2009; 49: 91-96.
- Anonymous. Medical Economics Co, Inc. Montavale, N.J. Drug topics redbook 1999.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1933-1938.
- Araújo Júnior JP & Duarte JMB. Estudo sorológico e avaliação do estado de portador do vírus da Febre Aftosa em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) da Bacia do Rio Paraná. In: JMB. Duarte. O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: Resultado de dois anos de pesquisa. Jaboticabal, São Paulo. FUNEP 2001.
- Araújo VA, Boité MC, Cupolillo E, Jansen AM, Roque AL. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology* 2013; 140: 455–460.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30 (5): 1269-1281.

Averis S, Thompson RC, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Smith A. The diversity, distribution and host-parasite associations of trypanosomes in Western Australian wildlife. *Parasitol* 2009; 136(11):1269-1279.

Ávila-Flores R & Fenton BM. Use of spatial features by foraging insectivorous bats in a large urban and scape. *J. Mammal* 2005; 86:1193-1204.

Ávila-Pires FD. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. *Caderno de saúde pública* 1989; 5: 82-89.

Barata RA, Apolinário EC, Cerqueira RF. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de Cavernas Quartzíticas na Cadeia do Espinhaço no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço. SEB 2011; 1-2.

Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol* 2003; 2(3): 201-8.

Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLV: Inquérito preliminar sobre triatomíneos silvestres no Sul de Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Biol* 1971; 31: 225-233.

Barreto MP. Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of *Trypanosoma cruzi* to man. *Proc Internat Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research*, Belo Horizonte. Washington: Pan American Health Organization, 1975; 307-316.

Barreto MP. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. *Revista Brasileira do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1965; 7: 305-315.

Barros JHS, Romijn PC, Baptista C, Pinto AGS, Madeira MF. Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41: 683-685.

Barros RSM, Bisaggio EL & Borges RC. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, sudeste do Brasil. *Biota Neotropical* 2006; 6(1).

Bernard E & Fenton B. Species diversity of bats (Mammalia:Chiroptera) in forest fragments, primary forest, and savannas in central Amazonia, Brazil. *Can J Zool* 2002; 80:1124-1140. doi:10.1139/z02-094.

Berzunza-Cruz MM, Rodriguez-Moreno Á, Gutierrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens CR, Hidalgo-Mihart M, Marina CF, Rebollar-Téllez EA, Bailón-Martínez D, Balcells CD, Ibarra-Cerdeña CN, Sánchez-Cordero V, Becker I. Leishmania (L.) Mexicana Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(1): 0003438.

Bittencourt AL, Barral A, Costa JML, Saldanha ACR, Badaró R, Barral-Neto M, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *Int J Derm* 1992; 31: 568-570.

Botero A, Thompson CK, Peacock CS, Clode PL, Nicholls PK, Wayne AF, Lymbery AJ, Thompson RC. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2013; 2:77-89.

Bordignon MO. Predação de morcegos por *Chiropterus auritus* (Peters) (Mammalia, Chiroptera) no pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 2015; 22: 1207 - 1208.

Brandão-Filho SP, Valença HF, Almeida ÉL, Brito MEF, Almeida FA, Ishikawa E, Cupolilo E, Shaw JJ. Infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, Pará. *Ver Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 396-396.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2007; 2: 180.

Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 145.

Bredt A & Uieda W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. *Chiroptera Neotropica* 1996; 2(2): 54-57.

Camargo EP. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit* 1998; 42: 29-112.

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile Virus. *The Lancet Infectious Diseases* 2002; 2: 519–529.

Cassilhas APP. Análise Genômica e pós-genômica de proteínas de *Leishmania chagasi* 197 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.

Carneiro NFF, Caldeira AP, Antunes LA, Carneiro VF, Carneiro GF. Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. *Ver Soc Bras Medic Trop* 2009; 42 (4): 449-451.

Carvalho SB, Brito JC, Crespo EJ, Possingham HP. Incorporating evolutionary processes into conservation planning using species distribution data: a case study with the western Mediterranean herpetofauna. *Diversity and Distributions* 2011; 17: 408–421.

Cavalcanti MP. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco 2008.

Cavazzana JRM, Marcili A, Lima L, Da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and GAPDH) and mitochondrial (Cytb) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology* 2010; 40: 345-355.

Chagas C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n gen, n sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159–218.

Chapman BB, Bronmark C, Nilson J & Hansson L. The ecology of partial migration. *Oikos* 2011; 120: 1764-1775.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemoculture for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1989; 22: 19-23.

Ciprandi A, Horn F, Termignoni C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes Saliva of hematophagous animals: source of new anticoag. *Rev bras hematol hemoter* 2003; 25(4): 250-262.

Colwell RK. Estimates Versão 9.1: Estimativa de Estatística da Riqueza de Espécies e Shared Espécies de Amostras 2013. Disponível em <www.viceroy.eeb.uconn.edu/estimates> acesso em: Agosto de 2014.

Colwell RK & Coddington JA. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 1994; 345: 101-118.

Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitol* 2006; 133(Pt 2):159-169.

Costa VCO, Tavares JF, Silva AB, Duarte MC, Agra MF, Barbosa-Filho JM, Souza ILL, Silva BA, Silva MS. Hyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochemistry letters* 2014; 8: 32-37.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degrave W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90: 278-279.

Courtenay O, Macdonald DW, Lainson R, Shaw JJ, Dye C. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. *Parasitology*; 109, 273–279.

Dantas-Torres F, Valença LA, Andrade-Filho GV. First record of *Desmodus rotundus* in urban area from the city of Olinda, Pernambuco, Northeastern Brazil: a case report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2005; 47: 107-108.

de Carvalho CV, Ricci G, Affonso R. *Guia de Práticas Em Biologia Molecular*. Yendis, 2010.

de Castilho Sanguinette C, Da Silva DF, Stumpp RGAV. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. *Parasites & Vectors* 2015; 8: 428. doi:10.1186/s13071-015-1003-2.

de Knecht LV, Silva JA, Moreira EC & Sales GL. Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005; 57: 576-583.

de Lima H, Rodriguez N, Barrios MA. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103 4: 412-414.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica da calazar no Ceará. *Hospital* 1955; 48: 61-70.

Dedet JP, Pratlong F. Taxonomiedes *Leishmania* et distribution géographiquedes leishmanioses. *Ann Dermatol Venereol* 2000; 127: 421-424.

Degrave WFO, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Utilization of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305–318.

Deus GT, Becer ME, Navarro IT. Diagnóstico da raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil. *Ciências Agrárias* 2003; 24: 171-76.

Di noia, JM, Buscaglia CA, de Marchi, CR, Almeida IC, Frasch ACC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' Disease is due to a single parasite lineage. *The Journal of Experimental Medicine* 2002; 195: 401–413.

Dias JCP. Longitudinal studies on human Chagas disease in Bambuí, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 61-72.

Dias-Lima AG, Castellón EC, Sherlock IA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Estação Experimental de Silvicultura Tropical Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amaz* 2000; 33: 303-316

Dias E, Melo GB, Costa O, Damasceno R, Azevedo M. Investigações sobre esquizotripanose de morcegos no estado do Pará. Encontro do barbeiro *Cavernicola pilosa* como transmissor. *Rev Brasil Biol* 1942; 2: 103.

Duran C, Quiroga MF, Díaz B, Silva S, Oschman GA, Strauss M, Tejero F. *Leishmaniachagasi* y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol Mal Salud Amb, Maracay* 2009; 49pp.

Esbérard CEL. Novo registro de *Micronycteris hirsuta* (Peters) (Mammalia, Chiroptera) na Mata Atlântica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Brasil Zool* 2004; 21:b403-404.

Esbérard, CEL. Armadilha para retirada de morcegos abrigados em telhado. *Chiroptera Neotropical* 2003b: 9 (1-2): 164-166.

Esbérard CEL, Luz EM, Chagas AS. Uso de residências para refúgios por morcegos no estado do Rio de Janeiro (Mammalia: Chiroptera). *Rev Bras Med Vet* 1999; 21: 17-20.

Esteban JG, Amengual B, Cobo JS. Composition and structure of helminth communities in two population of *Pipistrelluspipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from Spain. *Folia Parasitologica* 2001; 48: 143-48.

Estrada A & Coates-Estrada R. Bat species richness in live and in corridors of residual rain forest vegetation at losTuxtlas, Mexico. *Ecography*, Copenhagen 2001; 24 (1): 94-102.

Fabián ME, Rui AM, Waechter JL, Reis NR, Peracchi AL, Santos GASD. Plantas utilizadas como alimento por morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae). *Ecologia de Morcegos*. Londrina, Technical Books 2008; 51-70.

Fenton MB, Acharya L, Audet D, Hickey MBC, Merrimam C, Obrist MK, Syme DM, Adrinks B. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption on the Neotropics. *Biotropica* 1992; 24: 440-446.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, García HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MM. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors*. 2013; 6 (1): 313.

Ferreira EC. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências: Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisas René Rachou, 2010.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MM. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol*. 2008; 55(5): 427-35.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology* 2007; 137:1-16.

Fuentes MV, Sainz-Eliphe S, Sáez-Duran S, Galán-Puchades T. Mediterranean ecosystems and preliminar mammal/helminth GIS models. *Revista-Ibero-Latinamericana de Parasitologia* 2009; 1: 46-55.

Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Dasmaceno-Júnior GA. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 175-193.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz 2003; 23-51.

García HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AH, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Hamilton PB, Teixeira MM. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *Int J Parasitol.* 2011b; 41(13- 14): 1385-96.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2294 – 97.

Gardner AL. Feeding habits. In RJ Baker, JK Jones, Jr, DC Carter, *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae, Part III, Spec Publ Mus Texas Tech Univ* 1977; 13: 293-350.

Gardner AL. *Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois, and London, United Kingdom; 1: 669pp.

Gardner RA, Molyneux DH. *Trypanosoma (Megatrypanum) incertum* from *Pipistrellus pipistrellus*: development and transmission by cimicid bugs. *Parasitology* 1988; 96(Pt 3): 433-47.

Gazarini J & Pedro WA. Bats (Mammalia: Chiroptera) in urban fragments of Maringá, Paraná, Brazil. *CheckList* 2013; 9(3): 524-527.

Gazarini J & Takemoto RM. Dados preliminares sobre helmintos parasitos do trato digestório de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Mammalia: Chiroptera) do município de Porto Rico, Paraná, Brasil. *The Biologist (Lima)* 2012; 10: 77.

Gazarini. J, Takemoto. R.M, Gracioli. G; Dados preliminares sobre parasitos de morcegos frugívoros filostomídeos (chiroptera: phyllostomidae) em Porto Rico, Paraná, Brasil: *The Biologist*, ISSN-e 1816-0719, 2012; 10.

Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, da Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 2013; 140: 771-9.

Gonçalves RG, Duarte MA, Ramalho ED, Palma ART, Romana CA, Cuba CA. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em

palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Soc Bra Med Trop* 2004; 37: 241-247.

Gontijo CM, Melo MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7: 338-49.

Gotelli NJ & Colwell RK. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 2001; 4(4): 379-391

Graham GL. Changes in bat species diversity along an elevational gradient up to Peruvian Andes. *Journal of Mammalogy* 1983; 64: 559-571.

Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and antivectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology* 2011; 181: 23-30.

Gregorin R, Taddei VA. Chave artificial para a identificação de Molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Mastozoología Neotropical* 2002; 9 (1): 13-32.

Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. A new species of trypanosome, *Trypanosomadesterrensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitol* 2003; 127: 265-71.

Gupta R & Golding GB. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between Archaeobacteria, Eubacteria and Eukaryotes. *J Mol Evol* 1993; 37: 573-582.

Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol* 2009; 9(1): 81-6.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007; 44: 15–25.

Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol* 2005a; 35(4): 431-43.

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol* 2004; 34(12): 1393-404

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8: 1468–1473.

Heltshel JF & Forrester NE. Estimating species richness using the jackknife estimate procedure. *Biometrics* 1983; 39: 1073-1076.

Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 41(2): 207-12.

Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, Bargues MD. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res* 2009. pii: 897364.

Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourão GM, Jansen AM. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(11): 1133-9.

Hill J, Smith J. *Bats: A Natural History*. Austin: University of Texas Press, 1984.

Hitakarun A, Tan-ariya P, Siripattanapipong S, *et al.* Comparison of PCR methods for detection of *Leishmania siamensis* infection. *Parasites & Vectors* 2014; 7: 458. doi:10.1186/s13071-014-0458-x.

Hoare CA. *The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph*. Systematic. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1972; 2: 123-625.

Hornok S, Kontschán J, Estrada-Peña A, de Mera IGF, Tomanović S, de la Fuente J. Contributions to the morphology and phylogeny of the new ly discovered battick species, *I. xodesariadnae* in comparison with *I. vespertilionis* and *I. simplex*. *Parasites & Vectors* 2015; 8: 47.

Ibrahim ME, Smyth AJ, Ali MH, Barker DC, Kharazmi A. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Tropica* 1994; 57: 327–332.

Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE). Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=31&search=minasgerais> 2010; Acesso em 20 de fev 2012.

Instituto Estadual de Florestas (IEF). Disponível em: <http://www.ief.mg.gov.br/instituicao/281?task=view>. Acesso em: 23 de agosto de 2014.

Instituto nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo2/verProximosDias&code=3143302> 2015; Acesso em 22 de Dez de 2015.

Jansen AM, Roque ALR. Domestic and wild mammalian reservoir. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis Chagas Disease - one hundred years of research. London: Elsevier 2010; 249–276.

Jung K & Kalko EKV. Adaptability and vulnerability of high flying Neotropical aerial insectivorous bats to urbanization. *Diversity and Distributions* 2011; 17(2): 262–274.

Kalko EKV. Diversity in tropical bats. In: Ulrich H, editor. Tropical biodiversity and systematics. Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems. Bonn: Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander König, Bonn 1997: 13–43.

Kassahun A, Sadlova J, Dvorak V, Kostalova T, Frynta D, Aghova T, Yasur-Landau D, Lemma W, Hailu A, Baneth G, Warburg A, Volf P, Votypka J. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta Trop* 2015; 145: 39–44.

Kaye P & Scott P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. *Nature Publishing Group* 2011; 9(8): 604–615. doi:10.1038/nrmicro2608

Khritankov AM & Ovodov ND. Longevity of Brandt’s bats (*Myotis brandii* Eversmann) in Central Siberia. *Plecotus* 2001; 4: 20–24.

Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2): 13-32.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-27.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 517.

Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American J Trop Med and Hyg* 2000; 62: 718-719.

Lamprecht H. *Silvicultura nos trópicos*. Alemanha: Ed. GTZ. Rossdorf 1990; 343pp.

Langourov Vm , Georgieva A , Hubancheva A , Simov N. Two Cases of Myiases Caused by Blowflies (Diptera: Calliphoridae) on Noctule Bats (*Nyctalus noctula* Schreber, 1774) (Chiroptera) in Bulgaria. *Acta zool bulg* 2015; 67 (1): 143-146.

Lent M & Proença MC. Parasito de morcegos no Brasil. *Cimex limai* Pinto. Mem Inst Oswaldo Cruz 1927; 211-215.

Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg 2009; 81(6):1041-1049.

Lima ACS, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FD, Corbett CEP, Floeter-Winter LM, Gomes CMC. Leishmania sp. Identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stores for more than 30 years. Parasitology Research 2011; 108:1525-1531.

Lima IS. Espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. In: Reis, N. R.; Peracchi, A. L. & Santos, G. A. S. D. eds. Ecologia de morcegos. Technical Books 2008; 71-85.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015; 151:166-77.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CSA, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. Parasites & Vectors 2013; 6: 221.

Lima L, Maia da Silva F, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MM. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. Protist 2012; 163: 856-872.

Lima L, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JM, Serrano MG, Cortez AP, Alfieri SC, BuckGA, Teixeira MM. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma* *cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. PlosOne. 2012a; 7(6): e38385.

Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MM. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. Protist 2012b; 163(6): 856-72.

Lima L. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África) Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências 2011.

Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 19-24.

Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 156(3-4): 314-8.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* 2006; 133(Pt 5): 603-11.

Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NR, das Chagas Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop* 2004; 90(1): 97-106.

Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *Plos Pathog* 2009; 5(5): e1000410

Ludwig JÁ, Reynolds JF. *Statistical ecology: a primer on methods and computing*. New York: J. Wiley 1988; 337pp.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort ME & Marzochi MCA. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitology* 2006.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira SA, Figueiredo FB, *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* preferencialmente restrita às lesões cutâneas de cães naturalmente infectados *Parasitol Res* 2005; 97: 73-76.

Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 551-555.

Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphanyo S, Campaner M, Catao-Dias JL, Shaw JJ, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses

support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic at stoprimates. *InfectGenetEvol* 2010; 10(4):522-9.

Maia da Silva F, Marcilli A, Lima L, Cavazzana MJr, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica* 2009; 109: 199–207.

Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D'Affonseca Neto JA, Naiff MF, Franco AM, Campaner M, Valente V, Valente SA, Camargo EP, Teixeira MM, Miles MA. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rain forest. *Acta Trop* 2008; 107(2): 168-73.

Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1145-1149.

Marcili A, Costa AP, Soares HS, Acosta ICL, Lima JTR, Minervino AHH, Melo ALT, Aguiar DM, Pacheco RC, Gennari SM. Isolation and Phylogenetic Relationships of Bats *Trypanosomes* from Different Biomes in Mato Grosso, Brazil. *The Journal of Parasitology*. 2013; 99(6): 1071-6.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MMG. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 2009; 136: 641–655

Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, Souza AI, da Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol* 2009b; 9(6): 1265-74.

Marinkelle CJ. *Trypanosoma (Herpetosoma) longi flagellum* sp n from the tomb rat, *Taphozous nudiventris*, from Iraq. *J Wildl Dis* 1977; 13(3): 262-4.

Martinez E, Thomas MC, Alonso V, Carmelo E, Gonzalez AC, Del Castillo A & Valladares B. Cloning and molecular characterization of the cDNA encoding histone H1 from *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Parasitology* 2002; 88: 199-203.

Marzochi MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In *Grandes Endemias Brasileiras* Universidade de Brasília, 1989.

- Mebrahtu YB, Lawyer PG, Hendricks SL, Muigai R, Oster CN, Perkins PV, Koech DK, Pamba H, Roberts CR. Concurrent infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania major* in a Kenyan patient: Clinical description and parasite characterization. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 290-296.
- Medeellin RA, Arita H & Sánchez-Hernández O. Identificación de los murciélagos de México: claves de campo. México, Asociación Mexicana de Mastozoología, Publicaciones especiales 1997; 2: 89.
- Medeellin RA. *Chrotopterus auritus*. *Mammalian Species*, Washington 1989; 343: 1-5.
- Mello MAR, Schittini GM. Ecological analysis of three bat assemblages from conservation units in the lowland Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Chiroptera Neotropical*, Brasília 2005; 11: 206-210.
- Mendes DG, Lauria-Pires L, Nitz N, Lozzi SP, Nascimento RJ, Monteiro PS, Rebelo MM, Rosa AC, Santana JM, Teixeira ARL. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. *Tropical Medicine and International Health* 2007; 12 (5): 629-636.
- Meyer CFJ & Kalko EKV. Assemblage-level responses of phyllostomid bats to 1 system. *Journal of Biogeography* 2008; 35: 1711-1726.
- Millán J, López-Roig M, Cabezón O, Serra-Cobbo J. Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. *Parasitol Res* 2014; 113: 1993–1995.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 2009; 136(12): 1509-28.
- Miles MA, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, de Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(6):1251-9.
- Molyneux DH. *Parasitic Protozoa. Trypanosomes of bats*. London: Academic Press 1991; 2: 195-223.
- Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 1: 401-404.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: Estudo de

flebotomínios e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais Ver Soc Bras Med Trop 2005; 38(2): 47-52.

Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bat swith emerging deadly viruses?. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2015; 110: 1-22.

Moratelli, R. & Dias, D. 2015. A new species of nectar-feeding bat, genus *Lonchophylla*, from the Caatinga of Brazil (Chiroptera, Phyllostomidae). ZooKeys, 514: 73-91

Muhldorfer K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. Zoonoses and Public Health 2012; 66: 93-103.

Muller MF & NR Reis. Partição de recursos alimentares entre quatro espécies de morcegos frugívoros (Chiroptera, Phyllostomidae). Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba 1992; 9 (3/4): 345-355.

Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDOC: Analysis and visualization of genetic variation. EMBNEW News 1997; 4: 14.

Nogueira MR, Lima IP, Moratelli R, Tavares VC, Gregorin R, Perachhi AL. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. Check List 2014; 10: 808–821.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holpz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosomabinneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wom bats and kangaroos in Australia. Int J Parasitol 1999; 29: 331–339.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holpz P. Corrigendum to “A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia” [International Journal for Parasitology 29 (2) (1999) 331–339]. Int J Parasitol 2000; 30: 228.

Oilveira TMFS, *et al.* Applying conjunctival swab PCR to detection *Leishmania* ssp. in cats. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 2015:2.

Oliveira AP, *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania*(*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G. Journal of Immunological methods, Amsterdam 2013; 387:245-253.

Oliveira FM, Costa LHVC, Barros TL, Ito PKRK, Colombo FA, Carvalho C, Pedro W A, Queiroz LH, Nunes CM. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. Acta Tropica 2015; 150: 176–181.

Oliveira LS, *et al.* A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia 2005; 6: 41-47.

Oprea M, Mendes P, Vieira TB & Ditchfield AD. Do wooded streets provide connectivity for bats in an urban land scape? *Biodiversity and Conservation* 2009; 18: 2361-2371.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Comité de expertos de la OMS sobre rabia: octavo informe. Geneva: OMS 1992.

Pacheco SM, Sodré M, Gama AR, Bredt A, Sanche EMC, Marques RV, Guimarães MM, Bianconi G. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de A o para a Conserva o no Brasil. *Chiroptera Neotropical* 2010; 16: 629-647. Pan American Health Organization (PAHO). Chagas disease 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en>. Acesso em: 16 ago 2015.

Pan American Health Organization (PAHO). Doença de Chagas. Guia para vigilância, preven o, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos 2009; 92pp.

Paparini A, Irwin PJ, Warren K, McInnes LM, de Tores P, Ryan UM. Identification of novel trypanosome genotypes in native Australian marsupials. *Vet Parasitol* 2011; 183(1-2): 21-30.

Patterson BD, Dick CW, Dittmar K. Parasitism by bat flies (Diptera: Streblidae) on neotropical bats: effects of host body size, distribution, and abundance. *Parasitology Research* 2008a; 103: 1091-1100.

Pedrozo AR. Os morcegos frugívoros *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium* apresentam distribui o de atividade similar durante a noite? Uma análise local e regional, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de biologia programa de p s-gradua o em biologia animal 2014.

Peracchi, AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Ort ncio-Filho H. Ordem Chiroptera. In Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (eds.). Mamíferos do Brasil. Londrina: Nélio Roberto dos Reis 2011; 2: 155-234.

Peracchi, AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Ort ncio-Filho H. Ordem Chiroptera. In Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (ed.). Mamíferos do Brasil. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina 2006: 153-230.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with

Leishmania (Viannia) braziliensis in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Acta Trop* 2005; 99: 905-913.

Piscopo TV & Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, Londres 2006; 82: 649-657.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105: 579-585.

Ramirez L, Corvo L, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Santos DM, de Oliveira CI, Escutia MR, Alonso C, Bonay P, Tavares CAP, Coelho EAF & Soto M. Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 Leishmania major ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites & vectors* 2014; 7: 3.

Rangel EF & Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(7): 937-954.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, EF, Lainson R (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003: 291–310.

Ribeiro-Romão RP., Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM and Pinto EF: Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different Leishmania (Viannia) braziliensis Concentrations: *Infect. Immun.* 2014; 82(12):5203.

Reis NR, Fregonezi MN, Peracchi AL, Shibatta OA. *Morcegos do Brasil: guia de campo*, Rio de Janeiro. Technical Books Editora 2013; 252.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: 2011; 2: 439.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA & Lima IP. *Morcegos do Brasil*, Londrina 2007.

Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 1987; 32: 463-478.

Rios GFP, Arruda-Filho JF, Reis-Júnior G, Oliveira HMF, Carmo TNN, Moraes CGP, Sá - Neto RJ. Estrutura da comunidade de morcegos (mammalia: chiroptera) da Floresta

Nacional Contendas do Sincorá-Bahia: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

Rizzini CT. Tratado de Fitogeografia do Brasil, aspectos ecológicos. Hucitec Edusp 1976; 1:13-32.

Rocha MF. Validação de teste rápido para detecção de anticorpos anti-*Leishmania donovani* (TRALd) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Tese de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP 2002.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990; 71: 267-275.

Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 2006; 132: 215-24.

Roque ALR. Avaliação do potencial de pequenos mamíferos e importância de animais domésticos na manutenção dos ciclos de transmissão de tripanosomatídeos: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania Braziliensis*. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ 2009.

Roque ALR, Cupolillo & Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4: e589.

Roque ALR e Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014; 251–262.

Roque ALR, Jansen AM. The importance of sentinel domestic animals to identify risk areas to the emergence of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41(Supl III): 191-193.

Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosomacruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 742–749.

Rotureau B, Catzefflis F, Carme B. Short report: absence of *Leishmania* in Guianan bats. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 318–321.

Rydell J. Exploitation of insects around streetlamps by bats in Sweden. *Functional Ecology* 1992; 6: 744-750.

Sabino-Santos G, Maia FGM, Vieira TM, de Lara Muylaert R, Lima SM, Gonçalves C B & Figueiredo LTM. Evidence of Hantavirus Infection Among Bats in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 93(2): 404-406.

Sá-Júnior A, Carvalho LG, Silva FF & Alves MC. Application of the Köppe classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. *Theoretical and Applied Climatology* 2012; 108: 1–7. DOI: 10.1007/s00704-011-0507-8.

Sampaio EM, Kalko EKV, Bernard E, Rodriguez-Herrera B & Handley Jr CO. A biodiversity assessment of bats (Chiroptera) in a tropical lowland rainforest of central Amazônia, including methodological and conservation considerations. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 2013; 38 (1): 17-31.

Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin ADF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol* 2007; 150: 283–290.

Santos CP & Gibson DI. Checklist of the Helminth Parasites of South American Bats *Zootaxa* 2015; 3937 (3): 471–499.

Santos RM, Vieira FA, Gusmão E, Nunes YRF. Florística e estrutura de uma floresta estacional decidual, no Parque Municipal da Sapucaia, Montes Claros (MG). *Cerne* 2007; 13(3): 248-256.

Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 56-6

Sato TM, Passos FC & Nogueira FC. Frugivoria de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em *Cecropiapachystachya* (Urticaceae) e seus efeitos na germinação das sementes. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo* 2008; 48: 19-26.

Savani ESMM, Almeida MF, Camargo MCGO, D'auria SRN, Silva MMS, Oliveira ML, Sacramento D. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* in Brazilian bats. *Vet Parasitol* 2010; 168 (6):1-2.

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IMN, Camargo MCGO, D'auria SRN, Floeter-Winter LM. Occurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2005; 100(7): 739-741, 2005.

Scheffer KC, Carriere ML, Albas A, Santos HCP, Kotait I & Ito FH. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública* 2007; 41: 389-395.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Shweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infec Dis* 2003; 47: 349–358.

Schubach TMP, *et al.* American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; 98: 165-163.

Secretaria Municipal de Desenvolvimento Econômico, Turismo, Ciência e Tecnologia – Dados gerais da cidade de Montes Claros 2011. Disponível em: http://www.montesclaros.mg.gov.br/desenvolvimento%20economico/div_indcom/pdf/Dados%20Gerais%20da%20cidade%20de%20Montes%20Claros.pdf. Acesso em: 12 de dez. 2011.

Shapiro JT, da Costa MS, Dorval ME, de Oliveira A, Cepa F, Bordignon MO. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Actatropica* 2013; 128 (1): 171-174.

Sharma U & Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 255-272.

Shaw JJ. The leishmaniasis, survival and expansion in a changing world. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102: 541-547.

Schönian G. Manual Molecular Procedures. Course Molecular Epidemiology 2009. Disponível em: <http://clioc.fiocruz.br/documents/mmp.pdf> *Training* Acessado em: 10 dez 2015.

Schonian GK, Kuhls K & Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 2011; 138:405-425. doi:10.1017/S0031182010001538.

Silva AVM, de Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad Saúde Pública* 2005; 21:1: 324-328.

Silva DA, Perié CFD, Junior AAVM, Madeira MF, Figueiredo FBO. Leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – Relato de caso. *Revista clínica veterinária* 2011; 95: 65-68.

- Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12): 550-552.
- Silva MMS, Harman I, Gonçalves EFB & Uieda W.. Bats from the metropolitan region of São Paulo, southeastern Brazil. *Chiropt. Neotrop* 1996b; 2: 39-41.
- Silveira AC. O inquérito triatomínico (1975-1983). *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44: 26-32.
- Simmons NB. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM (Eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore: John Hopkins University Press 2005; 1: 312-529.
- Simões-Mattos L, Bevilaqua CML, Mattos MRF, Pompeu MML. Feline leishmaniasis uncommon or unknown? *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2004; 99: 78-87.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22(4): 168-74.
- Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Thompson RC. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol* 2008; 135(11): 1329-35.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(5): 1383-7.
- Souto Jr JV, Ribeiro MAA. Saúde e Vida On Line / Tripanossomíase canina [on line]. Out. 2002. [cited 15.06.2004] <http://www.nib.unicamp.br/svol/chagas.htm>.
- Souza TD, Turchetti AP, Fujiwara RT, Paixão TA, Santos RL. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet Parasitol* 2014; 200: 233-241.
- Steindel M, Grisard EC, Carvalho Pinto CJ, Cordeiro FD, Ribeiro- Rodrigues R, Romanha AJ. Characterization of trypanosomes from the Subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats *Eptesicus* sp.(Chiroptera: Vespertilionidae) captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol* 1998; 84: 601-7.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 2008; 15(3): 226-32.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 2001; 48:1-56.

Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LEH, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Inter J Parasitol* 1999a; 29:749-57.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 1999b; 118:107-16.

Straube FC & Bianconi GV. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes de neblina. *Chiropt Neotrop* 2002; 8(1-2): 150-152.

Tavares C, Gregorin R & Peracchi AL. Diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In *Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação* (Pacheco SM, Marques RV & Esberard CEL, orgs.). Armazém Digital, Porto Alegre 2008; 25-58.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic Validation of the Genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids Harboring Bacterial Endosymbionts with the Description of New Species of Trypanosomatids and of Proteobacterial Symbionts. *Protist* 2011. (*In press*)

Teixeira MM, Serrano MG, Camargo EP. New data from old Trypanosomatid preparations. *Parasitol Today* 2000; 16(6): 261-63.

Tencate LC, Táparo CV, Carvalho C, Bosco SMG, Queiroz LH, Silva DC, Perri SHV & Marinho M. Estudo da microbiota fúngica gastrointestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2012; 49(2): 146–152.

Thomas ME, Rasweiler IV JJ, D'Alessandro A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5): 559-65.

Timm RM, Laval RK, Hooper-Jr ED. A field key to the bats of Costa Rica. Occasional Publications Series, University of Kansas, Center of Latin American Studies 1998; 22: 1-30.

Timm RM. The mammal fauna: La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rainforest (LA McDade, KS Bawa HA Hespdenheide e GS Hartshorn, eds.). University of Chicago Press 1994; 229-237.

Travi BL, Osorio Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1998; 88:73–75.

Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 61: 23-30.

Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1995; 29: 393-397.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(3): 291-297.

Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, Lopes UG. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 158-164.

Ventura RM, Paiva F, Silva RMS, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol* 2001; 99: 37-8.

Vexenat JÁ, Barretto AC, Cuba-Cuba C & Marsden PD. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1986a; 81: 293-301.

Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic Press 1976; 1-34.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 2000; 2:7-12.

Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n sp From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J Eukaryot Microbiol* 2009a; 56(6): 594-602.

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. *Parasitology* 2009b; 136: 55-65.

Viola LB, Campaner M, Takata CSA, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of Snake Trypanosomes Inferred by SSU rDNA Sequences, their Possible Transmission by Phlebotomines, and Taxonomic Appraisal by Molecular, Cross-Infection and Morphological Analysis. *Parasitology* 2008; 135(5): 595-605.

Votypka

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol* 1966; 18:124-93

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005; 171(2): 527-43.

Willig MR, Presley SJ, Owen PD & Lopez-Gonzalez C. Composition and structure of bat assemblages in Paraguay: A subtropical-temperate interface. *Journal of Mammalogy* 2000; 81 (2): 386-401.

World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis) 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 16 set. de 2015.

World Health Organization (WHO) 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf> Acesso em: 27-05-2014

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 2005; 35(2): 225-33.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 2012; 12(2):240-53.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 1051-105.

Zortéa M, Alho CJR. Bat diversity of a Cerrado habitat in Central Brazil. *Biodiversity and Conservation* 2008; 17(4): 1 – 15.

Zortéa M, Chiarello AG. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in a urban reserve of south-east Brazil. *Mammalia* 1994; 58 (4): 665-670.