

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Primatas não-humanos como indicadores da diversidade de
Kinetoplastida em fragmentos florestais urbanos no município
de Campo Grande/MS

Autor: Oscar Fernandes Júnior
Orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera
Coorientador: Dr. André Luiz Rodrigues Roque
Coorientador: Dr. Filipe Martins Santos

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2023

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Primatas não-humanos como indicadores da diversidade de
Kinetoplastida em fragmentos florestais urbanos no município
de Campo Grande/MS

Autor: Oscar Fernandes Júnior
Orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera
Coorientador: Dr. André Luiz Rodrigues Roque
Coorientador: Dr. Filipe Martins Santos

"Tese apresentada, como parte das exigências para
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE
AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Ambientais e
Sustentabilidade Agropecuária da Universidade
Católica Dom Bosco - Área de concentração:
"Sustentabilidade Ambiental e Produtiva" Aplicada a
"Saúde, Ambiente e Sustentabilidade"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2023

F363p Fernandes Júnior, Oscar

Primatas não-humanos como indicadores da diversidade de Kinetoplastida em fragmentos florestais urbanos no município de Campo Grande/MS/ Oscar Fernandes Júnior sob orientação do Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera; Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque e Prof. Dr. Filipe Martins Santos.-- Campo Grande, MS : 2023.
148 p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande- MS, 2023

Bibliografia: p. 49- 97

1. Tripanossomatídeos. 2. Sistema reservatório. 3. Fragmentos urbanos. 4. Sapajus cay. 5. Alouatta caraya I. Herrera, Heitor Miraglia. II. Roque, André Luiz Rodrigues. III. Santos, Filipe Martins. IV. Título.

CDD: 577.3



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Primatas não-humanos como indicadores da diversidade de Kinetoplastida em fragmentos florestais urbanos no Centro-Oeste do Brasil

Autor: Oscar Fernandes Júnior

Orientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Coorientador: Prof. Dr. Filipe Martins Santos

TITULAÇÃO: Doutor em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária
Área de Concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADO em 07 de agosto de 2023

A presente defesa foi realizada presencialmente. Eu, Heitor Miraglia Herrera, como presidente da banca assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros, ainda na presença destes.

Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera – UCDB

Prof. Dr. Filipe Martins Santos – UCDB

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira – UCDB

Profa. Dra. Paula Helena Santa Rita – UCDB

Profa. Dra. Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa – UCDB

Prof. Dr. Sávio Freire Bruno – UFF

EPÍGRAFE

“Devemos cuidar dos primatas com afeto,
Garantindo um futuro mais brilhante.
Preservar seu habitat é fundamental,
Para que sua beleza continue a encantar.
Os primatas ensinam importantes lições,
Sobre amor, família e sobrevivência.
São um recurso natural de imenso valor,
E merecem nosso amor e dedicação.”

Oscar Fernandes Júnior

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oscar Fernandes e Ívina de Souza Fernandes e a minha tia Laurentina Aparecida Fernandes de Souza, que me ensinaram a seguir e realizar tudo aquilo que sonhamos e acreditamos, sem o apoio incondicional que vocês me ofereceram ao longo desta jornada acadêmica, não teria alcançado o tão almejado título de Doutor em Ciências. Também expresso meu profundo agradecimento aos primatas por me permitirem adentrar em seu mundo novamente, a fim de descobrir algo de fundamental importância para a pesquisa científica, muito obrigado por mais essa oportunidade valiosa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Professor Dr. Heitor Miraglia Herrera, expresso minha profunda gratidão pelo seu consentimento em me orientar, mesmo diante da minha inexperiência em biologia parasitária (tripanosomatídeos). Agradeço pelos valiosos ensinamentos, paciência, compreensão, empenho e preocupação demonstrados para que eu pudesse ser contemplado com uma bolsa integral, permitindo-me dedicar exclusivamente ao curso. Além disso, sou grato pelo apoio constante, especialmente nos momentos mais desafiadores da pesquisa. Agradeço por me proporcionar uma nova oportunidade de estudar os primatas, um táxon que sempre me fascinou desde a infância, explorando assim uma área de conhecimento distinta. Sou eternamente grato a você pela oportunidade concedida de cursar um doutorado sob sua orientação. Muito obrigado por compartilhar generosamente seu precioso conhecimento.

Agradeço ao Professor Dr. André Rodrigues Roque, por aceitar ser coorientador e por investir nos testes diagnósticos de NGS (Sequenciamento de Nova Geração) para cada amostra, além de sua valiosa contribuição na revisão final da tese e nas sugestões referentes ao artigo final. À professora Dr^a Ana Maria Jansen, expresso minha gratidão pelas reuniões esclarecedoras e sugestões durante a análise dos resultados da tese.

Meus agradecimentos ao Doutor Filipe Martins Santos pela coorientação, sua prontidão em auxiliar na elaboração dos relatórios, indicação de trabalhos relacionados à pesquisa, sua motivação constante e contribuição na redação final da tese, foi de extrema importância, muito obrigado. Também expresso minha profunda gratidão à amiga Dr^a Grasiela Porfírio que também trabalhou assim como você no meu primeiro artigo, que abordou os resultados do mestrado. Sou imensamente grato pela amizade, companhia e apoio ao longo de todo o curso.

Expresso minha gratidão à amiga Dr^a Nayara Yoshie Sano. Agradeço pela amizade, pelas extensas conversas sobre a elaboração e redação dos artigos, e pela sua paciência incansável ao corrigir várias vezes nosso artigo sobre a predação

de roedores por macacos-prego. Além disso, agradeço a orientação no cultivo das plantas carnívoras que gentilmente me presenteou. Muito obrigado por tudo.

Minha gratidão aos amigos Doutorando Wesley Arruda G. Nantes, Sany C. Liberal e ao aluno de mestrado Arthur Martinelli pela valiosa colaboração na extração de DNA, realização de PCR no laboratório de Biologia Molecular e cultivo no Laboratório de Biologia Parasitária. Além disso, agradeço novamente a Sany, Wesley e Carol P. dos Santos pela assistência na indicação de trabalhos relacionados a testes diagnósticos, pelo esclarecimento sobre diagnósticos como NGS e pela árdua tarefa de me ajudar a compreender o gene ribossomal 18S. Agradeço sinceramente pelo apoio inestimável no campo da Biologia Molecular.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos Drs. médicos Vet. Gabriel C. de Macedo, Wanessa Teixeira G. Barreto e ao Doutorando William Assis e a bióloga mestre Andreza Rucco pelo amor e cuidado com que trataram os primatas durante todo o processo de coleta de material biológico, bem como na adequação do protocolo anestésico. Independentemente das condições climáticas, vocês se mantiveram firmes e garantiram que nenhum dos macacos sofresse qualquer tipo de lesão ou fosse liberado das gaiolas antes que o efeito anestésico estivesse completamente dissipado. Parablenzo ambos por serem excelentes médicos veterinários de animais silvestres. Foi uma experiência fantástica trabalhar ao lado de vocês.

Agradeço imensamente ao IMASUL/MS, em especial à Katiúscia Balbuena Coene, gestora da Unidade de Conservação Parque Estadual Matas do Segredo (PEMS), e ao Guarda-parque Luís Armando A. Matas, por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário para o sucesso da campanha, inclusive auxiliando na remoção das gaiolas. Esse precioso apoio foi fundamental, e sem ele, certamente não teríamos obtido êxito. Expresso também minha gratidão ao Veterinário Lucas Cazati, responsável pelo Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), e ao Biólogo Allyson C. Favero, também do CRAS. Agradeço por nos receberem sempre com muita educação e alegria, fazendo-nos sentir em casa. O apoio valioso de vocês foi fundamental para o nosso trabalho.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, muitos dos quais também foram meus

professores durante a graduação em Ciências Biológicas na mesma instituição. Foi uma honra apreciar novamente suas excelentes aulas. Gostaria de expressar minha gratidão especial à Prof^a Dr^a Carina Elisei de Oliveira, em momentos de dúvida sobre *Leishmania*, sempre recorri à sua sala para esclarecer minhas questões e ouvir seu ponto de vista sobre o assunto. Sua gentileza, educação e capacidade de esclarecimento foram inestimáveis para mim. Muito obrigado, professora!

Aos amigos Dr. Breno Emmanuel, Dr. Alanderson Rodrigues, as doutorandas Julia Pistori, Amanda C. Rodrigues, Valentina N. Marín e o Mestre Lincoln T. H. Mukoyama, expresse minha sincera gratidão por suas contribuições ao longo do curso. Cada um de vocês desempenharam um papel importante, seja esclarecendo questões relacionadas a testes diagnósticos, leituras de lâminas, auxiliando na elaboração de mapas, compartilhando ideias para redações e apresentações em PowerPoint. Agradeço do fundo do coração a todos vocês.

Sou agradecido ao meu cunhado Jefferson da Silva Mendes, à minha irmã Ana Cristina de Souza Fernandes e à sobrinha Ana Beatriz Fernandes, ao tio Sr. Joaquim e à Dirce, que estiveram sempre ao meu lado nos momentos bons e nos difíceis durante esta jornada acadêmica tão importante. Muito obrigado!

Meus agradecimentos ao coordenador Prof. Dr. Denilson de Oliveira Guilherme e as secretárias do programa Pós-graduação em Ciências Ambientais e sustentabilidade Agropecuária, Daiane D. Oliveira pela atenção despendida aos alunos e rapidez no atendimento.

Agradeço à Capes e a Universidade Católica Dom Bosco-UCDB pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Oscar Fernandes Júnior, nascido em Jardim, Estado de Mato Grosso do Sul no dia 16 de Julho de 1976, Filho de Oscar Fernandes e Ívina de Souza Fernandes. O autor deste trabalho é Bacharel e Licenciado em Biologia no ano de 2006, pela Universidade Católica Dom Bosco-UCDB. Enquanto na graduação participou do Programa de Iniciação Científica Pibic/CNPq/UCDB ao longo dos anos de 2001/2002; 2002/2003; 2003/2004 e 2004/2005, atuando na área de comportamento e ecologia dos Sagui-de-tufos-preto (*Callithrix penicillata*) e Macacos-prego (*Sapajus cay*). Concluiu o curso de mestrado em Biologia Animal no ano de 2013, pela Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, observando o comportamento alimentar dos Macacos-prego (*Sapajus cay*) na região de Guia Lopes da Laguna-MS. Ingressou no Doutorado em Março/2019, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco, com área de concentração: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVO.....	16
Objetivo Geral.....	16
Objetivos específicos	16
Hipóteses.....	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1. Ordem Kinetoplastida.....	17
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> : hospedeiros e linhagem (DTUs).....	19
1.2 <i>Leishmania</i> spp. em diferentes espécies e hospedeiros.....	21
2. Ferramentas para investigação de Tripanossomatídeos.....	25
2.1 Diagnósticos Parasitológicos.....	25
2.2 Detecção Molecular.....	26
2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	28
2.4 Testes Sorológicos.....	30
3. Primatas-não-Humanos Neotropicais.....	31
4. PNH em Fragmentos Urbanos.....	33
4.1 <i>Sapajus cay</i>	34
4.2 <i>Alouatta caraya</i>	36
5. Infecções por Tripanossomatídeos em PNH	40
5.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> em PNH.....	42

5.2	<i>Trypanosoma rangeli</i> em PNH.....	43
5.3	<i>Trypanosoma lainsoni</i> em PNH.....	43
5.4	<i>Trypanosoma minasense</i> em PNH.....	44
5.5	<i>Leishmania infantum</i> em PNH	45
5.6	<i>Leishmania amazonenses</i> em PNH.....	47
6.	Conclusão	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	CAPÍTULO 1.....	98
	1. Introduction	99
	2. Material and methods	102
	2.1 Study areas.....	102
	2.2 Capture procedures.....	102
	2.3 Biological sample collection.....	104
	2.4 Parasitological test.....	104
	2.5 Serological Diagnosis.....	105
	2.6 Molecular tests.....	105
	2.7 Statistical analysis.....	106
	2.8 Bioinformatic analysis.....	107
	2.9 Phylogenetic analysis.....	107
	3. Results	108
	4. Discussion	115
	5. Conclusions	121
	6. References	121

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principais formas evolutivas de protozoários da família Trypanosomatidae: (a) epimastigota; (b) tripomastigota; (c) promastigota; (d/h) opismastigota; (e) coanomastigota; (f) amastigota; (g) esferomastigota (extraído de D’ávila-Levy et al., 2015).	18
Figura 2. Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos (Fonte: VULTÃO, 2017).	27
Figura 3. Ilustração do fluxo de trabalho sequenciamento de nova geração (NGS) para o genoma mitocondrial. As etapas de 1 a 7 são a fase de identificação de espécies e sequenciamento de alto rendimento e as etapas de 8 a 11 são a fase de bioinformática. Etapa 1-4 é à identificação da espécie de parasito, 5 é a amplificação por PCR, 6 é o agrupamento de amplicons de PCR, 7 é o sequenciamento, 8 é o controle de qualidade, 9 é a montagem das leituras, 10 é a anotação e 11 é o mapeamento e análise posterior do anotado genoma (extraído de JEX <i>et al.</i> , 2010).	29
Figura 4. Distribuição geográfica do gênero <i>Sapajus</i> (robusta) segundo Alfaro e colaboradores (2011).	35
Figura 5. Distribuição brasileira do <i>Alouatta caraya</i> . Fonte: ICMBIO acesso em: 12/12/2022.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.....	Anticorpo
Ag.....	Antígeno
ASV.....	Amplicon Sequence Variant
BEAST.....	Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees v2.6.2
BLAST.....	Alignment Search Tool
CRAS.....	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DTH.....	Delayed-type hypersensitivity
DTU.....	Discrete typing units
EDTA.....	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA.....	Imunoabsorção enzimática
HSP70.....	Proteína de choque térmico 70
IFAT.....	immunofluorescence antibody test
IgG.....	peroxidase-conjugated antibodies
ISV.....	Instituto São Vicente (Lagoa da Cruz)
kDNA.....	DNA do cinetoplasto
LC.....	Leishmaniose cutânea
LSU.....	Subunidade maior do RNA
LV.....	Leishmaniose visceral
MCL.....	Leishmaniose Mucocutânea
MCMC.....	Markov chain Monte Carlo
Mg/kg.....	Miligramas por quilo
NaCl.....	Cloreto de Sódio
NG.....	Nanogramas
NGS.....	Sequenciamento de Nova Geração
NNN/LIT.....	NNN(Neal, Novy, Nicolle) / Lit(Liver Infusion Triptose)
NNN+Schneider..	NNN(Neal, Novy, Nicolle) / Schneider(ágar-sangue)

nPCR.....	A nested-PCR (nPCR)
OD.....	Optical Density
PB.....	Pares de base
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PEMS.....	Parque Estadual Matas do Segredo
PI.....	Pós-infecção
PNH.....	Primatas não-humanos
rDNA.....	DNA ribossômico
RIFI.....	Reação de imunofluorescência indireta
RNA.....	ácido ribonucleico
rRNA.....	ácido ribonucleico ribossômico
SSU.....	Subunidade menor do RNA
WRC.....	Wildlife Rehabilitation Center

RESUMO

O município de Campo Grande (CG), Mato Grosso do Sul (MS), abriga diversas espécies de mamíferos silvestres. Algumas espécies como o quati (*Nasua nasua*), gambá (*Didelphis albiventris*) e os morcegos têm sido relatados infectados por diferentes espécies de tripanossomatídeos. Entre as espécies de mamíferos silvestres destacamos os primatas que são encontrados naturalmente parasitados por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. Neste contexto, objetivamos avaliar as infecções naturais por tripanossomatídeos em *Sapajus cay* e *Alouatta caraya* em CG/MS. Para isto foram capturados animais em três áreas urbanas: (i) uma Unidade de Conservação, Parque Estadual Mata do Segredo (PEMS); (ii) área antropizada, Instituto São Vicente (ISV); e (iii) Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS). Após sedação e avaliação clínica, coletamos sangue total para cultura e testes moleculares (nPCR e Next Generation Sequencing). Foram realizados testes sorológicos para detecção de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. Foram obtidas 55 amostras, com cinco recapturas de 11 *S. cay* no ISV (F=2 recapturas), 27 *S. cay* no PEMS (F=2 e M=1 recapturas) e oito *S. cay* e quatro *A. caraya* no CRAS. Detectamos tripanossomatídeos em 37/55 (67,3%) das amostras. As análises de sequenciamento de DNA foram realizadas por NGS e realizadas em 32 amostras positivas em nPCR, sendo identificadas as seguintes espécies *T. cruzi*, *T. minasense*, *T. rangeli*, *L. infantum* e *L. amazonensis* – espécies já registradas em primatas na América Latina. Pela primeira vez foi detectado em PNH *T. lainsoni*, parasito relacionado a pequenos mamíferos, e *Trypanosoma* spp. DID, originalmente reportado em marsupiais do gênero *Didelphis*. A detecção de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi* TcII em *S. cay* nas três áreas amostradas, bem como em *A. caraya* do CRAS, indica que essas espécies de protozoários importantes na saúde pública encontram-se dispersos nos fragmentos florestais de CG. A detecção de *T. cruzi* TcIV e *T. minasense* nas áreas de conservação do PEMS e CRAS, reforça estudos prévios de que esses genótipos estariam associados ao extrato arbóreo. Com os resultados obtidos observou-se que o uso de diferentes *templates*, como sangue total, coágulo e medula, aumenta a capacidade de detectar espécies de tripanossomatídeos e, portanto, devem ser usados em conjunto em estudos epidemiológicos. Também, como não encontramos diferenças na detecção de tripanossomatídeos de acordo com o sexo, sugerimos que fragmentos florestais urbanos podem estar modificando o comportamento natural dos primatas não-humanos (PNH).

Palavras-chave: Tripanossomatídeos, sistema reservatório, fragmentos urbanos, *Sapajus cay*, *Alouatta caraya*.

ABSTRACT

The municipality of Campo Grande (CG), Mato Grosso do Sul (MS), is home to several species of wild mammals. Some species such as coati (*Nasua nasua*), opossum (*Didelphis albiventris*) and bats have been reported infected by different species of trypanosomatids. Among the species of wild mammals, we highlight the primates that are found naturally parasitized by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. In this context, we aimed to evaluate natural trypanosomatid infections in *Sapajus cay* and *Alouatta caraya* in CG/MS. For this purpose, animals were captured in three urban areas: (i) a Conservation Unit, Parque Estadual Matas do Segredo (PEMS); (ii) anthropized area, Instituto São Vicente (ISV); and (iii) Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (WRC). After sedation and clinical evaluation, we collected whole blood for culture and molecular tests (nPCR and Next Generation Sequencing). Serological tests were performed to detect *T. cruzi* and *Leishmania* spp. 55 samples were obtained, with five recaptures of 11 *S. cay* at ISV (F=2 recaptures), 27 *S. cay* at PEMS (F=2 and M=1 recaptures) and eight *S. cay* and four *A. caraya* at WRC. We detected trypanosomatids in 37/55 (67.3%) of the samples. DNA sequencing analyzes were performed by NGS and performed on 32 nPCR positive samples, the following species have been identified *T. cruzi*, *T. minasense*, *T. rangeli*, *L. infantum* e *L. amazonensis* – species already recorded in primates in Latin America. For the first time, it was detected in PNH *T. lainsoni*, a parasite related to small mammals, and *Trypanosoma* spp. DID, originally reported in marsupials of the genus *Didelphis*. The detection of *L. infantum*, *L. amazonensis* and *T. cruzi* TcII in *S. cay* in the three sampled areas, as well as in *A. caraya* from WRC, indicates that these species of protozoa important in public health are dispersed in the forest fragments of CG. The detection of *T. cruzi* TcIV and *T. minasense* in the PEMS and WRC conservation areas reinforces previous studies that these genotypes would be associated with the arboreal extract. With the results obtained, it was observed that the use of different *templates*, such as whole blood, clot and marrow, increases the ability to detect trypanosomatid species and, therefore, should be used together in epidemiological studies. Also, as we found no differences in the detection of trypanosomatids according to gender, we suggest that urban forest fragments may be modifying the natural behavior of non-human primates (NHP).

Keywords: Trypanosomatids, reservoir system, urban fragments *Sapajus cay*, *Alouatta caraya*.