



Levantamento exploratório da infecção por *Trypanosoma cruzi* em carnívoros (*Urocyon cinereoargenteus* e *Spilogale angustifrons*) de Yucatan, México

Jesus Guadalupe Interian-Aguiñaga¹, Francisco Javier Escobedo-Ortegón¹, José Leonardo Guillermo-Cordero², Hugo Antonio Ruiz-Piña^{1*}

¹Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

RESUMO

OBJETIVO

Foi realizado estudo exploratório para determinar a infecção por *Trypanosoma cruzi* na raposa cinza (*U. cinereoargenteus*) e no gambá manchado do sul (*S. angustifrons*) em Yucatán, México.

MÉTODOS

Usamos amostras de vários órgãos (coração, músculo esquelético, rim, baço, fígado, esôfago e estômago), correspondente a indivíduos de raposa cinzenta e gambá manchado, capturados no peridomicílio de oito localidades rurais de Yucatán entre o período de 1990-2008. A presença de DNA de *T. cruzi* em amostras de tecido foi determinada pelas técnicas PCR e exames histopatológicos.

RESULTADOS

Todos os indivíduos estudados tinham pelo menos uma amostra de tecido com DNA de *T. cruzi*. O esôfago (9/13), o coração (7/13) e o músculo esquelético (6/13) foram os órgãos com maior frequência de DNA de *T. cruzi*. Não foram encontrados ninhos de amastigotas, no entanto, a observação microscópica revelou lesões características da infecção por *T. cruzi*, como infiltração inflamatória por linfócitos e histiocitos com ou sem necrose de células cardiomiócitos, e proliferação de fibroцитos, fibroblastos e fibras de colágeno (fibrose).

CONCLUSÕES

Os resultados confirmam que esses dois carnívoros selvagens são hospedeiros naturais do *T. cruzi* em Yucatán, México. O comportamento sinantrópico desses dois mamíferos em Yucatán torna necessário focar estudos futuros sobre seu papel dentro do ciclo de transmissão peridomiciliar rural do *T. cruzi* na Península de Yucatán.

DESCRITORES

Urocyon, *Spilogale*, Carnívoros, *Trypanosoma cruzi*, PCR, Histopatologia, Yucatán.

Autor correspondente:

Hugo Antonio Ruiz-Piña.

Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán. Avenida Itzáes N. 490 x 59, C.P. 97000. Col. Centro, Mérida, Yucatán, México.

Email: rpina@correo.uady.mx

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3080-1752>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi, é um protozoário flagelado que infecta naturalmente cerca de 180 espécies de mamíferos¹. Em ambientes domésticos e peridomésticos, os principais hospedeiros do parasito, são cães e uma grande variedade de animais, especialmente marsupiais e roedores, que desempenham papel epidemiológico muito importante na transmissão do parasito¹. Em ambientes selvagens, tatus, marsupiais, roedores e morcegos são os hospedeiros naturais de *T. cruzi*. No entanto, estudos recentes mostram elevada prevalência de infecção natural por *T. cruzi* em carnívoros, tais como guaxinins (*Procyon lotor*), coiotes (*Canis latrans*), raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*), lincês (*Lynx rufus*) e guatis (*Nasua nasua*), sugerindo a importância dos carnívoros na manutenção do ciclo selvagem de *T. cruzi*².

O estado de Yucatan/México, é considerado área endêmica da doença de Chagas³, onde várias espécies de mamíferos selvagens foram encontradas naturalmente infectadas com *T. cruzi*, entre as quais, a espécie *Didelphis virginiana* é considerada importante reservatório no ciclo de transmissão peridomiciliar do parasito⁴⁻⁷. Em Yucatan, a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*), o gambá (*Spilogale angustifrons*), e, em menor grau, o quati (*Nasua narica*) e o guaxinim (*Procyon lotor*) são carnívoros, frequentemente observados nos quintais das casas rurais, principalmente onde agricultura está presente⁸. A observação da vida selvagem no ambiente humano Yucatecan é cada vez mais frequente, tanto em locais rurais como urbanos, provavelmente devido ao crescimento e desenvolvimentos urbanos e comerciais. A presença de raposas cinzentas e gambás é um fenômeno que deve ser investigado tanto em termos do impacto ecológico como do risco de transmissão de agentes zoonóticos patogênicos.

O presente estudo objetivou explorar a presença da infecção por *T. cruzi* em amostras biológicas preservadas de um banco de amostras de tecidos de carnívoros sinantrópicos, para obter informação inovadora sobre hospedeiros naturais de *T. cruzi*, contribuindo para o conhecimento do papel dos mamíferos selvagens no ciclo de transmissão de *T. cruzi* em áreas de florestas tropicais do México.

MÉTODOS

Área do estudo

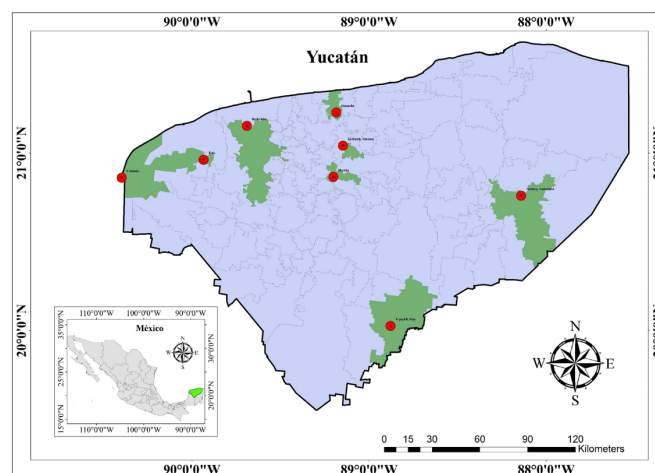
O estado de Yucatan está localizado no extremo norte da Península de Yucatan, no sudeste do México (19° 29' e 21° 37' de latitude norte e 87° 32' e 90° 25' de longitude oeste). Faz fronteira ao norte com o Golfo do México, a leste e sudeste com Quintana Roo, e a oeste e sudoeste com Campeche.

Amostras biológicas

Foram utilizadas cinquenta amostras de tecidos de coração, músculo, baço, fígado, rim, esôfago e estômago de 10 indivíduos adultos de *U. cinereoargenteus* (41 amostras), 2 indivíduos adultos e um indivíduo jovem de *S. angustifrons* (nove amostras). Todas as amostras foram obtidas do banco de amostras biológicas do Laboratorio de Zoonosis y Otras ETV's do Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" da Universidad Autónoma de Yucatán. Este banco armazena diferentes tipos de amostras biológicas obtidas de mamíferos capturados de diferentes projetos de investigação realizados entre o período 1990-2008 em quintais domésticos de localidades rurais no estado de Yucatán.

As amostras selecionadas para o estudo, provêm de carnívoros selvagens recolhidos em diferentes localidades rurais (Figura 1), e todas elas foram conservadas em cubos de parafina e preparados de seções histológicas coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E).

Figura 1. Localização geográfica das localidades rurais do estado de Yucatan onde foram capturados os animais cujas amostras foram analisadas neste estudo.



Diagnóstico por PCR de infecção por *Trypanosoma cruzi*

Para extração de DNA a partir de amostras de parafina, foram obtidas seções de cinco µm de espessura com a ajuda de microtomo e colocadas em tubos de microcentrifugação de 1,5 mL. A parafina foi retirada por lavagens consecutivas de xileno, etanol a 100%, etanol a 70%, e água destilada (20 min cada). Subsequentemente, 200 µl de tampão de lise (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 0,5% SDS) e Proteinase K (10 µg/ml) foram adicionados em cada amostra e incubados a 60 °C durante pelo menos duas horas e meia⁹. A extração e purificação do DNA, foi concluída pelo sistema de extração semi-automatizado Maxwell® 16 e utilizando o Kit de Purificação de DNA FFPE Tissue LEV (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Para extração de DNA a partir de preparações histológicas coradas, foram obtidos tecidos a partir de preparações histológicas coradas por H&E, os fragmentos de tecido foram removidos manualmente das lâminas utilizando borda de bisturi para cada amostra. Subsequentemente, as amostras retiradas foram desparafinizadas por lavagens consecutivas com xileno, etanol a 100%, etanol a 70% e água destilada durante 10 minutos para cada solução. Finalmente, as amostras foram deixadas a secar durante 20 minutos à temperatura ambiente e foram colocadas em tubos PCR de 200 µl e depois para a sua conservação em congelamento a -20 °C até à sua análise^{10,11} (ver abaixo).

Para a reação em cadeia da polimerase, 3 µL das amostras de DNA com parafina foram misturadas com Go Taq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) 1X e 10 pM de cada oligonucleótido sintético: 121 (sense) 5'- AAATAATGTACGG (T/G) GAGATGCATGA-3' e 122 (antisense) 5'- GGTTCGATTGGGGTTG-GTGTGTAATATA-3', que amplificam 330 pares de bases do kDNA do parasito com sensibilidade de 95 %¹²⁻¹⁴. Para as amostras das preparações histológicas coradas, foi feita PCR direta utilizando o kit Phusion Blood Direct PCR (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA), que não requer a extração de DNA. 1X Phusion Blood PCR Buffer, água, e 10 pM de cada oligonucleótido sintético (primários 121 e 122), foram adicionados a estas amostras¹². Após vários testes afim de melhorar a qualidade do produto de PCR acima mencionado¹⁵, foi realizada reamplificação utilizando o Go Taq Green Master Mix (Promega) 1X. O DNA genômico da cepa H4 de *T. cruzi* foi utilizado como controle positivo e a mistura de reação sem DNA foi utilizada como controle negativo.

O produto da PCR de ambos os tipos de amostras, foi analisado por eletroforese em 1,5% gel de agarose corado com brometo de etídio (5 µg/mL) durante 30 min a 100V em tampão 1X TBE (ácido tris-bórico -EDTA).

Estudo histopatológico

Todas as amostras embebidas em parafina foram processadas para a preparação de seções histológicas de 5 µm de espessura, coradas com H&E, e montadas com resina sintética em lâminas. Antes de serem processadas para extração de DNA, todas as amostras conservadas em preparações histológicas coradas com H&E, foram também examinadas microscopicamente em diferentes ampliações de 4x, 10x e 40x. A análise positiva consistiu na observação de lesões microscópicas compatíveis com a infecção por *T. cruzi*¹⁶.

RESULTADOS

Amplificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* em tecidos

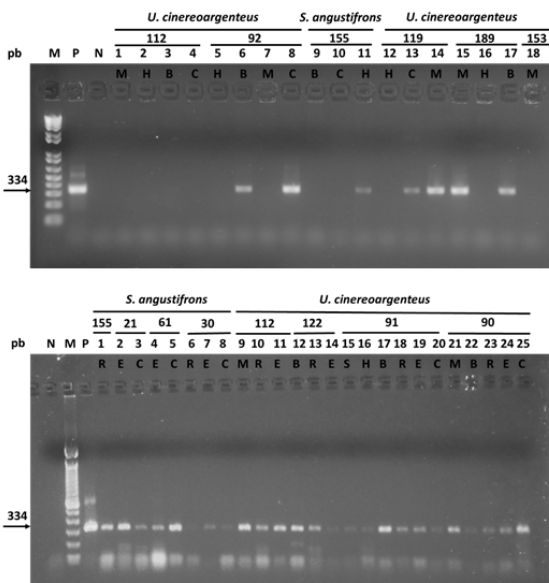
Pelo menos uma amostra de tecido de todos os animais estudados, e 76% do total de amostras analisadas (37/50), revelou a presença de DNA de *T. cruzi* (31 amostras de raposa cinzenta, e 6 de amostras de gambá) (Figura 2). De acordo com os resultados da PCR, o esôfago (90%), o músculo esquelético (85%), e o coração (70%), foram os tecidos com maior frequência de DNA de *T. cruzi* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de amostras de tecido positivas e negativas para DNA de *Trypanosoma cruzi* por órgãos e espécies hospedeiras.

Total Orgão	<i>U. cinereoargenteus</i>		<i>S. angustifrons</i>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Coração	5	2	2	1
Baço	5	1	NE	1
Fígado	2	4	1	NE
Rim	5	1	1	1
Músculo esquelético	6	1	NE	NE
Esôfago	7	1	2	NE
Estômago	1	NE	NE	NE

NE = Não-Existente

Figura 2. Eletroforese de gel de agarose a 1,5% de amostras de preparação histológica e em parafina de *U. cinereoargenteus* e *S. angustifrons*. M = marcador de peso molecular (100 bp), P = controle positivo (DNA *T. cruzi*), N = controle negativo (mistura sem DNA). Os números abaixo dos nomes científicos correspondem ao código de cada indivíduo e os números abaixo destes correspondem às canaléticas. As letras correspondem ao tipo de tecido analisado: C = coração; E = esôfago; R = rim; B = baço; M = músculo; H = fígado; S = estômago.



Estudo histopatológico

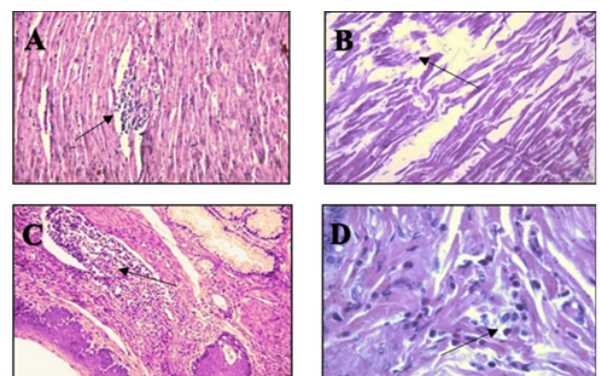
Foram observadas lesões compatíveis com infecção por *T. cruzi* em amostras de tecido de ambas as espécies, contudo, não foram encontrados ninhos de amastigotas (Ver Tabela 2; Figura 3).

Globalmente, todas as lesões observadas nas amostras de tecido foram leves. Em *U. cinereoargenteus*, foram encontradas lesões compatíveis com *T. cruzi* no músculo cardíaco em um de cinco indivíduos PCR positivos (20%), em um de seis (17%) no músculo esquelético e um de sete (14%) no esôfago; no caso de órgãos parenquimatosos, o rim foi o mais afetado em três de cinco indivíduos (60%), e um de dois (50%) o fígado foi o mais afetado. Em *S. angustifrons*, um de dois indivíduos (50%) positivos para PCR compatíveis com *T. cruzi*, foram encontrados apenas no músculo cardíaco; em órgãos parenquimatosos, apenas o fígado de um indivíduo tinha lesões compatíveis. Tanto em *U. cinereoargenteus* como em *S. angustifrons*, as amostras negativas para PCR mostraram lesões, no entanto, estas não eram compatíveis com a histopatologia associada ao *T. cruzi* (Tabela 2).

Tabela 2. Lesões histológicas e a sua frequência observadas em amostras de tecido de *Urocyon cinereoargenteus* e *Spilogale putorius* positivas e negativas para o DNA do *Trypanosoma cruzi*.

Espécies	Tecido	<i>T. cruzi</i> DNA	Histological lesion	n (%) tissue samples	
<i>U. cinereoargenteus</i>	Coração	Positivo	Necrose cardiomiocitária multifocal moderada	1/5 (20%)	
			Inflamação linfocítica multifocal ligeira	1/5 (20%)	
			Linfócito multifocal moderado, histiocítico, infiltrado eosinófilo	1/2 (50%)	
		Negativo	Necrose cardiomiocitária	1/2 (50%)	
			Degeneração hidrópica	1/2 (50%)	
			Necrose multifocal leve	1/6 (16.6%)	
	Músculo esquelético	Positivo	Necrose multifocal leve	1/6 (16.6%)	
		Esôfago	Positivo	Hiperplasia acantotética multifocal moderada	4/7 (57.1%)
	<i>S. angustifrons</i>	Coração	Positivo	Infiltrado linfocitário de focalização ligeira	1/7 (14.2%)
				Hiperplasia acantotética moderada	1/1 (100%)
				Infiltração linfocítica intersticial multifocal suave	3/5 (60%)
			Negativo	Degeneração hidrópica	1/5 (20%)
Necrose do epitélio tubular				1/5 (20%)	
Degeneração hidrópica				1/1 (100%)	
Fígado		Positivo	Infiltração intersticial linfocítica	1/2 (50%)	
		Negativo	Degeneração hidrópica multifocal	2/4 (50%)	
Baço		Positivo	Atrofia do tecido linfotectular	1/5 (20%)	
		Negativo	Hiperplasia Multifocal dos foliculos linfóides	2/5 (40%)	
<i>S. angustifrons</i>		Coração	Positivo	Degeneração hidrópica multifocal suave	1/2 (50%)
			Negativo	Necrose muscular	1/1 (100%)
	Infiltrado linfocítico multifocal ligeiro			1/1 (100%)	
	Esôfago	Positivo	Hiperplasia acantotética multifocal moderada	2/2 (100%)	
		Negativo	Infiltração eosinófila multifocal suave	2/2 (100%)	
	Rim		Negativo	Degeneração hidrópica multifocal do epitélio tubular	1/1 (100%)
	Fígado	Positivo	Necrose do epitélio tubular	1/1 (100%)	
			Degeneração hidrópica multifocal moderada	1/1 (100%)	
			Infiltrado linfocitário periportal	1/1 (100%)	
	Baço	Negativo	Hiperplasia linforeticular moderada	1/1 (100%)	

Figura 3. Lesões histológicas observadas em amostras de tecido de *U. cinereoargenteus* (A-C) e *S. angustifrons* (D) PCR-positivo com DNA de *T. cruzi*. A) infiltrado linfocitário no coração (10x), B) necrose cardiomiocitária no coração (10x), C) esôfago com infiltrado inflamatório (10x), D) célula inflamatória no tecido cardíaco (40x).



DISCUSSÃO

A presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de tecidos de todos os indivíduos de *Urocyon cinereoargenteus* e *Spilogale angustifrons* capturados em diferentes localidades do estado de Yucatan, revela que estes carnívoros fazem parte dos hospedeiros naturais deste protozoário na região. Embora Zavala-Velázquez *et al.* (1996)¹⁷ em Yucatan, e Zamora-Ledesma *et al.* (2016)¹⁸ em Queretaro, já tivessem relatado reatividade sorológica para *T. cruzi* em raposa cinzenta, as nossas descobertas confirmam a infecção natural por *T. cruzi*, sendo o primeiro registo de infecção em *S. angustifrons* no México.

Ainda que a transmissão vetorial seja o mecanismo de transmissão epidemiologicamente mais importante de *T. cruzi* para os seres humanos, este não parece ser o caso nos hospedeiros naturais de *T. cruzi*. Vários estudos indicaram que os hábitos dos mamíferos, tais como captura, alimentação e relação predador-presa, são vias comuns de transmissão direta do parasito entre os seus diferentes hospedeiros naturais^{19,20}. A aquisição de infecção com *T. cruzi* por via oral é provavelmente a mais importante entre as espécies com hábitos carnívoros; isto tem sido demonstrado experimentalmente em gambás (*Mephitis mephitis*) e naturalmente em guaxinins (*Procyon lotor*), por ingestão de triatomíneos infectados, e carne contaminada com tripomastigotas, respectivamente^{21,22}. Além disso, foi demonstrado que o *T. cruzi* pode invadir e replicar-se no epitélio da mucosa gástrica^{23,24}. É muito provável que, devido ao tipo de alimentação de raposas (omnívoras oportunistas) e doninhas (omnívoras), a predação de carniça e pequenas presas como roedores, e insetos em estações secas^{25,26}, lhes confira susceptibilidade natural a adquirir infecção por *T. cruzi* no seu habitat silvestre. Em Yucatan, foi relatada em roedores comuns, elevada prevalência de *T. cruzi*, elevada taxa de captura e infecção de *Triatoma dimidiata* na estação seca em peridomicílios do estado^{6,27}, o que constitui um cenário epidemiológico adequado para explicar o elevado número de amostras positivas no trato digestivo (esôfago, e estômago) dos mamíferos encontrados neste estudo, possivelmente as infecções foram adquiridas pela predação natural de raposas cinzentas e gambás nos seus habitats.

Devido à sua biologia e ecologia, os carnívoros podem ter papel importante nas redes de transmissão parasitária de múltiplos hospedeiros, como se reflete na elevada prevalência de infecção com *T. cruzi* relatada nos carnívoros^{19,22,28-31}. No Brasil, os quatis (*Nasua nasua*) parecem desempenhar papel na manutenção e dispersão do *T. cruzi*, devido à sua elevada carga parasitária e longa duração²⁸. Em algumas áreas dos Estados Unidos, a elevada prevalência de infecção com *T. cruzi* em carnívoros selvagens, particularmente o *U. cinereoargenteus*, varia de 7,6 a 13%^{31,32}. Do mesmo modo, há poucos estudos que referem infecção com *T. cruzi* em gambás, principalmente *Mephitis mephitis*, nos quais a prevalência de infecção num intervalo de 3 a 32% tem sido relatada^{29,33}. No estado de Yucatan, apenas um estudo relatou soropositividade para *T. cruzi* em raposas cinzentas, mas não para as doninhas¹⁷.

Na análise histopatológica das amostras de tecido estudadas para ambas as espécies, não foram observados ninhos de parasitos e, as lesões encontradas, mais frequentemente em *U. cinereoargenteus*, eram tanto no músculo cardíaco como no músculo esquelético. Para *S. angustifrons*, as lesões compatíveis devidas a *T. cruzi* foram observadas apenas no tecido cardíaco, uma vez que as amostras de músculo esquelético, não estavam disponíveis para esta espécie. As lesões encontradas neste estudo, foram semelhantes às relatadas em outros hospedeiros naturais de *T. cruzi*, incluindo carnívoros^{22,31,34-36}. Quanto aos órgãos parenquimatosos, o rim e o fígado foram os mais afetados para o *U. cinereoargenteus* e *S. angustifrons*, respectivamente, sendo semelhantes às lesões relatadas por

diferentes autores nestes mesmos órgãos³⁴⁻³⁶. A “ausência” de ninhos de *T. cruzi* nas seções dos tecidos analisadas poderia mostrar uma pequena carga parasitária nestes hospedeiros, apoiando assim o seu papel como reservatórios naturais. Além disso, a observação de ninhos de parasitos em única seção de 5 microns de espessura de um órgão inteiro pode indicar “sorte” ou evidência de invasão celular extensiva pelo parasito. Este último não parece ser o caso no presente estudo.

Apesar de terem sido observadas algumas lesões neste estudo, tais como infiltrados (linfócitos multifocais, histiócitos e eosinófilos), necrose cardiomiocitária, e degeneração hidrópica do coração, hiperplasia acantótica do esôfago, degeneração hidrópica de hepatócitos, e hiperplasia linforeticolar do baço, em amostras negativas para PCR; não eram compatíveis com infecção por *T. cruzi*.

Embora os resultados obtidos neste estudo sejam preliminares /exploratórios e as amostras utilizadas conservadas há 10 e 30 anos, consideramos que são relevantes pois fornecem informações sobre a circulação natural de *T. cruzi* em carnívoros sinantrópicos selvagens no estado de Yucatan. No entanto, um estudo recente que sintetiza os casos de doenças zoonóticas notificados entre 1995 e 2019 na Península de Yucatan, mostrou que, o *T. cruzi* continua a circular entre os animais sinantrópicos, principalmente roedores, gambás e cães, bem como animais selvagens, como morcegos e roedores³⁷. A captura destes carnívoros em ecótipos humanos (como todos os indivíduos analisados neste estudo), sugere que estes mamíferos poderiam estar envolvidos no ciclo peridoméstico e no fluxo de cepas de *T. cruzi* de origem selvagem para a área peridomiciliar humana rural de Yucatan. Em estudos futuros, é necessário identificar a DTU (*Discrete typing units*) das cepas de *T. cruzi* que circulam nestas espécies. A compreensão da genética populacional de *T. cruzi* é fundamental para discernir o fluxo de parasitos nas paisagens, particularmente em relação à fragmentação e mudança no uso do solo, onde existem estruturas comunitárias nativas e não nativas³⁸. Estudo recente na Península de Yucatan dá-nos uma ideia sobre a conectividade ecológica das comunidades hospedeiras de mamíferos, vetores e *T. cruzi*³⁹.

Finalmente, devido à escassa informação existente sobre a ecologia e biologia das populações naturais de *S. angustifrons* e *U. cinereoargenteus* na Península de Yucatan, é necessário realizar estudos sobre o tema para elucidar até que ponto estes carnívoros poderiam participar nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*.

CONCLUSÃO

Este estudo revela que a raposa cinzenta e o gambá manchado do sul são hospedeiros naturais de *T. cruzi* em Yucatan, também relata o primeiro registo de infecção por *T. cruzi* em *S. angustifrons* no México.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Zoonoses e outras doenças transmitidas por vetores, do Centro Regional de Investigação “Dr. Hideyo Noguchi” (LZOO-CIR) da Universidade Autônoma de Yucatan. Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT-MEXICO) pelo apoio ao projeto (PN-2013-214506).

REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, Volumen III: Parasitosis. OPS, Publicación Científica N° 580. Washington, D.C.; 2003. 327 p.
2. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N.

- Pathogenesis of Chagas' disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(3):592-630.
3. Zavala-Velázquez J. La enfermedad de Chagas en el Estado de Yucatán, México. (1940-2002). *Revista Biomédica.* 2003. 14(1):35-43.
 4. Ruiz-Piña H, Cruz-Reyes A. The Opossum *Didelphis virginiana* as a Synanthropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatan, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:613-20.
 5. Parada-López J, Hernández-Betancourt SF, Ruiz-Piña HA, Escobedo-Ortegón FJ, Medina-Peralta S, Panti-May JA. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Didelphis virginiana* in Relation to Population Parameters and Variables Associated with Presence in Rural Community Dwellings in Yucatan, Mexico. *Ecohealth.* 2013; 10(1):31-5.
 6. Panti-May JA, De Andrade RRC, Gurubel-González Y, Palomo-Arjona E, Sodá-Tamayo L, Meza-Sulú J, et al. A survey of zoonotic pathogens carried by house mouse and black rat populations in Yucatan, Mexico. *Epidemiol Infect.* 2017; 145(11):2287-95.
 7. Córdova-Aldana D, Escobedo-Ortegón FJ, Hernández-Betancourt SF, Ruiz-Piña HA. Los murciélagos en el ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el peridomicilio rural. In: Pacheco-Castro J, Lugo-Pérez JA, Tzuc-Canché L, Ruiz-Piña HA, eds. *Estudios multidisciplinares de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán.* Universidad Autónoma de Yucatán: México, 2013. p.233-46.
 8. Ruiz-Piña HA, Escobedo-Ortegón FJ, Rebollar-Téllez E, Barrera-Pérez M. Mamíferos silvestres y sus patógenos zoonóticos. In: Durán R, Méndez ME, eds. *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán.* Yucatán, México: xSEDUMA; 2010. p. 295-7.
 9. Vitória NS, Bezerra JL, Gramacho KP. A simplified DNA extraction method for PCR analysis of *Camarotella* spp. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2010; 3(2):249-52
 10. Hinton JP, Dvorak K, Roberts E, French WJ, Grubbs JC, Cress AE, et al. A Method to Reuse Archived H&E Stained Histology Slides for a Multiplex Protein Biomarker Analysis. *Methods Protoc.* 2019; 2(4):86.
 11. Ramesh PS, Madegowda V, Kumar S, Narasimha S, Manoli NN, et al. DNA extraction from archived hematoxylin and eosin-stained tissue slides for downstream molecular analysis. *World J Methodol.* 2019; 9(3):32-43.
 12. Degraeve W, Fragozo SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MAB, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 27(1):63-70.
 13. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51(6):771-7.
 14. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía-Jaramillo AM, et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(1):e931.
 15. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase chain reaction (PCR). In: Picó Y, . *Food Toxicants Analysis.* Amsterdam: Elsevier; 2007:147-87.
 16. Guarner J, Bartlett J, Zaki SR, Colley DG, Grijalva MJ, Powell MR. Mouse model for Chagas disease: Immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(2):152-8.
 17. Zavala-Velázquez J, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Ruiz-Piña HA. Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatan, Mexico: A serological and parasitological study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996; 38(4):289-92.
 18. Zamora-Ledesma S, Hernández-Camacho N, Villagrán-Herrera ME, Sánchez-Moreno M, Concha-Valdez FG, Jones RW, et al. Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2016; 5:25-30.
 19. Rocha FL, Roque ALR, de Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, de Azevedo FC, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS ONE.* 2013; 8(7): e67463.
 20. Santos FM, Jansen AM, Mourão G de M, Jurberg J, Nunes AP, Herrera HM. Triatominae (Hemiptera, reduviidae) in the pantanal region: Association with *Trypanosoma cruzi*, different habitats and vertebrate hosts. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(5):532-8.
 21. Davis DS, Russell LH, Adams LG, Yaeger RG, Robinson RM. An experimental infection of *Trypanosoma cruzi* in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *J Wildl Dis.* 1980; 16(3):403-6.
 22. Pietrzak SM, Pung OJ. Trypanosomiasis in raccoons from Georgia. *J Wildl Dis.* 1998; 34(1):132-6.
 23. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:101-7.
 24. Lewis MD, Francisco AF, Jayawardhana S, Langston H, Taylor MC, Kelly JM. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. *Sci Rep.* 2018; 8(1):11292.
 25. Fritzell EK, Haroldson KJ. *Urocyon cinereoargenteus*. *Mamm. Species.* 1982; 1-8.
 26. Kinlaw A. *Spilogale putorius*. *Mamm. Species.* 1995; 1-7.
 27. Dumonteil E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix E, Ruiz-Piña HA, Baños-López O, et al. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67:176-83.
 28. Herrera HM, Lisboa C V., Pinho AP, Olfifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, et al. 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.
 29. Brown EL, Roellig DM, Gompfer ME, Monello RJ, Wenning KM, Gabriel MW, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* Among Eleven Potential Reservoir Species from Six States Across the Southern United States. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10: 757-763.
 30. Martínez-Hernández F, Rendón-Franco E, Gama-Campillo L, Villanueva-García C, Romero-Valdivinos M, Maravilla P, et al. Follow up of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in two mammals species, *Nasua narica* and *Procyon lotor* (Carnivora: Procyonidae): evidence of infection control? *Parasit Vectors.* 2014; 7(1):405.
 31. Curtis-Robles R, Lewis BC, Hamer SA. High *Trypanosoma cruzi* infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2016; 5(2):117-23.
 32. Rosypal AC, Tidwell RR, Lindsay DS. Prevalence of Antibodies to *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in Wild Canids from South Carolina. *J Parasitol.* 2007; 93(4):955-7.
 33. Galaviz-Silva L, Mercado-Hernández R, Zárate-Ramos JJ, Molina-Garza ZJ. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Rev Argent Microbiol.* 2017; 49(3):216-23.
 34. Barr SC, Brown CC, Dennis VA, Klei TR. The Lesions and Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in Opossums and Armadillos from Southern Louisiana. *J Parasitol.* 1991; 77(4):624-7.
 35. Carreira JCA, Jansen AM, Deane MP, Lenzi HL. Histopatho-

- logical study of experimental and natural infections by *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(5):609-18.
36. Machado EMM, Fernandes AJ, Murta SMF, Vitor RWA, Camilo J, Pinheiro SW, *et al.* A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(6):958-65.
37. Haro P, Trasviña-Muñoz E, May-Concha I, López-Valencia G, Monge-Navarro F, Herrera-Ramírez C, *et al.* Historical Spatial Distribution of Zoonotic Diseases in Domestic, Synanthropic, and Wild Animals in the Mexican Territory of the Yucatan Peninsula. J Trop Med. 2021; 2021:1-12.
38. Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. Parasit Vectors. 2016; 9(1):1-20.
39. López-Cancino SA, Tun-Ku E, De la Cruz-Felix HK, Ibarra-Cerdena CN, Izeta-Alberdi A, Pech-May A, *et al.* Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. Acta Trop. 2015; 151(1):58-72.