



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Vinícius Matheus Ferrari

**Isolamento e caracterização genética de
Toxoplasma gondii em *Myrmecophaga tridactyla*
(Linnaeus, 1758)**

**São José do Rio Preto
2016**

Vinícius Matheus Ferrari

**Isolamento e caracterização genética de
Toxoplasma gondii em *Myrmecophaga tridactyla*
(Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração em Genética Animal e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo no. 2014/05302-8

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni

**São José do Rio Preto
2016**

Ferrari, Vinícius Matheus.

Isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* em *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus, 1758) / Vinícius Matheus Ferrari. -- São José do Rio Preto, 2016

47 f. : il., tabs.

Orientador: Lilian Castiglioni

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. Tamanduá-bandeira. 3. *Toxoplasma gondii* - São José do Rio Preto, Região de (SP) 4. Zoonoses. 5. Marcadores genéticos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 591.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Vinícius Matheus Ferrari

**Isolamento e caracterização genética de
Toxoplasma gondii em *Myrmecophaga tridactyla*
(Linnaeus, 1758)**

Dissertação para Exame de Defesa apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração em Genética Animal e Evolução do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Lilian Castiglioni

Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari

Departamento de Biologia Molecular

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Juliana Giantomassi Machado

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

**São José do Rio Preto
19 de agosto de 2016**

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me amparado e me conduzido durante toda essa caminhada e também pelas oportunidades concedidas.

À minha família, pelo suporte incondicional, pela motivação, por ser a minha base. Simplesmente devo tudo a vocês !! Agradeço muito ao meu pai, Edmar, por estar sempre ali e me ajudar nos momentos que mais preciso, por toda sua visão, pelo seu amor e, acima de tudo, ser um exemplo de pessoa batalhadora. À minha mãe, Rosa, pelo amor incondicional e por ser a pessoa especial que é. À minha irmã, Rafaela, pelos momentos de conversa, brincadeiras e, simplesmente, por ser minha irmã que amo muito. À minha querida avó, Antônia, por ser tão especial e essencial na minha vida.

Ao meu ex-professor do ensino fundamental e médio, Luís Fernando Segala, por ter feito com que eu “engrenasse” nesse caminho da pós-graduação.

Ao Prof^o Luiz Carlos de Mattos e à Prof^a Cinara de Cássia Brandão de Mattos, por terem me recebido e acolhido no Laboratório de Imunogenética. Obrigado por toda a conversa, ensinamento, atenção, respeito e confiança.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP, pelos momentos de risadas e aprendizado; por todo esse tempo de convívio que, com toda certeza, foi essencial para trazer mais leveza durante esse caminho. Só tenho que agradecer pelos ótimos momentos e pelas amizades das quais irei levar comigo sempre. Meu carinho por todos: Amanda, Ana Vitória, Cássia, Christiane, Fabiana, Fernando, Geraldo, Júlia, Luiz, Marcos, Mirele, Natália, Ricardo, Valquíria, Warlen.

À Cidinha, Regina e Márcio do Laboratório de Imunogenética da FAMERP, por todos os momentos de descontração, aprendizado, ajuda e pela amizade de vocês.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, por manterem o ambiente sempre em ótimas condições e favoráveis ao andamento de todas as atividades.

Às pessoas do Laboratório de Virologia da FAMERP, pelo apoio e suporte, pela paciência e disposição e à equipe do Biotério da FAMERP, por todo o suporte, auxílio e disponibilidade.

A todas as pessoas do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP, por todo o suporte e auxílio. Muito obrigado !!

Aos professores do IBILCE, que foram importantes durante essa etapa. Obrigado por compartilharem os seus conhecimentos e me auxiliarem durante essa caminhada.

A todas as pessoas que, durante essa jornada, acabaram cruzando minha vida e colaboraram para o meu crescimento e aprendizado. Sou muito grato a todos.

Aos meus amigos mais próximos e todos os familiares. Agradeço pelo apoio, pelas conversas, pelos momentos e pelo incentivo.

À banca examinadora, por todas as sugestões e ideias que contribuíram muito para o enriquecimento do trabalho. Muito obrigado por terem disponibilizado esse tempo da agenda de vocês e terem aceito o convite.

À minha orientadora, Lilian Castiglioni, por ser uma pessoa iluminada e especial. Por ter me recebido de braços abertos e ter feito com que eu me sentisse totalmente à vontade desde o começo dessa jornada. Agradeço pela sua amizade, pelas conversas e por essa energia boa que você transmite sempre que estamos próximos.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido e a CAPES, pela bolsa disponibilizada.

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose, que pode afetar tanto humanos, quanto um vasto número de espécies animais de sangue quente. Nos animais silvestres a infecção por *T. gondii* é bastante comum e vários estudos da literatura têm demonstrado sua ocorrência em diferentes organismos. Contudo, o conhecimento da história natural da maioria das zoonoses parasitárias na América do Sul ainda é pouco compreendido tanto nos humanos quanto nos animais. Particularmente, nos animais, a dificuldade na obtenção de amostras e o conhecimento insuficiente da biologia, ecologia e comportamento limitam estas pesquisas. Assim, o presente estudo objetivou isolar e caracterizar geneticamente (PCR-RFLP) o parasito *T. gondii* em amostras de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), um importante animal silvestre da nossa região. As amostras biológicas de sangue (e tecidos, apenas dos animais que vieram a óbito) de *M. tridactyla* foram coletadas no SACCAS/Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, após terem sido vítimas de queimadas ou atropelamentos. As amostras foram analisadas no Laboratório de Imunogenética em parceria com o Laboratório de Virologia, ambos da FAMERP, e também com o Laboratório de Doenças Parasitárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. O Teste de Aglutinação Modificada (MAT) foi realizado em 23 indivíduos da espécie para a tentativa de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em suas amostras sorológicas. Para a tentativa de isolamento do *T. gondii*, amostras teciduais de tamanduá-bandeira foram processadas (digestão péptica) e inoculadas em camundongos da linhagem Balb/c. Entre as 23 amostras sorológicas analisadas, foi constatada a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de 13 indivíduos (56,52%). O isolamento do parasito foi realizado a partir de amostras teciduais de 1 indivíduo, entre 7 animais da espécie que vieram a óbito (14,28%), e esse camundongo também apresentou sorologia reagente para anticorpos anti-*T. gondii*. O isolamento de *T. gondii* é inédito neste animal e apresenta alta relevância clínica em humanos, uma vez que as linhagens infectantes são as mesmas nos animais silvestres e humanos e, nos primeiros, este processo é facilitado devido à alta concentração de parasitos nas amostras biológicas. Assim, é possível verificar a presença da infecção por *T. gondii* na espécie do tamanduá-bandeira e, pelo fato da espécie *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira) apresentar um hábito forrageador, é relevante relatar a contaminação ambiental por *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; *Myrmecophaga tridactyla*; isolamento; toxoplasmose; zoonose; marcadores moleculares; genotipagem.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis, which can affect both humans and a large number of warm-blooded animal species. In wild animals, T. gondii infection is quite common and many published studies have demonstrated its occurrence in different organisms. However, the knowledge of the natural history of most parasitic zoonoses in South America is poorly understood both in humans and animals. Particularly, in animals, the difficulty in obtaining samples and the insufficient knowledge of the biology, ecology and behavior limit these researches. Thus, this study aimed to isolate and characterize genetically (PCR-RFLP) the T. gondii parasite in giant anteater (Myrmecophaga tridactyla) samples, an important wild animal in our region. Biological samples of M. tridactyla blood (and tissues, only from animals that died) were obtained in SACCAS/Veterinary Hospital "Dr. Halim Atique" after they have been victims of fires or roadkill. The samples were analyzed in Immunogenetics Laboratory in partnership with the Virology Laboratory, both of FAMERP, and also with the Parasitic Diseases Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at USP. The Modified Agglutination Test (MAT) was carried out in 23 individuals of the species to attempt detection of anti-T. gondii in their serum samples. In an attempt to isolate T. gondii, tissue samples of giant anteater were processed (peptic digest) and inoculated into Balb/c lineages mice. Among the 23 serum samples analyzed, it was found the presence of antibodies to anti-T.gondii in samples of 13 individuals (56,52%). The isolation of the parasite was performed from tissues samples from 1 individual, among 7 animals of the species that died (14,28%), and this mouse also presented reagent sorology. The isolation of T. gondii is unprecedented in this animal and has high clinical relevance in humans as the infectings strains are the same in wild animals and humans and in the first, this process is facilitated due to the high concentration of parasites in biological samples. Thus, it's possible to verify the presence of T. gondii infection in giant anteater species and, because of it's foraging habit, its relevant reporting the environmental contamination by T. gondii.

Key-words: *Toxoplasma gondii. Myrmecophaga tridactyla. Isolation. Toxoplasmosis. Zoonoses. Molecular markers. Genotyping.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios infectantes do parasito <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Figura 2: Ciclo biológico do parasito <i>T. gondii</i>	15
Figura 3: Mapa de ligação genético elaborado identificando os 14 cromossomos do genoma do <i>T. gondii</i>	19
Figura 4: Cistos teciduais de bradizoítos localizados no cérebro de camundongo infectado pelo parasito <i>T. gondii</i>	33
Figura 5: Fotodocumentação do Gel de Agarose da reação controle das amostras de DNA de <i>M. tridactyla</i> realizada por cPCR.....	33
Figura 6: Fotodocumentação do Gel de Agarose da cPCR para tentativa de amplificação do material genético do parasito <i>T. gondii</i> a partir de amostra de DNA de <i>M. tridactyla</i>	34
Figura 7: Genotipagem do material genético do isolado de <i>T. gondii</i> segundo os marcadores C29-2 (A); BTUB (B); SAG1 (C) e CS3 (D).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR-RFLP e enzimas de restrição.....	29
Tabela 2: Reagentes utilizados na PCR Multiplex.....	30
Tabela 3: Reagentes utilizados na PCR Nested.....	30
Tabela 4: Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (Teste de Aglutinação Modificada [MAT] \geq 1:25) em amostras de tamanduá-bandeira da região noroeste do Estado de São Paulo.....	32
Tabela 5: Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (Teste de Aglutinação Modificada [MAT] \geq 1:25) em amostras sorológicas dos damundongos previamente inoculados com amostras teciduais de tamanduá-bandeira.....	32
Tabela 6: Resultado da genotipagem obtido utilizando-se os 12 marcadores moleculares.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP`s - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

g – grama

g - gravidade

HCl – Ácido clorídrico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Kg – quilograma

KCl – Cloreto de Potássio

MAT – Teste de Aglutinação Modificada

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL – mililitro

mM - milimolar

N - Normalidade

NaCl – Cloreto de Sódio

PBS - Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

cPCR – Reação em Cadeia da Polimerase convencional (*Polymerase Chain Reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

rpm – rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura desenvolvido neste Instituto).

SACCAS – Setor de Atendimento Clínico-Cirúrgico de Animais Selvagens

SFB – Soro fetal bovino

U – unidade

UV - ultravioleta

UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

USP – Universidade de São Paulo

V – Volts

μ l – microlitro

μ g - micrograma

% - porcentagem

$^{\circ}$ C – grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Aspectos éticos.....	23
3.2 Obtenção das amostras.....	23
3.3 Teste Sorológico.....	24
3.3.1 Teste de Aglutinação Modificada (MAT).....	24
3.4 Isolamento de <i>T. gondii</i>	25
3.4.1 Digestão péptica dos tecidos.....	25
3.4.2 Inoculação e colheita dos órgãos.....	26
3.5 Extração de DNA genômico.....	27
3.6 Análises moleculares para detecção de <i>T. gondii</i>	28
3.6.1 cPCR.....	28
3.7 Genotipagem por RFLP.....	29
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O protozoário do gênero *Toxoplasma* foi encontrado pela primeira vez em tecidos de um roedor, *Ctenodactylus gundii*, por Nicolle e Manceaux, em 1908, na Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; NICOLLE; MANCEAUX, 1909; FERGUSON, 2009). Nicolle, inicialmente, acreditou que o parasito seria um piroplasma e, posteriormente, *Leishmania*. Entretanto, logo ele percebeu que havia descoberto um organismo novo e o nomeou *T. gondii*, baseado em sua morfologia e também no hospedeiro, denominado *Ctenodactylus gundi* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). Na verdade, Nicolle and Manceaux (1908) deveriam ter nomeado o parasito de *Toxoplasma gundii*, porém eles identificaram incorretamente o hospedeiro como *Ctenodactylus gundi*. A partir dessa descoberta, o nome específico *Toxoplasma gondii*, proposto por Nicolle e Manceaux, é utilizado para denominar este protozoário, que apresenta em um de seus estágios evolutivos, uma morfologia em arco e que afeta tanto o homem quanto outros mamíferos, domésticos e silvestres e, também a maioria das aves (ELMORE et al., 2010).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao **Filo Apicomplexa** (que é caracterizado pela presença de um pólo apical), **Classe Sporozoa**, **Sub-classe Coccidea**, **Ordem Eucoccidea**, **Família Sarcocystidae**, **Sub-família Toxoplasmatinae**, **Gênero Toxoplasma** e **Espécie Toxoplasma gondii**.

O *T. gondii* apresenta uma diferenciação em sua morfologia, e esta depende do habitat e do estágio evolutivo em que o parasito se encontra, possuindo três estágios infectantes denominados taquizoíto, cisto de bradizoíto e oocisto esporulado (SULLIVAN; JEFFERS, 2011) (Figura 1). Os taquizoítos representam uma forma multiplicativa de fase aguda, ao passo que os bradizoítos representam a forma de multiplicação lenta, característicos de fase crônica e estão presentes em cistos teciduais. No caso dos oocistos, eles são liberados juntamente com as fezes dos felídeos (SOARES, 2010).

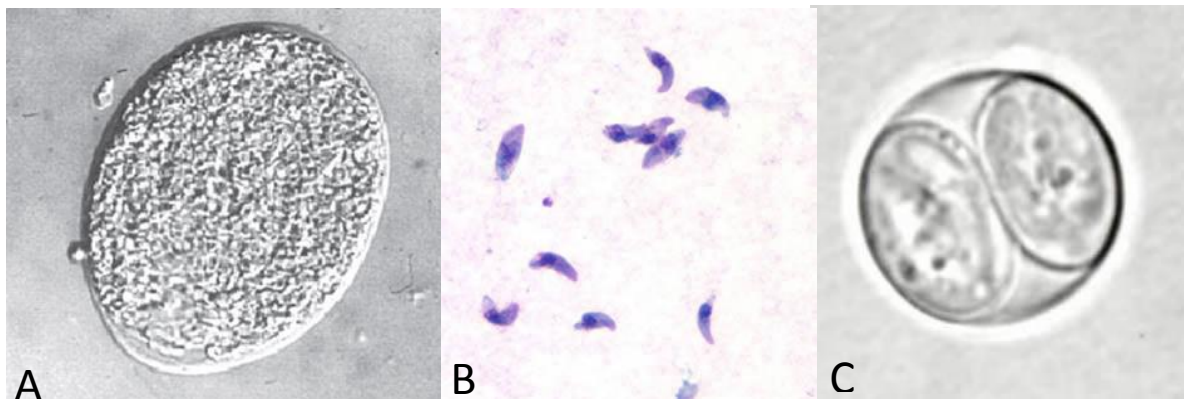


Figura 1. Estágios infectantes do parasito *Toxoplasma gondii*. (A) Cisto de Bradizoíto (SULLIVAN; JEFFERS, 2011). (B) Taquizoíto - esfregaço de fluido peritoneal de rato (CDC, 2016). (C) Oocisto esporulado (CDC, 2016).

Estes estágios evolutivos estão relacionados a um ciclo heteróxico, o qual é caracterizado pela presença de hospedeiro definitivo e intermediário (Figura 2).

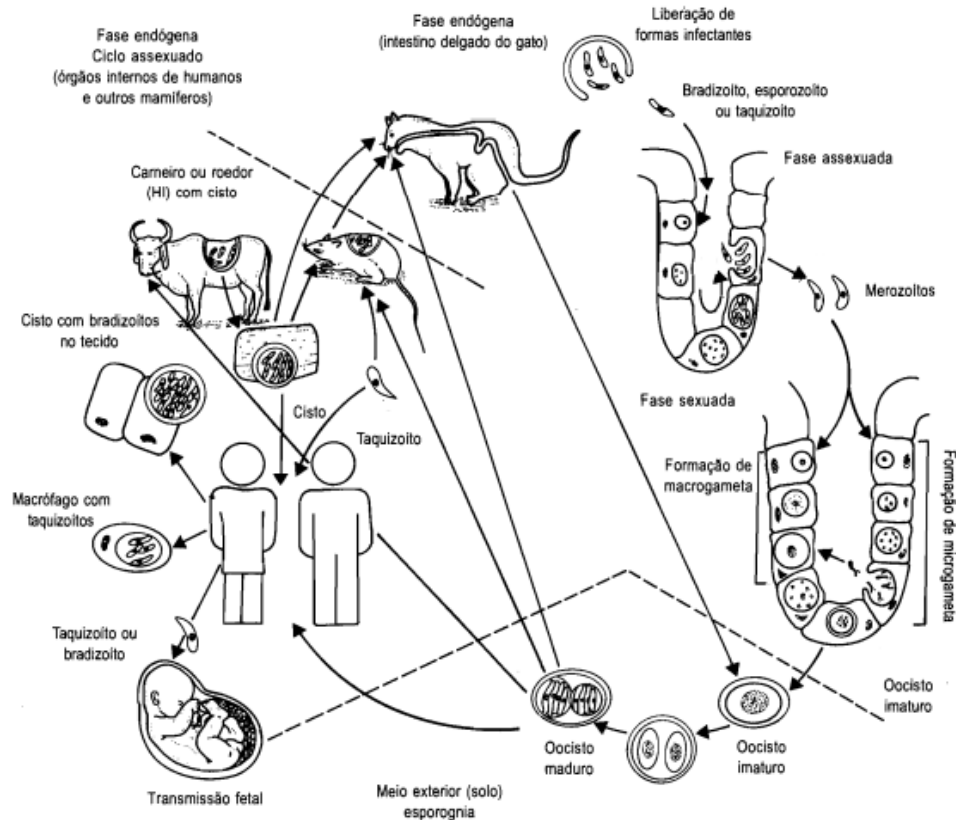


Figura 2. Ciclo biológico do parasito *T. gondii*. Adaptado de Neves et al. (2005).

Os hospedeiros definitivos do parasito são conhecidos pelos animais pertencentes à família Felidae, destacando principalmente o gato doméstico como um dos principais felídeos. Os hospedeiros definitivos são infectados, principalmente, após ingerirem cistos de bradizoítos, que podem ser encontrados nos tecidos dos hospedeiros intermediários. Após a infecção, os parasitos invadem as células epiteliais do trato intestinal e se multiplicam, de forma assexuada (endodiogenia e merogonia), para formarem merozoítos. O conjunto desses merozoítos formados dentro do vacúolo parasitóforo das células é denominado esquizonte maduro. O rompimento dessas células libera os merozoítos que penetram em novas células, sofrendo uma transformação para as formas sexuadas masculinas e femininas (gametócitos). Essas formas sofrem uma maturação e formam os gametas masculinos móveis (microgametas) com dois flagelos e os gametas femininos imóveis (macrogametas), responsáveis pela reprodução sexuada. O microgameta migra de sua célula e fecunda o macrogameta, dando origem ao zigoto, que forma, dentro do epitélio, uma parede externa dupla originando o oocisto. Após alguns dias, ocorre o rompimento da célula, liberando os oocistos imaturos (não esporulados). Essas formas, juntamente com as fezes, são liberadas no meio ambiente, as quais após cerca de quatro dias, se tornam maduras sofrendo esporulação. Esses oocistos maduros apresentam dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; CDC, 2016).

Os hospedeiros intermediários, que podem incluir aves e roedores, se infectam por meio da ingestão de água, do solo ou vegetais que estão contaminados com os oocistos esporulados. Esses oocistos liberam os esporozoítos e eles penetram nas células do epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos e se multiplicam rapidamente e migram para diversos tipos celulares do organismo (hospedeiro). Eles formam, então, um vacúolo parasitóforo, onde sofrem divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítos, que rompem as células e se disseminam pelos sistemas do hospedeiro infectado (fase proliferativa), caracterizando a fase aguda de infecção. Com o surgimento da resposta imunológica, os parasitos intracelulares diminuem e os resistentes podem se diferenciar em bradizoítos dentro de cistos teciduais, podendo permanecer viáveis por longos períodos. Esta fase cística caracteriza a fase crônica de infecção. Os gatos podem se infectar pela ingestão direta de oocistos esporulados (encontrados no meio ambiente) e também devido ao consumo de hospedeiros intermediários que já estão alojando os cistos em seus tecidos. Além disso, os animais que são criados para o consumo humano também podem se tornar infectados após a ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente (FERGUSON, 2009; CDC, 2016).

Considerando os humanos, sendo os hospedeiros intermediários, os parasitos formam cistos teciduais, mais comumente nos olhos, cérebro, miocárdio e músculo esquelético (CDC, 2016).

O primeiro relato de toxoplasmose fatal em animal doméstico foi em um filhote de cão, que morreu devido à toxoplasmose visceral aguda, na comuna de Turim (Itália) (MELLO, 1910). Ao longo dos anos, a toxoplasmose canina foi relatada em Cuba, em alguns países europeus e asiáticos, na Tunísia, na antiga URSS e Estados Unidos (DUBEY; BEATTIE, 1988). O primeiro caso de toxoplasmose relacionando a doença com gatos só foi relatado em 1942, na cidade de Middletown (Nova Iorque) (OLAFSON; MONLUX, 1942). A toxoplasmose em ovelhas na Nova Zelândia despertou interesse econômico após vários casos de abortos e Hartley e Marshall (1957), conseguiram isolar o parasito desses fetos abortados. Logo em seguida, uma epidemia de casos de abortos em ovinos foi reconhecida no Reino Unido (BEVERLEY; WATSON, 1961).

Nos animais silvestres a infecção por *T. gondii* é bastante comum e vários estudos da literatura têm demonstrado sua ocorrência em diferentes organismos, tais como: mamíferos silvestres (tatu, quatis, gambás: SILVA et al. (2006); OLIVEIRA et al. (2009); felinos: ELMORE et al., 2010); mamíferos domésticos (cães, gatos e cavalos: BEYER; SHEVKUNOVA, 1986); mamíferos de importância econômica (bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos: BEYER; SHEVKUNOVA, 1986), aves domésticas e selvagens (galinha, pato e ganso: BEYER; SHEVKUNOVA, 1986), entre outros.

As manifestações de sinais clínicos causadas pela infecção por *T. gondii* em animais variam das mais brandas, como corrimento nasal e ocular, fraqueza muscular e prostração até casos de aborto em rebanhos e morte (MARQUES; COSTA, 1985; BEYER; SHEVKUNOVA, 1986; VIDOTTO et al., 1987; DUBEY, 1990; DUBEY et al. 1990).

Da mesma forma que nos humanos, os problemas epidemiológicos, clínicos e, inclusive, econômicos, causados pela infecção por *T. gondii*, têm sido objeto de vários estudos visando à compreensão da dinâmica de transmissão deste parasito, seu comportamento nos animais hospedeiros, os graves sintomas clínicos em decorrência da sua presença e os prejuízos econômicos pela infecção de rebanhos (BEYER; SHEVKUNOVA, 1986; SILVA, et al., 2006; ELMORE et al., 2010).

Contudo, o entendimento da história natural da maioria das zoonoses parasitárias na América do Sul ainda é pouco compreendido tanto nos humanos quanto nos animais. Particularmente nos animais hospedeiros, a dificuldade na obtenção de amostras e o conhecimento insuficiente da biologia e comportamento dos mesmos limitam estas pesquisas

(THOISY et al., 2003; KHAN et al., 2006; PENA et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013).

O mecanismo de infecção pelo *T. gondii* nos animais silvestres pode ocorrer a partir do solo e da água contaminados por oocistos e da predação de animais infectados. Também, outro fato importante a ser salientado, é a infecção de animais silvestres por animais domésticos portadores do parasito (THOISY et al., 2003). Estes aspectos têm despertado interesse dos pesquisadores, uma vez que a infiltração de animais silvestres nas regiões urbanas tem sido muito frequente, devido à fragmentação de habitats por interferência antrópica (FONSECA et al., 1996; EMMONS, 1997; FONTANA; BENCKE; REIS, 2003).

De fato, a avaliação da saúde de animais de vida livre é de grande valia frente às ameaças vividas por essas espécies e seu risco de extinção. Inúmeros fatores podem influenciar na prevalência de doenças nessas populações, como, por exemplo, a fragmentação de habitat, possibilitando um maior contato com espécies domésticas e os humanos, e durante possíveis translocações ou solturas, podendo favorecer a emergência de doenças zoonóticas (JUNGE; FISHER; DUBEY, 2007).

Na região Noroeste do Estado de São Paulo, os problemas resultantes da fragmentação de habitats têm causados sérias preocupações para algumas espécies silvestres, com destaque para o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, LINNAEUS, 1758) (FONTANA; BENCKE; REIS, 2003).

O tamanduá-bandeira (*M. tridactyla*) é uma das principais vítimas da fragmentação de habitat e interferência antrópica. Como consequência, é um dos animais mais ameaçados da fauna brasileira, incluído na categoria “Vulnerable” (VU), ou seja, próximo da ameaça tanto em nível global quanto nacional, compartilhando essa categoria com mais 323 espécies ao redor do mundo (FONTANA; BENCKE; REIS, 2003).

As análises genéticas e de genotipagem de populações de *T. gondii* apresentam importância médica e veterinária, pois auxiliam na compreensão dos padrões epidemiológicos e das diferentes manifestações da doença e, ainda, permitem o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da toxoplasmose (AJZENBERG; DUMÈTRE; DARDÉ, 2005).

As primeiras análises genéticas de populações de *T. gondii*, realizadas em animais, utilizando-se marcadores PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), se basearam em quatro marcadores moleculares e demonstraram a presença de três linhagens: tipo I, II e III. Nos mesmos trabalhos, também foi possível observar que a virulência e a evolução da infecção variavam de acordo com o tipo de cepa

infectante (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; GRIGG et al., 2001; TIBAYRENC; AYALA, 2002; SU et al., 2003; PENA et al., 2006). Por meio de recombinações e cruzamentos entre cepas do tipo II (ME-49) e tipo III (CEP), Sibley e Boothroyd (1992) construíram um mapa genômico do *T. gondii*, constituído por 11 cromossomos. Khan et al. (2005), ao realizarem recombinações entre cepas tipo II e III e tipo I e III e utilizando 250 marcadores genéticos, redefiniram o mapa genômico do *T. gondii*, atribuindo à sua constituição 14 cromossomos (Figura 03).

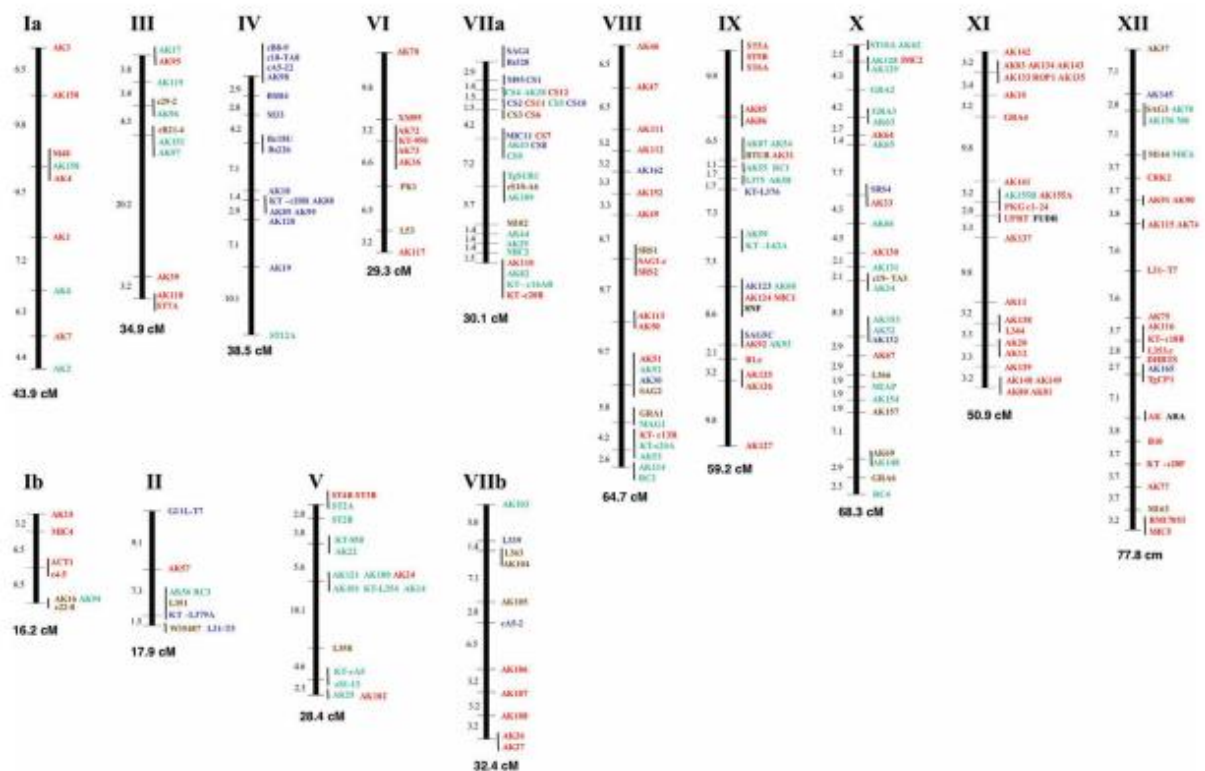


Figura 3. Mapa de ligação genético elaborado identificando os 14 cromossomos do genoma do *T. gondii* (KHAN et al., 2005).

A maioria dos estudos nacionais relacionados à caracterização gênica do *T. gondii*, foram realizados em animais (DUBEY et al., 2003; PENA et al., 2008, SILVA et al., 2011; KHAN et al., 2011; PENA et al., 2013). Outros estudos analisaram isolados do parasito provenientes de amostras biológicas humanas, com o intuito de esclarecer a relação entre as diferentes cepas e a infecção humana (VALLOCHI et al., 2005; KHAN et al., 2006),

inclusive de nossa região (FERREIRA et al., 2011), podendo ainda ser uma infecção mista (CARNEIRO et al., 2013). Vitaliano et al. (2014), conseguiram realizar a caracterização genética de isolados obtidos a partir de algumas espécies animais, como a raposa-do-campo, lobo-guará, tamanduá-mirim, gato-do-mato, paca, queixada, tatu-galinha, pica-pau-de-banda-branca, tatu-peba.

A partir dos estudos que examinam a estrutura da população do parasito nos países europeus e norte-americanos, torna-se evidente a ocorrência de uma propagação clonal, onde somente três linhagens clonais (tipos I, II e III) são responsáveis pela maioria das infecções em seres humanos e outros animais (HOWE; SIBLEY, 1995; SIBLEY et al., 2009). Segundo Walzer e Boyle (2012), o que pode contribuir é o fato de que hospedeiros intermediários podem transmitir o parasita para outros hospedeiros (também intermediários) por meio da predação (carnivorismo).

Khan et al. (2011), ao examinarem mais amplamente a estrutura da população de *T. gondii*, verificaram que muito dos trabalhos relacionados ao *Toxoplasma* possuíam um foco apenas nas linhagens tipos I, II, e III, entretanto, quando íntrons de múltiplos *loci* não ligados foram sequenciados a partir de uma variedade de isolados de *T. gondii* de diversas localidades, foi claramente observada uma divisão entre as linhagens de isolados na Europa e América do Norte e os da América do Sul. Propõe-se que a recombinação genética entre linhagens distintas (que acontece somente quando o felino está infectado com duas linhagens diferentes simultaneamente) é rara nas populações de *T. gondii* na Europa e América do Norte (HOWE; SIBLEY, 1995).

Nos estudos de Boyle et al. (2006), Khan et al. (2007), Khan et al. (2005), também foi observado que, enquanto múltiplos loci não ligados distinguiram os tipos I, II, e III, aqueles no cromossomo Ia mostraram muito poucas sequências polimórficas entre eles. Este haplótipo no cromossomo monomórfico Ia, bem como haplótipos bialélicos em outros cromossomos, contribuiu para um modelo em que uma única linhagem (Tipo II) seria um provável ancestral tanto para as linhagens tipo I e III. Tendo por base este modelo, a explicação mais parcimoniosa foi que ambas as linhagens dos tipos I e III apresentaram o cromossomo Ia do ancestral do tipo II em um limitado número de cruzamentos (BOYLE et al. 2006). Porém, os dados de Khan et al. (2011), proporcionam uma boa evidência de que cromossomo monomórfico Ia talvez tenha tido suas origens na América do Sul e migrou para o norte.

Recentemente, Rajendran e colaboradores (2012) descreveram a alta diversidade populacional de *T. gondii* na América do Sul e Khan (2011) e colaboradores verificaram a existência de associação cromossômica no sucesso da expansão das linhagens clonais.

Considerando essa dispersão de cepas, Walzer e Boyle (2012) propuseram que a migração aviária e o transporte por embarcações poderiam ser responsáveis por tal variabilidade na América do Sul e que a origem da diversidade gênica seria a partir da América do Sul e não dos EUA e da Europa.

Este tipo de estudo somente é possível devido ao conhecimento prévio do genoma de *T. gondii* e ao desenvolvimento de metodologias que permitam fazer a análise gênica, tais como os estudos de *multilocus* por PCR-RFLP, sequenciamento de várias regiões gênicas (*multilocus sequencing*) (LEHMANN et al., 2000; GRIGG et al., 2001; SU et al., 2003; AJZENBERG et al., 2004) e polimorfismo de nucleotídeos em microssatélites (AJZENBERG et al., 2005). Conforme citado anteriormente, estudos preliminares realizados por este grupo de pesquisadores encontraram o genótipo toxodb#65 em cinco pacientes com toxoplasmose ocular em humanos (FERREIRA et al., 2011).

Essas novas suposições respaldam os objetivos do presente trabalho de investigar a variabilidade molecular de *T. gondii* na região noroeste do Estado de São Paulo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolar e caracterizar geneticamente o *T. gondii* em amostras de *M. tridactyla*, o tamanduá-bandeira, um importante animal silvestre da fauna do Noroeste Paulista.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os padrões genotípicos existentes em amostras de DNA de *T. gondii* isoladas dos animais infectados;
- Verificar a prevalência desta zoonose no tamanduá-bandeira

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNIRP (04/2014 PP), FAMERP (2014/05302-8) e pelo SISBIO (No. 43854-3).

3.2 Obtenção das amostras

Os espécimes de *M. tridactyla* foram capturados pela Polícia Militar Ambiental, pela Polícia Rodoviária Federal ou, ainda, pelo IBAMA, e conduzidos ao SACCAS/UNIRP para atendimento hospitalar, em ocorrências registradas na região noroeste Paulista. Conforme mencionado, esses animais são, na maioria das vezes, vítimas de atropelamento ou queimados, em consequência da fuga da queima de cana-de-açúcar. Assim, a captura dos mesmos não foi responsabilidade dos participantes do presente estudo.

A coleta do sangue para realização dos exames ambulatoriais dos animais foi realizada pelo médico veterinário do hospital, responsável pelo setor de animais silvestres do SACCAS/UNIRP. Foram coletadas duas amostras de sangue periférico, sendo uma em tubo seco (sem anticoagulante), para obtenção do soro e outra em tubo contendo somente EDTA, para posterior extração de DNA. Em cada frasco, foi colhido um volume de 2,0 ml de sangue, totalizando 4,0 ml de cada animal. Entretanto, essa quantidade máxima só foi obtida quando o animal estava em condições de peso e saúde que o permitia ser realizado. Nos casos negativos, o sangue restante das análises laboratoriais solicitadas pelos médicos veterinários (hemograma, por exemplo), que são obrigatoriamente realizados nos animais feridos, foi disponibilizado para o presente trabalho.

Com relação ao número total de animais que foram incluídos no presente estudo, foi possível obter amostras de sangue de 23 indivíduos da espécie *M. tridactyla*, coletadas durante o período de Agosto de 2014 à Fevereiro de 2016. Esses animais foram encontrados em cidades da região noroeste do Estado de São Paulo, como: Catanduva, Jales, Nipoã, Neves Paulista, Buritama, Nova Granada, São José do Rio Preto, José Bonifácio e Votuporanga.

Muitos animais sobrevivem aos ferimentos e são reconduzidos à natureza pelos integrantes do SACCAS. Dos animais que vieram a óbito (7/23) foram retirados fragmentos teciduais de aproximadamente 100 g de cérebro, coração e gastrocnêmio (coxa). Essas amostras teciduais foram imediatamente enviadas por via expressa para a Profa. Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a tentativa de isolamento do *T. gondii* também nestes tecidos.

3.3 Teste Sorológico

3.3.1 Teste de Aglutinação Modificada (MAT)

O Teste de Aglutinação Modificada (MAT) utilizado foi seguido do protocolo proposto por Desmonts e Remington, (1980) e Dubey e Desmonts, (1987). Esta etapa da pesquisa foi conduzida em parceria com a equipe da Prof^a Dr^a Hilda Fátima de Jesus Pena, do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. O teste consiste em uma diluição seriada das amostras sorológicas, onde é possível detectar a presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

As amostras foram diluídas com 1x PBS em uma microplaca para titulação de 96 (8x12) poços e, posteriormente utilizou-se 50 ul das amostras diluídas que foram colocadas na primeira e quinta fileiras de uma outra microplaca. Para cada amostra, foi feita uma triagem de diluição seriada de 1:200 (1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Para placa de microtitulação, é possível analisar 20 amostras sorológicas, distribuídas em duas fileiras (1^a e 5^a) nos poços das colunas de 1 a 10. Nos casos onde a titulação mostrou ser reagente em 1:200, essas amostras foram analisadas novamente, sendo reservada todas as fileiras da placa, onde a titulação máxima pode atingir 1:3200. Para os controles positivo e negativo, foram feitas diluições seriadas de 1:3200 (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200), sendo para isso reservada as duas últimas colunas da placa (11^a e 12^a). Para o controle positivo, foi feita uma mistura de antígeno (*T. gondii*). Após as diluições, as microplacas foram seladas e incubadas a 37°C, por volta de 16 horas e depois incubadas a 4°C por 4 horas. A leitura do resultado foi feita observando a formação de pelete (pequeno ponto) ou não no fundo de cada poço da placa, indicando resultado positivo quando não há a presença de pelete. O *cutoff* utilizado para a realização do teste sorológico foi de $\geq 1:25$.

Além da avaliação das amostras de soro pelo Teste de Aglutinação Modificada (MAT) de todos os animais da espécie incluídos no presente trabalho, também foram analisadas amostras sorológicas dos camundongos, nos quais haviam sido inoculadas, previamente, com as amostras teciduais, na tentativa de identificar anticorpos anti-*T. gondii*.

3.4 Isolamento de *T. gondii*

Nesta etapa do isolamento, amostras teciduais de 7 animais da espécie *M. tridactyla* que vieram a óbito, foram analisadas no Laboratório de Virologia da FAMERP (Bloco U6), sob a autorização do Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira, responsável pelo laboratório, o qual já consiste em uma área adaptada para esta finalidade. Essas mesmas amostras também foram analisadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo (USP). Nesta etapa de isolamento, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c e, para a inoculação das amostras teciduais nesses camundongos, primeiramente foi feita uma digestão péptica desses tecidos.

3.4.1 Digestão péptica dos tecidos

Os tecidos escolhidos para ser feita a digestão péptica e a posterior inoculação nos camundongos foram os tecidos cerebrais, do coração e gastrocnêmio, que estavam frescos ou mantidos sob refrigeração a 4 °C por no máximo quatro dias.

Para o preparo da solução péptica, foi utilizado 2,6 g de pepsina, 5,0 g de NaCl, 7,0 ml de HCl 12N, em quantidade suficiente para 500 ml de água destilada, onde a cada 10 g de tecidos utilizou-se 100 ml de solução de digestão (50 ml de salina 0,85 % + 50 ml da solução péptica). Os tecidos de cada amostra animal foram cortados separadamente em fragmentos pequenos e descartados os tecidos conectivos e gorduras. Foi feita a pesagem dos tecidos e verificou-se o peso total. Foi processado até 50 g de “pool” dos tecidos e transferido para béqueres. Para homogeneizar as amostras, foi utilizado um “mixer” de uso doméstico (estéril) e a cada 10 g de tecido foi adicionado 50 ml de salina 0,85 %. Os homogeneizados foram, então, colocados para aquecer em banho-maria com agitação lenta a 37 °C, entre 5 a 10 minutos.

Logo em seguida, foi adicionado a solução de pepsina ácida recém preparada (50 ml para cada 10 g de tecido a ser digerido) e incubada em banho-maria com agitação a 37 °C por uma hora. Após o término da incubação, o homogenado foi coado através de gaze para um frasco estéril e distribuído em tubos tipo Falcon de 50 ml. Logo após, foi feita uma centrifugação a 2500 x g a dez minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e homogeneizado mecanicamente. Para a neutralização do conteúdo de cada tubo, foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio a 1,2 %, onde observou-se a mudança na coloração do conteúdo de “rosado” para “cinza esverdeado”. O conteúdo dos tubos foi, então, agrupado em um único tubo, onde adicionou salina 0,85 % até 40 ml e homogeneizou. Após a

mudança na coloração, o tubo foi completado para 50 ml com salina 0,85 % e passado no vórtex. Logo após, o conteúdo foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionada uma solução AB (1000 unidades de penicilina e 100 ug de estreptomicina/ml) volume/volume. Em seguida, o material foi passado no vórtex até homogeneizar.

3.4.2 Inoculação e colheita dos órgãos

Uma vez preparado, o conteúdo foi inoculado subcutaneamente (agulha 25x8) em camundongos, onde o número de camundongos utilizados foi, em média, três por amostra.

Os animais permaneceram em observação para o aparecimento de sinais clínicos da toxoplasmose até 45 dias. Estes sinais correspondem a uma dificuldade na locomoção desses animais, havendo uma diminuição no consumo de alimento e água; os pelos dos animais também ficam arrepiados. Os camundongos que apresentaram sinais de infecção, tiveram os cérebros macerados, individualmente, usando gral e pistilo, sendo adicionada uma solução salina fisiológica 0,85% e o homogenado de cada cérebro foi dividido na seguinte maneira: uma parte foi reservada para criopreservação em nitrogênio líquido (usando DMSO 5%, SFB 10% em meio RPMI 1640); uma outra parte foi reservada para análise molecular (gentotipagem do *T. gondii*) e uma parte para subpassagem intraperitoneal em outros 2 camundongos, com o objetivo de obter material estéril para criopreservação e futura adaptação do isolado em cultivo celular.

Os camundongos que não vieram a óbito neste período foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40-90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (1-5 mg/Kg) pela via intraperitoneal. Após constatação da anestesia o animal foi eutanasiado para pesquisa do agente com uso de uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com isoflurano e não houve contato direto do animal com o algodão. A caixa hermeticamente fechada é transparente para facilitar a visualização do momento do óbito do animal, que foi confirmado a seguir pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos. Este protocolo está de acordo com a especificação dos métodos de eutanásia de animais jovens e adultos de roedores e lagomorfos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil.

Dos camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados o líquido ascítico, cérebro e pulmões para pesquisa de taquizoítos e cistos de *T. gondii* como previamente descrito por Dubey e Beattie (1988).

Do cérebro foi analisado um fragmento comprimido entre lâmina e lamínula, para verificar a presença de cistos teciduais, e do pulmão foi realizado um "imprint" em lâmina para visualização de taquízoítos. Para identificação da formação de cistos teciduais, o cérebro de cada camundongo foi macerado em 0,5ml de solução salina a 0,85%, e 25 µl da suspensão de tecido foram examinados por microscopia de luz para contagem de cistos (BOTTIN et al., 2009).

Para coleta do líquido ascítico foi introduzido entre 5,0 a 10 mL de salina estéril a 0,85% no peritônio do camundongo, com uso de seringa e agulha estéril, e aspirado novamente. O material obtido foi depositado em uma lâmina e examinado para pesquisa de taquízoítas em microscópio de luz.

Para retirada dos órgãos foi introduzida uma tesoura pontiaguda na região posterior do crânio do camundongo, promovendo a abertura da calota craniana para retirada do cérebro; a retirada do fígado e dos pulmões foi feita por uma abertura na região torácica e abdominal do camundongo com o auxílio de uma tesoura.

Os animais que sobreviveram até seis semanas pós-inoculação (P.I.), foram examinados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* pelo Teste de Aglutinação Modificada (MAT), sendo realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de São Paulo. Para isso, foram coletados de 200 a 500 µL de sangue pelo plexo venoso mandibular com auxílio de agulha 18G, após os camundongos estarem contidos.

Os camundongos sobreviventes foram mantidos no ensaio por até dois meses P.I., quando então foram submetidos à eutanásia e examinados para a presença de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro, conforme citado acima.

3.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp®DNA Blood Mini Kit (250); para a extração das amostras teciduais (cérebro, coração e gastrocnêmio) foi utilizado o kit comercial DNeasy®Blood & Tissue, também da QIAGEN. As amostras de sangue foram coletadas e armazenadas em tubos contendo EDTA até o momento da extração, sendo que o volume de sangue coletado foi de aproximadamente 4 ml.

Os protocolos de extração de DNA a partir do sangue utilizados foram padronizados por Mattos et al., (2011). No caso das amostras teciduais, foi utilizado o protocolo proveniente do próprio kit de extração.

3.6 Análises moleculares para detecção de *T. gondii*

O teste molecular utilizado para a identificação da presença do parasito nas amostras foi realizado pela reação em cadeia da polimerase do tipo PCR convencional (cPCR). Este tipo de ferramenta da biologia molecular é considerado como um método direto, pois permite a detecção de porções do genoma do parasito em amostras biológicas. Para o controle de reação das amostras obtidas da espécie *M. tridactyla*, foi desenhado um primer (165 pb) para detecção da sequência de DNA presente no genoma da espécie.

3.6.1 cPCR

A identificação do gene *B1* de *T. gondii* foi realizada por cPCR conforme protocolo recentemente publicado pelo grupo de Mattos et al. (2011). A amplificação foi feita em um volume final de 25,0 µl por tubo de reação e preparada com o uso do reagente Go Taq Hot Start Green Master Mix (Promega). Cada tubo de reação (mix) conteve: 25 pmol de cada *oligoiniciador*; 1 U de Taq DNA polymerase; 10,0mM Tris-HCl, pH 8,5; 50,0mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; e 200,0 mM de cada dNTP. Em cada reação de amplificação foram incluídos um controle negativo (água ultrapura) e um controle positivo (DNA extraído de *T. gondii* da cepa RH). Os oligoiniciadores foram o B22 e o B23 os quais amplificam um fragmento de 115 pares de base da região repetitiva do gene *B1* (BURG et al., 1989; COLOMBO et al., 2005).

O ciclo da PCR, para a pesquisa do gene B1 (B22/23), foi realizado inicialmente a 95°C para a pré-desnaturação do DNA alvo, sendo em seguida mantida a 95°C para a desnaturação do mesmo. A temperatura foi reduzida a 62°C para o anelamento dos iniciadores, passando para 72°C para a posterior extensão da cadeia de DNA. Esse ciclo foi repetido 35 vezes, amplificando, dessa forma, o DNA molde.

Posteriormente, os amplicons foram aplicados em gel de agarose a 2%, corado com Sybr®Safe, e a corrida eletroforética foi conduzida por 1 hora a 100V. Após a eletroforese, o gel foi visualizado com o uso de luz UV. O termociclador convencional (Veriti, Applied Biosystems) assim como o sistema de fotodocumentação (AlphaImager mini) estão disponíveis no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, e foram utilizados para a condução dessas etapas.

3.7 Genotipagem por RFLP

Os experimentos de genotipagem foram realizados pela reação de Multilocus PCR-RFLP utilizando-se 12 marcadores genéticos (SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2, Apico e CS3), que estão descritos na Tabela 1. Os ensaios iniciais foram conduzidos com o apoio da Dra. Hilda F. J. Pena do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, e do Dr. Chunlei Su (Department of Microbiology/University of Tennessee, Knoxville, E.U.A).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR-RFLP e enzimas de restrição.

Marcador	Iniciadores externos 5' → 3'	Iniciadores internos 5' → 3'	(RFLP) ^a
SAG1	GTTCTAACCACGCACCCTGAG AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	CAATGTGCACCTGTAGGAAGC GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Sau96I+HaeII (digestão dupla)
5'-SAG2	GCTACCTCGAACAGGAACAC GCATCAACAGTCTTCGTTGC	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3 AI
3'-SAG2	TCTGTTCTCCGAAGTGAC TCC TCAAAGCGTGCATTATCG C	ATTCTCATGCCTCCGCTTC AACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI
SAG3	CAACTCTCACCATTCCACCC GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA TCTTGTGCGGGTGTCACTCA	NciI
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCAAGAGTTGACATAG	MseI
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI+TaqI (digestão dupla)
c22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTCCG	BsmA I, Mbo II
c29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATACAT	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTCCG	BsmA I, Mbo II
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAGTGCT	Hae III, Nla III
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	CGCAAAGGGAGACAATCAGT TCATCGCTGAATCTCATTGC	Ava I, Rsa I
SAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTCCGACCAGCGGGAGCAC	Hinf I, Taq I
Apico	TGGTTTTAAACCCTAGATTGTGG AAACGGAATTAATGAGATTGA	TGCAAATTTCTGAATTCTCAGT	Hinf I, Taq I
CS3	GTGTATCTCCGAGGGGGTCT TGTGACTTCTTCGCATCGAC	GGGATTCTGAACCCCTTGATA AGCGGATTTCCAACACTGTC CTGCTGCATTACAAACTCC	NlaIII, MboI

Os primers dos 12 marcadores, sense e anti-sense, foram colocados (0,15µL) em um tubo tipo eppendorf de 2ml, com concentração de 25µM para cada primer. A esse tubo

também foi adicionado o tampão, a água, os dNTPs, a Taq, totalizando 23,5µL de mix e 1,5µL da amostra de DNA obtida a partir do isolado (Tabela 02). Após esse preparo, o mix foi levado ao termociclador. O ciclo da PCR foi realizado inicialmente a 95°C para a pré-desnaturação do DNA alvo por 4 minutos, sendo em seguida mantido um ciclo de 25 vezes à 94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

Tabela 02. Reagentes utilizados na PCR Multiplex

H ₂ O	16.5µl
PCR buffer (Mg-)	2.5µl
dNTPs (2.5mM cada)	2.0µL
25 mM MgCl ₂	2.0µl
Primer forward (25µM cada)	0.15µl
Primer reverse (25µM cada)	0.15µl
<u>FastStart Taq (5U/µL)</u>	<u>0.20µl</u>
	23.5µl

Desse pré-amplificado da PCR Multiplex, foi retirado 1,5µL e colocado em tubos tipo eppendorf e adicionado 0,15µL de primer à 50µM (sense e anti-sense), sendo um primer (sense e anti-sense) para um tubo. Também foram adicionados os reagentes em cada tubo, conforme a Tabela 03. A Nested PCR foi realizada inicialmente a 95°C para a pré-desnaturação do DNA alvo por 4 minutos, sendo em seguida mantido um ciclo de 35 vezes à 94°C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72°C por 1.5 minutos. Para o marcador Apico, foram mantidas as seguintes temperaturas do ciclo: 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 min e 72°C por 2 minutos.

Tabela 03. Reagentes utilizados na PCR Nested.

H ₂ O	16.5µl
PCR buffer (Mg-)	2.5µl
dNTPs (2.5mM cada)	2.0µL
25 mM MgCl ₂	2.0µl
Primer forward (50µM cada)	0.15µl
Primer reverse (50µM cada)	0.15µl
<u>FastStart Taq (5U/µL)</u>	<u>0.20µl</u>
	23.5µl

Posteriormente, foram retirados 5 μ L do produto da PCR para serem colocados no gel de agarose, à 1.5%. A corrida eletroforética foi conduzida a 120V, por aproximadamente 1.5h. Para cada marcador molecular foi feito um gel de agarose. Para os controles foram utilizadas as cepas RH (tipo I), PTG (tipo II) e CTG (tipo III) e também dois controles negativos, (C-) e células HFF (Human Foreskin Fibroblasts).

4 RESULTADOS

Das 23 amostras sorológicas dos animais da espécie *M. tridactyla* que foram testadas, 13 apresentaram sorologia reagente para anticorpos anti-*T. gondii* (Tabela 4).

Entre as 7 amostras de soro dos camundongos analisadas, coletadas após a prévia inoculação dos tecidos das amostras de *M. tridactyla* nesses camundongos, apenas uma delas indicou titulação reagente para anticorpos anti-*T. gondii* (Tabela 5) e dessa amostra foi possível obter-se o isolado, conforme comprovado na Figura 4. A seta indica a presença dos cistos de *T. gondii*, obtidos nas lâminas histológicas do tecido cerebral dos camundongos inoculados que responderam positivamente à infecção. A sorologia do tamanduá-bandeira do qual foi possível isolar o parasito em seus tecidos apresentou titulação reagente de 1 :100 e a sorologia do camundongo que havia sido inoculado com os tecidos desse mesmo tamanduá-bandeira apresentou sorologia reagente de 1:25.

Tabela 4. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Teste de Aglutinação Modificada [MAT] \geq 1:25) em amostras de tamanduá-bandeira da região noroeste do Estado de São Paulo.

Nº Amostras Reagentes/ Nº Amostras Testadas	Titulações	Localidades*
13/23 (56,52%)	25 (5), 50 (2), 100 (2) 200 (2), 500 (1), 1600 (1)	C (1), J (2), N (2), NP (1), B (1), NG (1), SJRP (10), V (3), JB (2)

* C: Catanduva, J: Jales, N: Nipoã, NP: Neves Paulista, B: Buritama, NG: Nova Granada, SJRP: São José do Rio Preto, V: Votuporanga, JB: José Bonifácio.

Tabela 5. Detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (Teste de Aglutinação Modificada [MAT] \geq 1:25) em amostras sorológicas dos camundongos previamente inoculados com amostras teciduais de tamanduá-bandeira.

Amostras analisadas	Nº Reagentes/Nº Amostras Testadas	Titulação
Soro de camundongos	1/7 (14,28%)	\geq 25

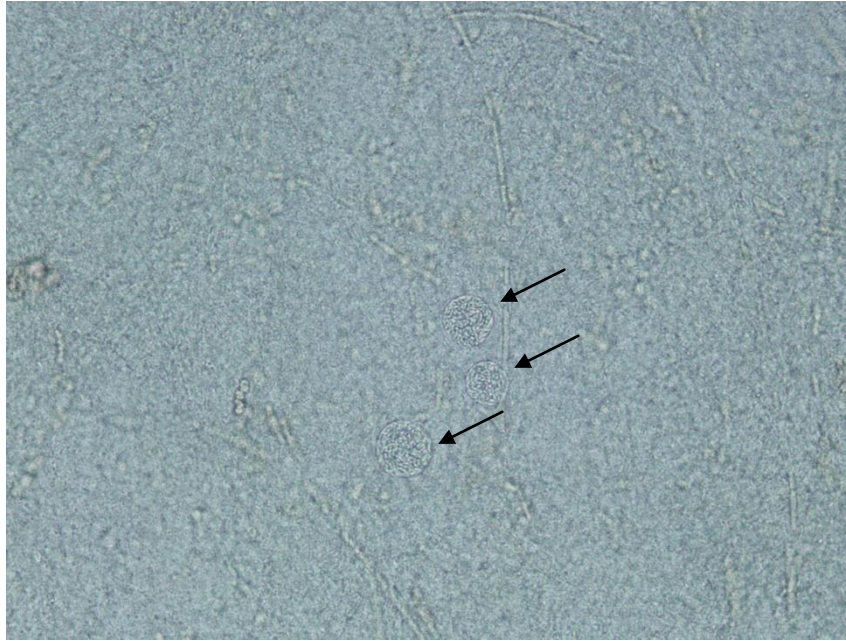


Figura 4. Cistos teciduais de bradizoítos localizados no cérebro de camundongo infectado pelo parasito *T. gondii*.

O controle de reação realizada nas amostras de DNA obtidas do tamanduá-bandeira, apresentaram amplificação em todas as amostras testadas (Figura 5).

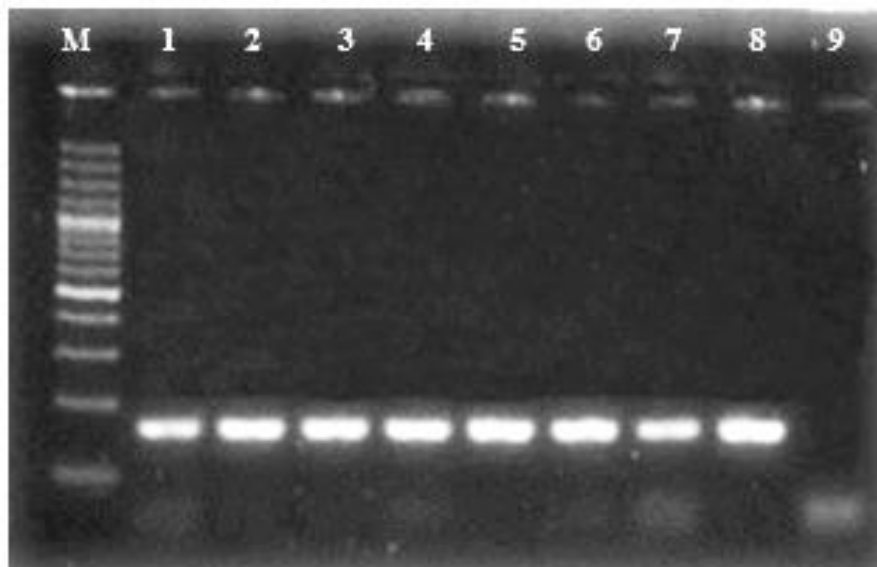


Figura 5. Fotodocumentação do Gel de Agarose da reação controle das amostras de DNA de *M. tridactyla* realizada por cPCR.

As PCRs realizadas na tentativa de amplificação do material genético do parasito, em amostras de sangue periférico de *M. tridactyla*, reagentes no MAT, não apresentaram bandas

correspondentes ao número de pares de base do gene B1, não sendo possível, então, amplificar o DNA do parasito circulante no sangue (Figura 6).



Figura 6. Fotodocumentação do Gel de Agarose da cPCR para tentativa de amplificação do material genético do parasito *T. gondii* a partir de amostra de DNA de *M. tridactyla*

A partir do isolado de uma amostra foi possível realizar a genotipagem do material genético de *T. gondii*. Os resultados obtidos pela amplificação dos 12 marcadores moleculares indicaram que a linhagem pertencente ao parasito é o TypeBrIII, sendo este genótipo encontrado pela primeira vez em animais silvestres (Tabela 6; Figura 7)

Tabela 6. Resultado da genotipagem obtido utilizando-se os 12 marcadores moleculares.

PCR-RFLP							ToxoDB RFLP genotype
Marcadores	SAG1	SAG2	altSAG2	SAG3	BTUB	GRA6	#08 (Type BrIII)
Genótipo	I	III	III	III	III	III	
Marcadores	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	
Genótipo	II	III	III	III	III	III	

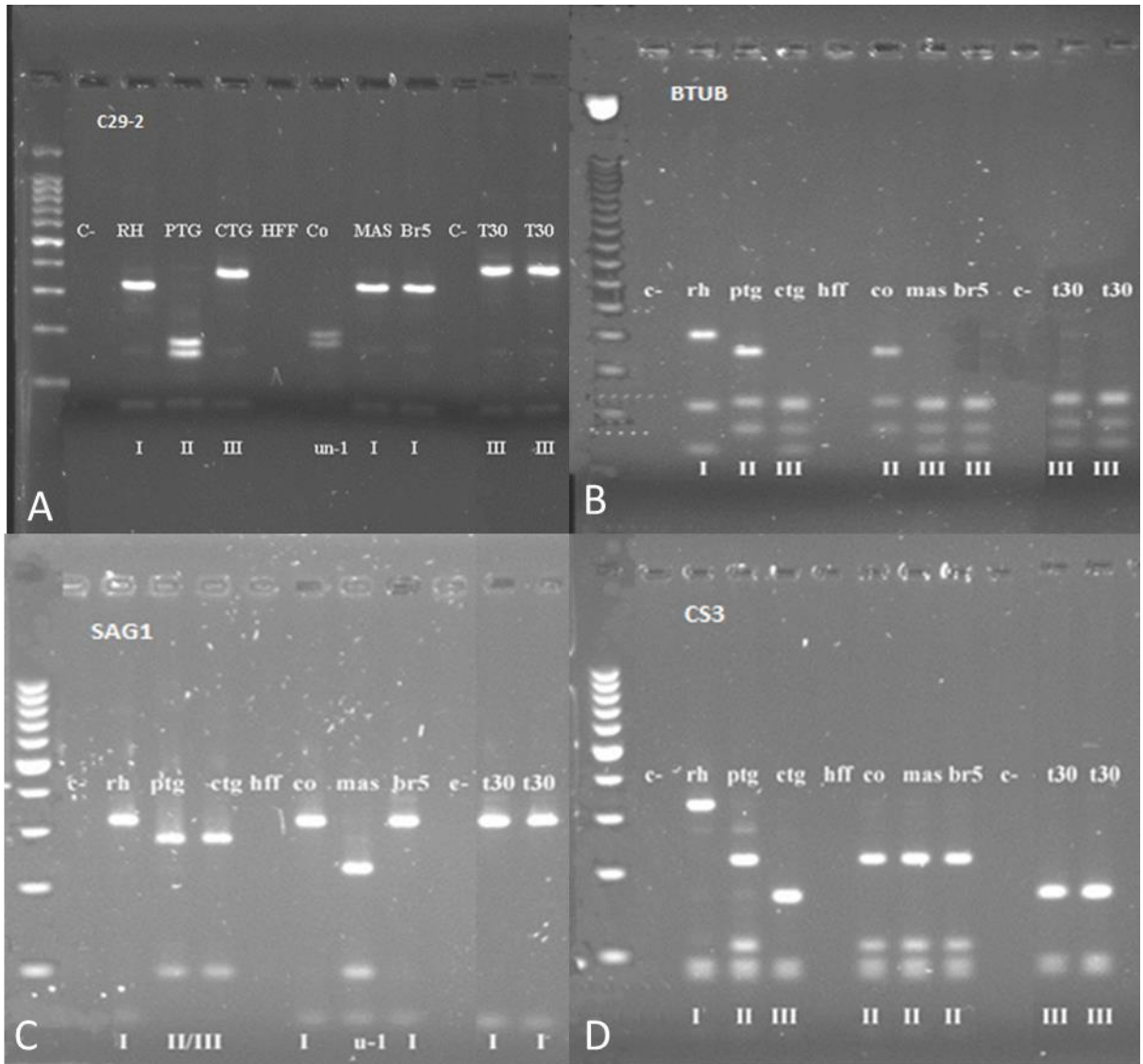


Figura 7. Genotipagem do material genético do isolado de *T. gondii* segundo os marcadores C29-2 (A); BTUB (B); SAG1 (C) e CS3 (D)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo aponta resultados inéditos relacionando a obtenção e caracterização de isolados de *Toxoplasma gondii* provenientes de amostras coletadas da espécie *Myrmecophaga tridactyla*. Até o presente, não há relatos na literatura sobre isolados do parasito obtidos a partir de amostras teciduais de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Esta espécie, de acordo com a IUCN (2014), possui o status vulnerável de ameaça, com uma tendência de decréscimo populacional.

A escolha desta espécie para este estudo é devido a alguns fatores importantes, como o crescente interesse de pesquisadores da área em isolar o *T. gondii* em *M. tridactyla*, por tratar-se de uma espécie de mamífero que habita áreas naturais próximas às regiões urbanas. Esta espécie é um reservatório de zoonoses na natureza, aumentando o risco de infecção entre os animais e o próprio homem (JUNGE; FISHER; DUBEY, 2007); a quantidade de taquizoítos de *T. gondii* é consideravelmente elevada no sangue de hospedeiros silvestres em fase aguda, o que facilita o estudo de diferentes aspectos desta infecção (DUBEY et al., 2012). Essa espécie animal, como relatado anteriormente, apresenta-se vulnerável, vítima da fragmentação de habitats e interferência antrópica e a toxoplasmose, doença causada por este parasito, pode ser considerada um fator agravante desta situação. Assim, o conhecimento da epidemiologia desta importante zoonose pode acrescentar dados importantes para a conservação desta espécie (FONTANA et al., 2003).

A doença causada por este parasito é considerada, epidemiologicamente, uma infecção de ampla distribuição geográfica, pois ela se encontra em regiões de todo o planeta. Estudos relatando a toxoplasmose em animais apontam índices de sorologia positiva que variam de 23 a 83%, os quais são dependentes de fatores socioeconômicos, climáticos e culturais (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009). Ainda, conforme relatado por Vidotto (1992), pesquisadores chegaram a encontrar índices de até 90% em alguns casos, dependendo da região do estudo em questão e também da espécie estudada.

O Teste de Aglutinação Modificada (MAT) vem sendo utilizado consideravelmente para estudos de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de animais. Tanto a sensibilidade como a especificidade deste Teste foi validada por meio da comparação de dados sorológicos e o isolamento do parasito a partir de suínos natural e experimentalmente infectados (DUBEY et al., 1995; DUBEY, 1997).

Existem inúmeros trabalhos na literatura que relatam a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em diversos animais silvestres. Porém, são escassas as publicações que tratam da presença de anticorpos anti-*T. gondii* na espécie do tamanduá-bandeira.

Em um trabalho realizado por Vitaliano et al. (2014), o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) foi conduzido em amostras sorológicas de algumas espécies de aves e mamíferos, entre as quais duas eram da espécie *Myrmecophaga tridactyla*. O teste apontou que nessas duas amostras existiam anticorpos anti-*T. gondii*, com titulações de 100 e 800.

Carneiro et al. (2014), ao realizarem um inquérito sorológico de infecção por *T. gondii* em 70 mamíferos neotropicais, dentre os quais seis eram da espécie *Myrmecophaga tridactyla*, obtiveram reação positiva em apenas duas espécies: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e macaco-prego (*Cebus libidinosus*). A sorologia para os seis exemplares da espécie de tamanduá-bandeira apontaram resultados negativos, o que reforça a importância dos nossos achados, com sorologia reagente em 56,52 % (13/23) das amostras testadas.

Dubey et al. (1995), ao realizarem uma pesquisa comparativa de testes sorológicos na identificação de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de mil porcas, obtiveram com base no MAT um percentual de 22.2 % de sorologia reagente. Ao utilizarem a metodologia do Teste Indireto de Hemaglutinação, a porcentagem obtida foi de 6,4 %, ao passo que o Teste de Aglutinação do Látex foi de 10.4 %. O último método testado, ELISA, teve um valor de 24.1 % de sorologia reagente. Ao calcularem a sensibilidade dos métodos, foi verificado que o MAT obteve a maior sensibilidade entre todos os testes sorológicos utilizados.

Os inquéritos sorológicos, quando utilizados isoladamente, não fornecem informações sobre a prevalência de parasitas viáveis. De fato, linhagens de *Toxoplasma* já têm sido isoladas a partir de animais soronegativos. Por outro lado, a detecção direta do parasita (métodos moleculares) é frequentemente negativa em animais soropositivos (OPSTEEGH et al., 2011). Essa informação condiz com os resultados obtidos, no presente trabalho, pela cPCR e realizadas com o DNA das amostras de *M. tridactyla*, onde não foi possível detectar a presença de amplificação de bandas relativas ao número de pares de base do fragmento de DNA do parasito (115pb).

A sequência do primer utilizado na cPCR para detectar o gene do parasito (gene B1) nas amostras biológicas tem uma repetição de 35x no genoma do parasito (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012) e essa região do genoma do parasito se encontra bem conservada. Entretanto, a detecção do parasito em amostras de DNA extraídas a partir do sangue é muito difícil, sendo raros os casos onde é possível a detecção, tais como infecção aguda. O número de cópias do alvo dentro do genoma aumenta a sensibilidade do método

empregado (HOMAN et al., 2000). Em casos onde essa detecção é realizada, é muito provável que o animal esteja em uma fase aguda onde a parasitemia é elevada.

O isolamento do parasito *T. gondii* em animais selvagens pode demandar tempo, é um procedimento caro e de difícil realização. A qualidade do DNA de animais selvagens naturalmente infectados é geralmente pobre, pois a densidade do parasito nos tecidos de animais assintomáticos é baixa e a maioria dos tecidos é frequentemente coletada muito tempo depois da morte dos animais (DUBEY et al., 2011).

Em um estudo realizado por Silva et al., (2006), no qual um inquérito sorológico foi realizado para um grupo de animais silvestres, foi relatado que, mesmo os resultados do Teste de Aglutinação Modificada apresentaram sorologia reagente para anticorpos anti-*T. gondii*, o resultado do teste sorológico proveniente dos camundongos inoculados previamente com amostras cerebrais desses animais silvestres não apresentaram sorologia reagente. Esses resultados corroboram alguns casos ocorridos nas amostras testadas de *M. tridactyla* no presente estudo, em que quatro amostras sorológicas foram reagentes, porém, ao ser feita a análise sorológica dos camundongos inoculados com tecidos de *M. tridactyla*, não foram encontrados anticorpos para o parasito.

A genotipagem do parasito, utilizando-se a técnica de PCR-RFLP, é a mais amplamente difundida, desenvolvida por Howe et al. em 1997. Os marcadores usados na PCR-RFLP tem sido usados para identificar os isolados de *T. gondii* de uma variedade de hospedeiros em diferentes regiões do mundo (PENA et al., 2008; SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

Vitaliano et al., (2012), realizaram o isolamento do parasito de diversos animais silvestres provenientes dos Estados de São Paulo, Pará, Minas Gerais e Pernambuco através do bioensaio em camundongos, como exemplos: tatu-peba, coruja-buraqueira, paca, mucura, tamanduá-mirim, tatu-galinha, queixada, gato-do-mato-pequeno, raposa-do-campo, lobo-guará, pica-pau-da-banda-branca. A genotipagem do parasito isolado desses animais indicou a presença de genótipos novos e, também, dos genótipos BrI e BrII.

Os resultados de genotipagem encontrados no presente trabalho, de acordo com o ToxoDB RFLP genotype, indicou a presença do genótipo #8 (Type BrIII), o qual ainda não havia sido encontrado em isolados de animais silvestres.

O mesmo genótipo foi detectado em humanos, em uma única paciente com toxoplasmose congênita, no Oeste de Minas (CARNEIRO et al., 2013) e em uma amostra obtida em cachorro doméstico (SILVA et al., 2014).

Embora os animais silvestres possam desempenhar um importante papel na transmissão e manutenção do *T. gondii* no meio ambiente, as informações sobre a circulação desse parasito nesses animais são limitadas (DUBEY et al., 2011; PENA et al., 2011; CABRAL, et al., 2013). Com o presente estudo é possível verificar que a espécie *M. tridactyla* apresenta a infecção pelo parasito e que a provável forma de aquisição dessa infecção é o contato com os oocistos do parasito, encontrados dispersos pelo meio ambiente. Dessa forma, a interferência antrópica pode ter sido um dos fatores que levou a espécie a ter um maior contato com zonas domiciliares e, conseqüentemente, com animais domésticos (gatos, principalmente, visto que somente os felinos são capazes de eliminar os oocistos pelas fezes) previamente infectados.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimeto do presente estudo possibilitou a obtenção das seguintes conclusões:

- a espécie *Myrmecophaga tridactyla* apresenta infecção por *Toxoplasma gondii*;
- a genotipagem de *T. gondii* indica a presença do genótipo #8 (Type BrIII), inédito em animais silvestres de vida livre;
- a infecção de *Myrmecophaga tridactyla* por *T. gondii* atesta uma provável contaminação ambiental;
- tendo em vista o hábito forrageador de *Myrmecophaga tridactyla*, o mesmo apresenta um importante papel na cadeia epidemiológica da toxoplasmose na Região Noroeste do Estado de São Paulo.

7 REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D. et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 34, p. 1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1940-1943, 2005.
- ALMEIDA, M.F.C. Boas práticas de laboratório. São Caetano do Sul: Difusão, 2008.
- BEVERLEY, J.K.A.; WATSON, W.A. Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. **Veterinary Record**, v. 73, p. 6-11, 1961.
- BEYER, T.V.; SHEVKUNOVA, E.A. A review of toxoplasmosis of animals in the U.S.S.R. **Veterinary Parasitology**, v. 19, p. 225-243, 1986.
- BOTTIN, J.M.P. et al. Comparação da formação de cistos teciduais, peso de órgãos e cinética de anticorpos em camundongos Swiss inoculados com *Toxoplasma gondii*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 519-527, 2009.
- BOYLE, J.P. et al. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.**, v. 103, p. 10514-10519, 2006.
- BURG, J. L. et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989.
- CABRAL, A.D. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 100-104, 2013.
- CARNEIRO, A.C. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901-907, 2013.
- CARNEIRO, B.F. et al. Inquérito sorológico para *Toxoplasma gondii* em mamíferos neotropicais mantidos no centro de triagem de animais silvestres, Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 1, p. 69-78, 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DPDx – Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html> . Acesso em: 05 abr. 2016.

COLOMBO, F.A. et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5044-5047, 2005.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 562-568, 1980.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, p. 1- 220, 1988.

DUBEY, J.P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 259-262, 1990.

DUBEY, J.P. et al. Serologic and histologic diagnosis of toxoplasmi abortions in sheep in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 16, n. 2, p. 291-294, 1990.

DUBEY, J.P. et al. Sensitivity and specificity of various serologic testes for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1030-1036, 1995.

DUBEY, J.P. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 307-310, 1997.

DUBEY, J.P. et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1063-1064, 2003.

DUBEY, J.P. et al. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1139-1147, 2011.

DUBEY, J.P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 10, p. 1-58, 2012.

ELMORE, S.A. et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, 2010.

EMMONS, L.H. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. 2 ed. Chicago: University of Chicago press, 1997.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERREIRA, I.M.R. et al. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 221-227, 2008.

FERREIRA, I.M.R. et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 190-195, 2011.

FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M.C.; ARAUJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.

FONSECA, G. A. B. da. et al. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology**. 4 ed. Belo Horizonte: Conservation International; Fundação Biodiversitas, 1996.

FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. (eds.). **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003.

GRIGG, M.E. et al. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p.161-165, 2001.

HARTLEY, W.J.; MARSHALL, S.C. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 5, n. 4, p. 119-124, 1957.

HOMAN, W.L. et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCRp. **International Journal for Parasitology**. v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HOWE, D.K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

IUCN. Red List of Threatened Species. Disponível em : <http://www.iucnredlist.org/details/14224/0>. Acesso em: 05 abr. 2016.

JUNGE, R.E.; FISHER, J.R.; DUBEY, J.P. Fatal disseminated toxoplasmosis in captive gazelle. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, p. 342-345, 2007.

KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KHAN, A. et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KHAN, A. et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A, v. 104, p. 14872-14877, 2007.

KHAN, A. et al. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v. 2, n. 6, 2011.

LEHMANN, T. et al. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 960-971, 2000.

MARQUES, L.C.; COSTA, A.J. Experimental sheep toxoplasmosis. I. Clinical, haematological and immunological observations. **Ars Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 57-67, 1985.

MATTOS, C.C.B. et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 362-366, 2011.

MELLO, U. Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 3, p. 359-363, 1910.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences**, v. 148, p. 369-372, 1909.

OLAFSON, P.; MONLUX, W.S. Toxoplasma infection in animals. **Cornell veterinarian**, v. 32, p. 76-190, 1942.

OLIVEIRA, F.S. et al. Vestibular syndrome in giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 683-686, 2009.

OPSTEEGH, M. et al. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 343-354, 2011.

PENA, H.F. et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 58-67, 2006.

PENA, H.F. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.

PENA, H.F. et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarondi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 377-381, 2011.

PENA, H.F. et al. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-2, p. 111-117, 2013.

RAJENDRAN, C. et al. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 359-368, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-96, 2012.

SIBLEY, L.D. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 364, p. 2749–2761, 2009.

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82-85, 1997.

SILVA, A.V. et al. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 81-83, 2006.

SILVA, R.C. et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal Type II strain identified. **Veterinary Parasitology**. 175, 173-177, 2011.

SILVA, L.A. et al. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *Plos One*. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090237>

SOARES, L. L. **Estrutura e formação do cisto tecidual de *Toxoplasma gondii***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Biofísica). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti puntil il Kala-azar dell'uomo. **Rev Soc Scien São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SU, C. et al. Recent expansion of *Toxoplasma* though enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, p. 414-416, 2003.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.

SULLIVAN, Jr. W.J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717-733, 2011.

THOISY, B. et al. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 2, p. 456-459, 2003.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 405-410, 2002.

VALLOCHI, A.L. et al. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 350-351, 2005.

VIDOTTO, O. et al. Toxoplasmose experimental em suínos. I. observações clínicas e hematológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 4, p.623-639, 1987.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

VITALIANO, S.N. *Isolamento e caracterização biológica e genotípica de Toxoplasma gondii em animais selvagens do Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.

VITALIANO, S.N. et al. Serologic evidence of toxoplasma gondii infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 45, n. 1, p. 197-199, 2014.

WALZER, K.A; BOYLE, J.P. A Single Chromosome Unexpectedly Links Highly Divergent Isolates of *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v. 3, n. 1, 2012.