

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 11/06/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INVESTIGAÇÃO DE ENDOPARASITAS EM LEBRES
EUROPEIAS (*Lepus europaeus*) NO BRASIL**

Carmen Andrea Arias Pacheco
Médica Veterinária

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INVESTIGAÇÃO DE ENDOPARASITAS EM LEBRES
EUROPEIAS (*Lepus europaeus*) NO BRASIL

Discente: Carmen Andrea Arias Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva.

P116i Pacheco, Carmen Andrea Arias
Investigação de endoparasitas em lebres europeias (*Lepus europaeus*) no Brasil / Carmen Andrea Arias Pacheco. --
Jaboticabal, 2024
117 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Estevam Guilherme Lux Hoppe

1. Coccidiose. 2. Espécies invasoras. 3. Helmintologia
veterinária. 4. Relação hospedeiro-parasito. 5. Toxoplasmose.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente estudo oferece informações sobre os endoparasitas presentes na lebre europeia, uma espécie exótica invasora cuja situação sanitária no Brasil é desconhecida e que pode representar um risco para outras espécies de lagomorfos nativos, animais domésticos e para os humanos. Os resultados deste trabalho poderão ser usados na implementação de programas de manejo da espécie e educação sanitária.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study offers information about the endoparasites present in the European brown hare, an invasive alien species whose health status in Brazil is unknown and which may represent a risk to other species of native lagomorphs, domestic animals, and humans. The results of this work can be used to implement species management and health education programs.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INVESTIGAÇÃO DE ENDOPARASITAS EM LEBRES EUROPEIAS (*Lepus europaeus*) NO BRASIL

AUTORA: CARMEN ANDREA ARIAS PACHECO

ORIENTADOR: ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP



Documento assinado digitalmente
ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Data: 03/01/2024 16:03:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOÃO LUIS GARCIA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Londrina/PR

Prof. Dr. LUIZ DANIEL DE BARROS (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Estadual de



Documento assinado digitalmente
LUIZ DANIEL DE BARROS
Data: 28/12/2023 21:36:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
ANA CLAUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE
Data: 03/01/2024 12:58:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de dezembro de 2023



Documento assinado digitalmente
MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Data: 28/12/2023 21:55:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
JOAO LUIS GARCIA
Data: 28/12/2023 12:21:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARMEN ANDREA ARIAS PACHECO – nascida em 07 de março de 1991, é natural da cidade de Lima, Peru. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária no ano de 2009, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional Mayor de San Marcos (FMV/UNMSM), tendo finalizado a mesma em dezembro de 2014. Trabalhou no setor privado na área da Clínica Médica de pequenos animais desde janeiro de 2015 até janeiro de 2018 na cidade de Lima. Durante o período de março de 2018 até fevereiro de 2020 realizou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, onde foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em março de 2020 iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária pela mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Estevam G. Lux Hoppe, professor responsável do Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais (LabEPar), do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única (DPRSU), sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“O que vale na vida não é ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher”

Cora Coralina

*Dedico este trabalho, primeiramente, à
Deus, meu guia e socorro nos momentos
difíceis.*

*Aos meus pais Patricia e Amador,
aos meus irmãos Raquel, Karen,
Giovanna e Andrés,
aos meus sobrinhos Adrian, Diego, Mateo,
Thiago, Nicolás, Luciano e Facundo,
e ao meu noivo, Diego Sodré.
Vocês foram meus maiores incentivadores
nessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente ao meu orientador, Prof. Dr. Estevam, pela parceria e apoio na realização deste trabalho, por todos os ensinamentos que ajudaram a melhorar meu pensamento crítico e construtivo fundamentais para o meu crescimento como pesquisadora. Muito obrigada pela amizade, pelo otimismo, pelas conversas e pelos bolos da tarde compartilhados que deixaram mais leves os dias difíceis.

Aos professores, Dr. João Luis, Dr. Daniel, Dr. Marcos e Dra. Cláudia, pelas relevantes contribuições feitas na qualificação e na defesa, permitindo o desenvolvimento de um trabalho com melhor qualidade.

À equipe LabEPar, em especial aos meus amigos Patricia, Wilson, Talita, Livia, Jonathan e Natália, pela ajuda, apoio, companheirismo e amizade desde o começo até o final deste trabalho. Obrigada por dividir comigo os árduos dias de trabalho, mas também por todos os momentos de descontração compartilhados, sem dúvida são pessoas que levarei para a vida.

Ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em especial aos professores Dr. João Luis e Dr. Daniel, e aos meus amigos Ana, Pablo e Douglas, pela parceria, colaboração e disposição na realização desta pesquisa. Obrigada pela hospitalidade, pelas conversas e pela confiança oferecida.

À FCAV/Unesp e a todos os docentes que a compõem, obrigada pelos conhecimentos passados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço profundamente a todas as pessoas que possibilitaram de alguma forma o desenvolvimento deste trabalho e formaram parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	iv
ICMBio/SISBIO: Autorização para atividades com finalidade científica	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Coccidiose	3
2.2. Helmintoses	5
2.3. Toxoplasmose.....	7
3. Conclusão.....	11
4. Referências.....	12
CAPÍTULO 2 – <i>Toxoplasma gondii</i> infection in European Brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil.....	24
Abstract	24
1. Introduction	25
2. Material and methods.....	26
2.1. Ethics statement and research authorization	26
2.2. Study area and sample collection	26
2.3. Mouse bioassay.....	27
2.4. Histopathology	28
2.5. Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)	28

2.6. DNA extraction.....	28
2.6. Molecular analysis	29
2.7. Data analysis and statistics	30
3. Results	31
4. Discussion	33
5. Conclusion	37
6. Funding and acknowledgments	37
7. References	38
 CAPÍTULO 3 – A coproparasitological survey of European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil.....	44
Abstract	44
1. Introduction	45
2. Material and methods.....	46
2.1. Ethics statement and research authorization	46
2.2. Study area and sample collection	46
2.3. Coproparasitological examination.....	47
2.4. Statistical analysis	48
3. Results and Discussion.....	48
4. Conclusion.....	67
5. Funding and acknowledgements	67
6. References	68
 CAPÍTULO 4 – Integrative taxonomy of helminth parasites of the invasive European brown hare (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil.....	73
Abstract	73
1. Introduction.....	74
2. Material and Methods.....	74

2.1. Ethics statement and research authorization	74
2.2. Study area and sample collection	75
2.3. Parasitology assessment	76
2.4. DNA extraction	76
2.5. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing.....	76
2.6. Phylogenetic analysis	78
2.7. Statistical analysis	78
3. Results	79
4. Discussion	87
5. Conclusion	89
6. Funding and acknowledgements	90
7. References	91
CAPÍTULO 5 – Considerações Finais	97



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Distribuição e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em lebres europeias (*Lepus europaeus*)**", protocolo nº 3666/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de setembro de 2020.

Vigência do Projeto	01/09/2020 a 31/12/2023
Espécie / Linhagem	<i>Lepus europaeus</i> (Lebre europeia)
Nº de animais	De acordo com o sucesso de captura
Peso / Idade	Variado
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Vida livre

Jaboticabal, 17 de setembro de 2020.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



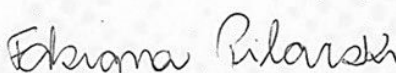
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Helmintos parasitas de lebre europeia de vida livre *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Logomorpha: Leporidae) na região de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica, Brasil**", protocolo nº 006459/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de maio de 2018.

Vigência do Projeto	16/05/2018 a 05/08/2020
Espécie / Linhagem	<i>Lepus europaeus</i> (Lebre europeia)
Nº de animais	Dependência de sucesso de captura
Peso / Idade	Variados
Sexo	Variados
Origem	Vida livre

Jaboticabal, 10 de maio de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75273-6	Data da Emissão: 08/12/2022 07:29:20	Data da Revalidação*: 01/06/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carmen Andrea Arias Pacheco	CPF: 238.986.548-85
Título do Projeto: DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENOTÍPICA DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM LEBRES EUROPEIAS (<i>Lepus europaeus</i>)	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa científica	08/2020	12/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Estevam Guilherme Lux Hoppe	Coleta e análise de dados	216.001.668-30	Brasileira
2	JULIO CESAR DE CARVALHO	Captura de animais	353.406.038-57	Brasileira
3	Eduardo Patricio Nogueira	Captura de animais	322.723.348-73	Brasileira
4	Guaracy Argondizio Nogueira	Captura de animais	019.863.908-29	Brasileira
5	Sérgio Vieira Goe	Captura de animais	178.743.708-64	Brasileira
6	Domingos Stuchi Junior	Captura de animais	476.529.006-97	Brasileira
7	Paulo Henrique Pompeo	Captura de animais	150.808.108-58	Brasileira
8	Daniel Henrique Spoto	Captura de animais	224.021.088-51	Brasileira
9	Cristian Bozeli	Captura de animais	434.121.648-10	Brasileira
10	Hélio de Fátima Castanharo	Captura de animais	864.150.188-68	Brasileira
11	Fábio Augusto Scalli	Captura de animais	212.617.428-00	Brasileira
12	Luiz Antonio Vanalli	Captura de animais	090.260.248-94	Brasileira
13	Marcos Vinicius Vanalli	Captura de animais	496.647.818-94	Brasileira
14	Cesar Pissolato	Captura de animais	257.161.038-47	Brasileira
15	PAULO MARIN	captura de animais	808.429.099-15	Brasileira
16	César Rodrigo Bigaram Pretel	Captura de animais	164.046.468-97	Brasileira
17	Gabriel Rebouças de Souza	Captura de animais	453.559.048-66	Brasileira
18	Adilson Juliano Alves	Captura de animais	287.248.408-66	Brasileira
19	Ademilson Luiz Alves	Captura de animais	275.665.818-99	Brasileira
20	João Paulo Geraigire Mielli	Captura de animais	081.601.088-93	Brasileira
21	Fernando de Oliveira Carvalho	Captura de animais	278.406.068-30	Brasileira
22	PAULO RICARDO DAINEZ	Captura de animais	267.537.178-54	Brasileira
23	Hélio Carlos Mancini de Castro	Captura de animais	168.985.568-19	Brasileira
24	José Roney Benaducci Júnior	Captura de animais	393.244.138-99	Brasileira
25	Wilson Ardenghe	Captura de animais	038.671.248-41	Brasileira
26	Osmar Lucas Mialichi	Captura de animais	087.528.118-40	Brasileira
27	DOUGLAS WUTZKE	Captura de animais	051.043.989-60	Brasileira
28	PAULO MARIN FILHO	Captura de animais	098.506.339-48	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0752730620221208

Página 1/6



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63174-1	Data da Emissão: 04/06/2018 11:59	Data para Revalidação*: 04/07/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Danise Benatti	CPF: 030.682.040-46
Título do Projeto: Helmintos parasitas de lebre europeia de vida livre <i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778 (Logomorpha: Leporidae) na região de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica, Brasil	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento bibliográfico	05/2018	08/2018
2	Acompanhamento das equipes de manejo de fauna e coleta de amostras	05/2018	08/2019
3	Processamento das amostras	08/2018	09/2019
4	Redação de artigo e tese	06/2019	11/2019
5	Análise dos dados	08/2019	12/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Estevam Guilherme Lux Hoppe	Coleta e análise de dados	216.001.668-30	304783602 SSP-SP	Brasileira
2	JULIO CESAR DE CARVALHO	Captura de animais	353.406.038-57	43231902-5 SSP-SP	Brasileira
3	MARDQUEU SILVIO FRANCA FILHO	Captura dos animais	045.709.348-03	279419399 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BEBEDOURO	SP	Zona Rural	Fora de UC Federal
2	MONTE AZUL PAULISTA	SP	zona rural	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 65475988



INVESTIGAÇÃO DE ENDOPARASITAS EM LEBRES EUROPEIAS (*Lepus europaeus*) NO BRASIL

RESUMO – A lebre europeia (*Lepus europaeus*) é uma espécie invasora no Brasil. No mundo, as espécies invasoras ameaçam a biodiversidade pela alteração do equilíbrio dos ecossistemas e podem causar prejuízos econômicos e ter impacto negativo na saúde humana e animal. Portanto, esta tese teve por objetivo identificar e descrever os endoparasitas de lebres europeias no Brasil. Para isso, 90 lebres foram capturadas nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (18 lebres entre junho 2018 e outubro 2019, e 72 lebres entre julho 2020 e junho 2022). A avaliação de infecção por *Toxoplasma gondii* foi realizada em 72 animais por bioensaio em camundongos, histopatologia de cérebro, fígado, pulmão, rim e intestino delgado corados com hematoxilina-eosina, RIFI e análises moleculares (PCR e qPCR). A avaliação coproparasitológica foi realizada nos 90 animais usando técnicas qualitativas (centrífugo-flutuação de Sheater e sedimentação de Hoffman) e quantitativas (técnica de Gordon e Whitlock modificada por Ueno e Gonçalves). A avaliação da helmintofauna se realizou nos 90 animais por observação e coleta de helmintos no cérebro, coração, pulmões, fígado, rins, bexiga, peritônio e trato digestório de cada animal. Os helmintos foram identificados com base em chaves taxonômicas e por análise filogenética, usando quatro regiões distintas (18S e 28S rDNA, ITS-2 e *cox-1* mtDNA). A presença de *T. gondii* foi confirmada por um ou mais métodos em 45,8% (33/72) dos indivíduos avaliados. O sexo, a idade e a região geográfica não foram fatores associados estatisticamente à infecção por *T. gondii*. A análise coproparasitológica revelou a presença de ovos estrongilídeos, oocistos de *Eimeria* spp. ou ambos em 40,0% (36/90) das amostras avaliadas. Foram descritas 17 espécies de *Eimeria*, sendo *Eimeria coquelinae* a mais frequente entre os animais positivos (54.5%, 12/22) e foram feitos novos registros de 04 espécies originalmente descritas em *Sylvilagus* spp. (*E. media*, *E. honessi*, *E. sylvilagi*, *E. audubonii*). A avaliação helmintológica revelou a presença de helmintos em 14,4% (13/90) dos indivíduos avaliados. Foram identificados *Trichostrongylus colubriformis* e *Bunostomum trigonocephalum*. A prevalência geral da infecção por helmintos, a prevalência específica da infecção por *T. colubriformis* e a abundância parasitária foram estatisticamente maiores no Rio Grande do Sul que nos outros estados avaliados. Todas as lebres tinham uma condição corporal boa (3 de 5). A maior ocorrência de parasitas nos animais do Rio Grande do Sul pode estar relacionada à pressão de infecção resultante de maior densidade populacional de lebres, provavelmente por ser um dos primeiros estados invadidos e colonizados por este lagomorfo. Com exceção do grande número de espécies de *Eimeria* identificadas, houve baixa prevalência, baixa abundância, intensidade e riqueza parasitária nos animais estudados. A lebre europeia é hospedeiro intermediário de *T. gondii* no Brasil e o parasitismo não atua como um fator de controle populacional para a espécie no país. Estas informações precisam ser consideradas na avaliação da situação dessa espécie invasora pelas autoridades.

Palavra-chave: coccidiose, espécie invasora, helmintofauna, relação parasita-hospedeiro, toxoplasmose

RESEARCH OF ENDOPARASITES IN EUROPEAN BROWN HARES (*Lepus europaeus*) IN BRAZIL

ABSTRACT – The European brown hare (*Lepus europaeus*) is an invasive species in Brazil. Worldwide, invasive species threaten biodiversity by altering the balance of ecosystems, causing economic losses, and having a negative impact on human and animal health. Therefore, this thesis aimed to identify and describe the pathogens of European brown hare in Brazil. For this, we collected 90 brown hares from the states of São Paulo, Paraná, and Rio Grande do Sul (18 hares between June 2018 and October 2019, and 72 hares between July 2020 and June 2022). The evaluation of *Toxoplasma gondii* was carried out in 72 animals by bioassay in mice, histopathology of tissue sections (brain, liver, lung, kidney, small intestine) stained with hematoxylin-eosin, serology by IFAT and molecular analyzes (PCR and qPCR). Coproparasitological evaluation was carried out in 90 animals using qualitative techniques (Sheater centrifugal-flotation and Hoffman sedimentation techniques) and quantitative techniques (Gordon and Whitlock technique modified by Ueno and Gonçalves). The evaluation of the helminth fauna was carried out in 90 animals by inspection of the brain, heart, lungs, liver, kidneys, bladder, peritoneum, and in the total contents of gastrointestinal tract of each animal. Helminths were identified based on morphometric keys available in the literature and by phylogenetic analysis using four genetic regions (18S and 28S rDNA, *cox-1* mtDNA, ITS-2). The presence of *T. gondii* was confirmed by one or more methods in 45.8% (33/72) of the individuals evaluated. Sex, age and geographic region were not factors statistically associated with *T. gondii* infection. Coproparasitological analysis revealed the presence of strongyle-type eggs, oocysts of *Eimeria* spp. or both in 40.0% (36/90) of the samples evaluated. 17 species of *Eimeria* were described, with *E. coquelinae* being the most frequent between the positive animals (54.5%, 12/22), and 04 species originally described in *Sylvilagus* spp. (*E. media*, *E. honessi*, *E. sylvilagi*, *E. audubonii*). The coproparasitological prevalence in Rio Grande do Sul was higher. Helminthological evaluation revealed the presence of helminths in 14.4% (13/90) of the individuals evaluated. *Trichostrongylus colubriformis* and *Bunostomum trigonocephalum* were identified. The general prevalence of helminth infection, the specific prevalence of *T. colubriformis* infection and parasite abundance were statistically higher in Rio Grande do Sul than in the other states evaluated. All hares had a good body condition (3 of 5). The highest occurrence in Rio Grande do Sul is related to the infection pressure resulting from a larger hare population, probably because it is one of the first states invaded and colonized by this lagomorph. Except for the large number of *Eimeria* species identified, there was low prevalence, low abundance, intensity, and parasite richness. The European brown hare is an intermediate host of *T. gondii* in Brazil and parasitism is not acting as a natural population control factor for the species in the country. This information needs to be considered when assessing the situation of this invasive species by authorities.

Keywords: coccidiosis, helminth fauna, invasive species, parasite-host relationship, toxoplasmosis

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figure 1. Map of Brazil showing the cities from São Paulo, Paraná, and Rio Grande do Sul States where hares were hunted.....	26
--	----

CAPÍTULO 3

Figure 1. Map of Brazil showing the cities from São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul States where European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) were hunted.	47
Figure 2. Strongyle-type egg from invasive European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil. Bar:100µm.....	50
Figure 3. <i>Eimeria</i> spp. from invasive European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil. (A) <i>E. robertsoni</i> (B) <i>E. reniai</i> (C) <i>E. gobiensis</i> (D) <i>E. leporis leporis</i> (E) <i>E. intestinalis</i> (F) <i>E. coquelinae</i> (G) <i>E. europaea</i> (H) <i>E. media</i> (I) <i>E. leporis brevis</i> (J) <i>Eimeria</i> sp.1 (K) <i>E. gantieri</i> (L) <i>E. honessi</i> (M) <i>E. sylvilagi</i> (N) <i>E. babatica</i> (O) <i>E. matsubayashi</i> (P) <i>E. punjabensis</i> (Q) <i>E. audubonii</i>	52

CAPÍTULO 4

Figure 1. Geographic representation of the states of São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul highlighting the cities in which samples were collected. ...	75
Figure 2. <i>Bunostomum trigonocephalum</i> . A. anterior end (arrowhead: buccal capsule, bar=100µm); B. posterior end of the male (arrowheads: spicules, bar =100µm); <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . C. anterior end (arrowhead: excretory pore, bar=50µm); D. posterior end of a male specimen (CB: copulatory bursa, S: spicules, G: gubernaculum, bar=50µm); E. posterior end of a female specimen (arrowhead: anus, bar=100µm); F. Vagina vera (AS: anterior sphincter, PS: posterior sphincter, bar=100µm).	83

- Figure 3. Bayesian phylogenetic tree of the 28S rDNA region encompassing parasites of the Phylum Nematoda. *Crenosoma mephitis* and *Troglostrongylus wilsoni* were rooted as outgroups. Sequences from this study are highlighted in red. Sequences from the GenBank are described with accession number and species name. Bootstrap values are shown at the nodes.....85
- Figure 4. Bayesian phylogenetic tree of the *cox-1* mtDNA region encompassing parasites of the Phylum Nematoda. *Trichuris ovis* and *Trichuris suis* were rooted as outgroups. Sequences from this study are highlighted in red. Sequences from the GenBank are described with accession number and species name. Bootstrap values are shown at the nodes.85
- Figure 5. Bayesian phylogenetic tree of the ITS-2 region encompassing parasites of the Phylum Nematoda. *Trichuris ovis* and *Trichuris suis* were rooted as outgroups. Sequences from this study are highlighted in red. Sequences from the GenBank are described with accession number and species name. Bootstrap values are shown at the nodes.86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Prevalência de infecção por <i>Eimeria</i> spp. em lebres europeias (<i>Lepus europaeus</i>), em sua área de distribuição nativa.	4
Tabela 2. Helminthos parasitas de lebres europeias (<i>Lepus europaeus</i>) em sua área de distribuição nativa.	5
Tabela 3. Linhagens de <i>Toxoplasma gondii</i> registrados em animais domésticos e selvagens no Brasil, com dados de hospedeiro e localidade.....	8

CAPÍTULO 2

Table 1. Summary of hares considered positive to <i>Toxoplasma gondii</i> by histopathology, serology, mouse bioassay, or by molecular techniques in Brazil.....	32
--	----

CAPÍTULO 3

Table 1. Coproparasitological general prevalence and specific prevalence by morphotype of gastrointestinal parasites in European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil.	49
Table 2. Frequency of <i>Eimeria</i> species identified in positive samples (n=22) of European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil.....	54

CAPÍTULO 4

Table 1. Regions amplified with their primer sets, annealing temperature (T), and amplicon size (bp) used in the PCR reactions.	77
Table 2. General quantitative descriptors of parasite population in European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil by sex, age and geographical region, and specific descriptors for <i>Trichostrongylus colubriformis</i> and <i>Bunostomum trigonocephalum</i> infections according to the same categories.....	80
Table 3. Morphometric comparison of <i>Trichostrongylus colubriformis</i> (mature females) from brown hares and sheep	82
Table 4. Basic Local Alignment Search tool (BLAST) of major genetic identities of 28S rDNA, ITS-2, and <i>cox-1</i> sequences of <i>Trichostrongylus colubriformis</i> from European brown hares (<i>Lepus europaeus</i>) in Brazil (this study) with sequences from other studies deposited in the NCBI database.	84

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

As invasões biológicas são um problema global cujo impacto local é de grande preocupação para o bem-estar humano e para o equilíbrio dos ecossistemas (Chinchio et al., 2020, Dueñas et al., 2021). As espécies invasoras são organismos que foram acidentalmente ou deliberadamente introduzidas pelo homem em áreas além do seu local de origem e que colonizaram seu novo ambiente com sucesso (Scanes, 2018). Ao redor do mundo, diversas espécies invasoras ameaçam a fauna e flora nativas, alterando o equilíbrio dos ecossistemas por ser a causa de cascatas tróficas (Doody et al., 2017), e podem causar prejuízos econômicos e sanitários ao redor do mundo (Espinchin-Niell, 2017, Marbuah et al., 2014).

A lebre europeia, *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Lagomorpha: Leporidae), foi introduzida na América do Sul ao redor de 1880, no Chile e na Argentina, com finalidade cinegética. A população sul-americana desse lagomorfo é derivada de alguns indivíduos importados da Alemanha (Grigera e Rapoport, 1983). Em pouco tempo, esta espécie encontrou um ambiente muito favorável para se estabelecer de modo a se expandir para outros países, encontrando-se atualmente registros de sua presença na Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai (Bonino et al., 2010). O sucesso dessa expansão se deve à alta plasticidade ecológica e à elevada taxa de reprodução, que permitem uma expansão geográfica de até 45 km/ano (Faria et al., 2016).

No Brasil, as áreas invadidas pela lebre são principalmente áreas de plantio resultantes do desmatamento de florestas subtropicais, encontrando-se nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e parte dos estados de São Paulo e Minas Gerais, Goiás e Bahia (Bonino et al., 2010, Quintela et al., 2020). Esta transformação antrópica dos ecossistemas, junto com a redução populacional dos potenciais predadores das lebres, pode ter um efeito combinado para facilitar sua invasão pelo país (Rosa et al., 2017).

A lebre europeia é um herbívoro generalista, de hábitos preferencialmente noturnos, que se alimenta de uma grande variedade de plantas verdes no verão e de

galhos, brotos, mudas e cascas de arbustos e árvores jovens no inverno. Seus hábitos alimentares representam dano potencial elevado à agricultura (Petrovan, 2013). Estes mamíferos têm comprimento total entre 60 e 70 cm e pesam entre 2,5 e 7,0 kg. As lebres europeias são maiores que os tapitis, o nome comum dado aos lagomorfos nativos do gênero *Sylvilagus*, *Sylvilagus brasiliensis* e *Sylvilagus tapetillus* (Cordeiro-Estrela, 2022). A pelagem das lebres europeias varia do marrom-acinzentado ao amarelo, com alguns pelos negros, e região ventral mais clara. Possuem cauda curta, orelhas longas e estreitas, pés longos e com pelos (Achaval et al., 2004).

Os impactos ecológicos da invasão da lebre europeia ainda são pouco conhecidos, porém estes animais podem atuar como reservatórios e disseminadores de patógenos, tornando-se uma ameaça para as espécies nativas, animais domésticos e humanos (Tsokana et al., 2020). Entre os agentes zoonóticos diagnosticados nestes lagomorfos, há relatos do vírus da Febre hemorrágica de Criméia-Congo (Tsokana et al., 2020), pseudotuberculose (Frändölich et al., 2003, Fratini et al., 2017), fasciolose (Cuervo et al., 2015, Oyarzún-Ruiz et al., 2019) e toxoplasmose (Račka et al., 2021, Trifonova et al., 2023). Adicionalmente, é conhecido que as infecções parasitárias são um fator debilitante e causa de morte em lagomorfos (Schain-Braun et al., 2019), sendo que a introdução de parasitas pela lebre europeia pode ser uma ameaça para os lagomorfos brasileiros nativos.

Os trabalhos que integram conhecimentos acerca dos patógenos da lebre europeia no Brasil são escassos e devido aos recentes relatos da crescente dispersão desta espécie pelo país, o enorme impacto econômico e ambiental que elas representam, o presente trabalho visa ampliar o conhecimento científico sobre as espécies exóticas invasoras identificando e descrevendo a helmintofauna e as espécies de *Eimeria* presentes nestes lagomorfos, assim como a importância destes na disseminação e/ou amplificação da toxoplasmose, relacionando a infecção com as características do hospedeiro e do ambiente e assim contribuindo com informações para um possível plano de manejo da espécie.

CAPÍTULO 5 – Considerações Finais

O sucesso da invasão da lebre europeia no Brasil é multifatorial. No seu território de origem, as populações de lebres europeias mostraram uma diminuição nos últimos anos como consequência de doenças altamente patogênicas para a espécie, das práticas agropecuárias que modificaram seu habitat e da caça. Já no Brasil, as transformações antrópicas relacionadas a agropecuária e a diversidade da vegetação nativa, criaram um ambiente equilibrado de abrigo e de maior acesso à comida. Adicionalmente, o clima dos biomas Pampa, Mata Atlântica e Cerrado não são extremos, favorecendo o desenvolvimento da biodiversidade.

O estabelecimento da lebre europeia no país trouxe consigo diferentes tipos de ameaças, sendo assim, as pesquisas de patógenos em lebres europeias invasoras permitem avaliar o impacto ecológico nos habitats invadidos, incluindo a determinação de parasitas introduzidos junto com seus hospedeiros, e sua relação com as populações humanas, de animais nativos e domésticos. O presente estudo demonstrou a circulação de *Toxoplasma gondii* como uma infecção não letal entre as lebres europeias no Brasil. Próximos estudos visando à descrição do genótipo de *T. gondii* presente nas lebres ajudariam a entender melhor a importância da espécie para a epidemiologia da doença no país, assim como evidenciar as diferenças entre os casos fatais de toxoplasmose na Europa e os encontrados no Brasil neste lagomorfo.

Demonstramos também que *Eimeria* spp. poderia representar uma ameaça para as populações de *Sylvilagus* spp. nativas e que a helmintofauna das lebres está representada por nematódeos parasitas de ruminantes de importância na pecuária e com potencial patogênico desconhecido para outras espécies nativas. Nossos resultados gerais indicam que o parasitismo por si só não é um fator natural de controle populacional para as lebres, o aumento demográfico da espécie resultará em impactos negativos para a economia, saúde e agropecuária. Esta informação precisa ser considerada na avaliação da situação dessa espécie invasora pelas autoridades e da eventual necessidade de programas de manejo da espécie e educação sanitária.