GISLENE FÁTIMA DA SILVA ROCHA FOURNIER

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SILVESTRES E
GATOS DOMÉSTICOS DE DUAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NA CIDADE
DE NATAL, RN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

GISLENE FÁTIMA DA SILVA ROCHA FOUNIER

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SILVESTRES E
GATOS DOMÉSTICOS DE DUAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NA CIDADE
DE NATAL, RN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno–Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fournier, Gislene Fatima da Silva Rocha.

Estudo epidemiológico de *Toxoplasma gondii* em animais silvestres e gatos domésticos de duas Unidades de Conservação na cidade de Natal, RN / Gislene Fatima da Silva Rocha Fournier. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Toxoplasmose em animais silvestres.

Versão do título para o inglês: Epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in wild mammals and domestic cats of two areas in the city of Natal, RN.

1. *Toxoplasma gondii* 2. Mamíferos silvestres 3. Epidemiologia
4. Impactos ambientais 5. Áreas de conservação 6. Zoonoses I.
Gennari, Profa. Dra. Solange Maria II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0162/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gislene Fatima da Silva Rocha Fournier.

Título da Estudo epidemiológico de *Toxoplasma gondii* em animais silvestres e gatos domésticos de duas Unidades de Conservação na cidade de Natal, RN.

Orientador(a): Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **71** nas fls. **07** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Solange Maria Gennari**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo epidemiológico de toxoplasma gondii em animais silvestres e gatos domésticos de duas unidades de conservação na Cidade de Natal, RN*" do qual participam o(s) aluno(s) **Gislene Fátima da Silva Rocha Founier**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **05.06.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 06 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

A minha mãezinha...

AGRADECIMENTOS

Posso não chegar onde eu quero, mas morreria se não tentasse.

(Hilana, 2013)

A mon amour, Jean-François, pour tous les jours vécus ensemble et ton amour.

A Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela oportunidade e conhecimentos transferidos a mim.

A Dr^a Hilda F. J. Pena pelo ensinamento diário, franqueza, e por todas “hildadas” necessárias ao meu crescimento profissional.

Ao Dr. Prof. Arlei Marcili pelo apoio, ensinamento e dedicação na elaboração e execução deste projeto.

A minha *Maezinha* inspiração da minha vida.

Aos meus irmãos e companheiros por toda vida Gilsí, Gilvânia e Gicélio. E ao meu Pai pela compreensão e respeito às minhas decisões.

A minha querida amiga Maria por ter me ensinado, orientado e pela amizade pura e sincera.

A amiga Aline Diniz (Fia) por todo ensinamento e amizade. Sem você nada seria possível!

A amiga e exemplo de vida Andrea Borges da Costa por todos os ensinamentos e apoio em todos os momentos. E ao amigo Francisco pelos ensinamentos, paciência e carinho.

Ao Dr. Miliano Maximo e aos protetores de Natal, em especial Hilana, por acreditarem em um mundo mais justo para os animais e pelo belíssimo trabalho realizado.

Ao Dr. Carlos Prudêncio por me apresentar a Prof. Solange juntamente com a Maria. vocês mudaram minha vida!

A Família Lima pela melhor hospedagem do mundo. Vocês são ótimos!!!

Ao Dan que sempre “rema” comigo e por toda vida!

Aos amigos: Adriano Pinter; Diego, Paula, Amália, Julinha, Marcos (Piauí), Herbert, Natalia, Willian, Tiago, Igor, Jonas, Renatinho, Juliana, Lipinho, Pedrinho, Marcos, Washington, Tati, Serginho, Fernanda, Maurício pelas doses de risadas diárias.

Aos meus amigos de BH que acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso.

Ao Professor Ricardo Dias, exemplo de Profissional, por ensinar-me a “beleza” da estatística.

Aos Professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Ao ICMBio e IDEMA por concederem as licenças necessárias para este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto 2012/02556-3.

Aos funcionários do Parque da Cidade e Parque das Dunas pelo apoio nas campanhas de campo.

*A natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Esta é
uma das lições mais duras que os humanos têm de aprender.*

Richard Dawkins

RESUMO

FOURNIER, G. F. S. R. **Estudo epidemiológico de *Toxoplasma gondii* em animais silvestres e gatos domésticos de duas Unidades de Conservação na Cidade de Natal, RN.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de SP, São Paulo, 2013.

Dentre as diversas doenças zoonóticas de importância destaca-se a toxoplasmose, doença cosmopolita que causa sérios danos à saúde de humanos e animais. Os felídeos têm um papel especial em sua epidemiologia por serem os hospedeiros definitivos do parasita. A ocorrência de *Toxoplasma gondii* em mamíferos silvestres e domésticos tem sido documentada em diversos estudos indicando valores expressivos de animais que tiveram contato com este coccídio, que pode ser fatal para algumas espécies de mamíferos e aves. No município de Natal, no Estado do Rio Grande do Norte, dois parques se destacam pela importância ecológica e social, o Parque Estadual Dunas de Natal Jornalista Luiz Maria Alves e o Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte. Nestes parques, o número de gatos errantes é grande e pouco se sabe quais e como se encontra a saúde das espécies de animais lá existentes. O presente trabalho teve como objetivos investigar, avaliar e comparar a presença de *T. gondii* em gatos domésticos e em pequenos mamíferos silvestres que habitam estas duas Unidades de Conservação (UCs), bem como tentar o isolamento do parasita em alguns desses animais. Ao todo, foram obtidas amostras biológicas de 154 mamíferos (92 animais silvestres e 62 gatos domésticos). Dos mamíferos silvestres, 34 foram provenientes do Parque da Cidade e 58 do Parque das Dunas. Em relação aos gatos capturados nas Ucs, somente quatro foram provenientes do Parque das Dunas. Foi observada associação entre o número de animais silvestres apresentando anticorpos anti-*T. gondii* nos parques de origem ($p = 0,018$), sendo maior a ocorrência no Parque da Cidade (64,3 %) que no Parque das Dunas (34,8 %). A presença de *T. gondii*, através da amplificação molecular do gene B1, nos dois parques avaliados foi de 16,3% (15/92) nos animais silvestres e de 8,1% (5/62) para os gatos. O DNA de *T. gondii* obtido nas amostras teciduais foi submetido ao sequenciamento e uma sequência obteve 100% de similaridade a *T. gondii* de isolados de galinhas da Bahia. Neste estudo, foi possível estabelecer a circulação de *T. gondii* nas espécies e na população de gatos domésticos presentes nestes dois parques, demonstrando a participação de animais silvestres e domésticos no ciclo do *T. gondii* e alertando sobre a importância de controle da população de gatos destas Ucs.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Mamíferos Silvestres. Epidemiologia. Impactos Ambientais. Áreas de Conservação; Zoonoses.

ABSTRACT

FOURNIER, G. F. S. R. **Epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in wild mammals and domestic cats of two protected areas in the city of Natal, RN.** 2013. 85 p. Masters thesis (Master in Biology of Host-Pathogen Interactions) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Among several zoonotic diseases stands toxoplasmosis, a cosmopolitan disease that causes serious damage to the health of humans and animals. The felines have a special role in the epidemiology for being the definitive host of the parasite. The occurrence of *Toxoplasma gondii* in wild and domestic mammals has been documented in several studies indicating significant values for animals that had contact with this coccidian, which can be fatal for some species of mammals and birds. In Natal, state of Rio Grande do Norte, two parks are characterized by ecological and social importance, the Parque Estadual Dunas of Natal Jornalista Luiz Maria Alves and the Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte. In these parks, the number of errant cats is important and little is known of the mammal species existing there. This study aimed to investigate, evaluate and compare the presence of *T. gondii* in domestic cats and wild small mammals that inhabit these two protected areas, as well as perform the attempted isolation of the parasite. We obtained biological samples from 154 mammals (92 animals and 62 wild cats). 34 of wild mammals were from the Parque da Cidade and 58 from the Parque das Dunas. Regarding cats captured in both protected areas, only four were from the Parque das Dunas. It has been observed association between the number of wild animals presenting anti-*T. gondii* in the original parks ($p = 0.018$), with a higher occurrence in the Parque da Cidade (64.3 %) than in the Parque das Dunas (34.8 %). The presence of *T. gondii* by molecular amplification of B1 gene was 16.3 % (15/92) out of the 92 wild animals analyzed and 8.1% (5/62) of the cats evaluated in the two parks. The samples were subjected to sequencing and one of the sequences obtained a similarity of 100 % *T. gondii* of isolated from free range hen. In this study, it was possible to establish the circulation of *T. gondii* in wild and domestic cat population present in these two parks, demonstrating the involvement of wild and domestic animals in the cycle of *T. gondii* and warning about the importance of controlling the population of these cats in these protected areas.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Wild Mammals. Epidemiology. Environmental Impacts. Conservation Areas. Zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da cidade de Natal indicando os limites das ZPA 1 (Parque da Cidade) e ZPA2 (Parque das Dunas).....	29
Figura 2 -	Vegetação típica de Restinga que predomina no Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte, Natal, RN, outubro de 2012.....	30
Figura 3 -	Área selecionada para captura de dos animais no Parque das Dunas com características de Mata Semidecídua, Natal, RN, outubro de 2012.....	31
Figura 4 -	Corpos d'água registrados nas duas Unidades de Conservação, Natal – RN, 2012.....	36
Figura 5 -	Fluxograma ilustrando o direcionamento das amostras biológicas btidas nas duas coletas em campo (período de chuva e seca) no Parque da Cidade e no Parque das Dunas, Natal, RN.....	46
Figura 6 -	Número de indivíduos de cada espécie de animal silvestre capturados que apresentaram sorologia positiva para anticorpos anti- <i>T. gondii</i> no Parque da Cidade e no Parque das Dunas, Natal - RN, 2013.....	48
Figura 7 –	Proporção de gatos do Parque da Cidade soropositivos para anticorpos anti- <i>T gondii</i> , segundo o sexo e a faixa etária. Natal, RN, 2013.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Formas de obtenção de amostras biológicas, tipos de marcação, tempo de amostragem e local de amostragem para cada grupo de animal nas duas Unidades de Conservação (UC) estudadas, Natal, RN.....	35
Tabela 2 -	Ordem, espécies e quantidade de mamíferos silvestres capturados e amostrados nas Unidade de Conservação (Parque da Cidade e Parque das Dunas) em Natal, RN (2012 e 2013).....	45
Tabela 3 -	Número de indivíduos por espécie examinados e positivos para presença de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em cada uma das UCs avaliados pelo MAT (≥ 25), Natal, RN (2012 e 2013).....	47
Tabela 4 -	Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em animais silvestres naturalmente infectados no Parque das Dunas e no Parque da Cidade nos períodos de chuva e seca. Natal - RN, 2013.....	49
Tabela 5 -	Número e tipo de amostras de animais e de água obtidas e bioensaios em camundongos realizados, para o isolamento de <i>T. gondii</i> Natal – RN (2012 e 2013).....	51
Tabela 6 -	Identificação dos animais de cada Parque amostrados e analisados para o gene B1 utilizando-se diferentes tecidos e sangue relacionados com os resultados da sorologia e do sequenciamento.....	53
Tabela 7 -	Resultados da <i>n</i> PCR (B1) de amostras de DNA positivas para <i>T. gondii</i> obtidas de tecidos e sangue dos gatos domésticos das UCs e a relação com os resultados do MAT, Natal, RN, 2013.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
A	Arborícola
Ad	Adulto
Ba	Baço
BE	Bioensaio
Ca	Campanha
°C	Graus celsius
C+	Controle positivo
C -	Controle negativo
Co	Coração
Cod	Código
Ce	Cérebro
CI	Conteúdo Intestinal
CED	Capturar-Esterilizar-Devolver
µL	microlitro (s)
dNTP	deoxinucleotídeos 5'-trifosfato
DNA	Desoxirribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	et alli (e outros); e colaboradores
Fi	Fígado ou Filhote
Fe	Feto
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HCl	Ácido clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis.
IDEMA-RN	Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte
IgG	Imunoglobulina de classe G
Jo	Jovem
ITS	Internal Transcribed Spacer
LAT	Técnicas de Aglutinação em Látex
Li	Língua
KCl	Cloreto de potássio
km	Quilômetro
kg	Quilograma
mm	Milímetros
m ²	metros quadrados
M	Molar
MAT	Modified Agglutination Test (teste de aglutinação modificado)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NA	Não arborícola
N	Negativo
NaCl	Cloreto de sódio
N ^o	Número
nPCR	<i>nested</i> -PCR
P	Positivo

pb	Pares de bases
PM	Marcador de Peso Molecular
PC	Parque da Cidade
PD	Parque das Dunas
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)
PK	Proteinase K
Pq	Parque
pH	Potencial hidrogênico
pM	Picomol
p	valor-p
Pu	Pulmão
rDNA	DNA ribossomal
Ri	Rim
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de DNA gerados por Enzima de Restrição)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
RN	Rio Grande do Norte
rpm	Rotações por minuto
Sa	Sangue
SA	Semi arborícola
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
s	Segundos
SEMURB	Secretaria Municipal de Urbanismo de Natal
SISBio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SP	São Paulo
Te	Testículo
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidade internacional
Ut	Útero
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UC	Unidade de Conservação
v/v	Volume por volume
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
ZPA	Zona de Proteção Ambiental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVO GERAL.....	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>.....	20
3.2 <i>Toxoplasma gondii</i> e mamíferos silvestres.....	23
3.3 Fragmentação florestal e toxoplasmose.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Área de estudo.....	28
4.2 Coleta de amostras biológicas e esterilização dos gatos.....	32
4.3 Captura de pequenos mamíferos terrestres e voadores.....	33
4.4 Coleta de água para bioensaio em camundongos.....	36
4.5 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-<i>T. gondii</i>.....	36
4.6 Bioensaio em camundongos	37
4.6.1 Digestão péptica de tecidos e filtragem das amostras de água e conteúdo intestinal.....	37
4.7 Testes moleculares	39
4.7.1 Extração do DNA das amostras de tecido e de sangue	39
4.7.2 Extração do DNA das amostras de conteúdo intestinal e de água	39
4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	40
4.7.4 Purificação, Precipitação do DNA e Reação de sequenciamento	41
4.7.5 Alinhamento e análises das sequências	42
4.8 Análise estatística dos dados	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Número de espécies registradas e número de amostras obtidas.....	44

5.2 Diagnóstico sorológico	46
5.2.1 Diagnóstico sorológico de animais silvestres	46
5.2.2 Diagnóstico sorológico em gatos domésticos	49
5.3 Bioensaio em camundongos	50
5.4 Pesquisa molecular de <i>T. gondii</i>.....	52
5.4.1 Testes moleculares de amostras provenientes de animais.....	52
5.4.2 Testes moleculares de amostras provenientes dos gatos	54
5.4.3 Testes moleculares realizados nas amostras de água provenientes das UCs	55
5.4.4 Testes moleculares dos camundongos utilizados no bioensaio	55
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A - Amostras de animais silvestres capturados nas duas UCs em outubro de 2012 (campanha 1) e fevereiro de 2013 (campanha 2), Natal-RN.....	77
APÊNDICE B - Dados das amostras provenientes de gatos do parque das Dunas e Parque da Cidade em Fevereiro de 2013 (campanha 2).....	80
ANEXO A - Licença Concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para captura e coleta de pequenos mamíferos terrestres, São Paulo, 2013.....	82

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical da América do Sul, cobrindo cerca de 1,5 milhões km ao longo da costa brasileira (RIBEIRO et al., 2011). É de fato um dos Biomas mais heterogêneo do Brasil, apresentando fitofisionomias muito diversas, desde áreas com matas semidecíduas (a mais representativa), e também as florestas caducifólias, manguezais, pântanos e restingas (floresta costeira e matagal em solos arenosos) (RIBEIRO et al., 2011). Este mosaico diversificado de habitats é atualmente o lar de quase 20 mil espécies de plantas, 263 mamíferos, 936 aves, 306 répteis e 475 anfíbios (MITTERMEIER et al., 2005). Além disso, níveis excepcionais de endemismo fazem da Mata Atlântica um dos biomas mais marcante em toda a região neotropical (MULLER, 1973; PRANCE, 1982).

Devido a sua localização e riqueza biológica, a Mata Atlântica é hoje um dos biomas que mais sofre com as mudanças ocorridas pela interferência do homem. A expansão urbana acarretou não só à perda de habitat para as espécies selvagem, mas também, obrigou-as a ocuparem áreas modificadas e a adaptarem-se à presença de espécies domésticas e ao homem (AKCA et al., 2004; FIALHO et al., 2009; SILVA et al., 2007; VITALIANO et al., 2010).

Este efeito tem levado à extinção milhares de espécies nas últimas décadas, bem como, o aumento de patógenos causadores de zoonoses em todo o mundo (ASTRID et al., 2000; CABEZÓN et al., 2004; DUBEY et al., 2003; SILVA et al., 2010).

Em toda costa brasileira o crescimento urbano tem gerado a degradação deste Bioma e em muitas regiões, a presença de fragmentos florestais se tornaram pequenas ilhas de vegetação nos grandes centros urbanos. Neste contexto, o melhoramento do saneamento básico, saúde pública e educação ambiental, algumas vezes, não acompanham o rápido crescimento populacional proporcionando o aparecimento e/ou reaparecimento de diversas zoonoses (DUBEY et al., 2003; LEHMANN et al., 2003; SILVA et al., 2010; VITALIANO et al., 2010).

Muitas destas últimas áreas verdes inseridas nos centros urbanos se tornam remanescentes com grande importância pública e ecológica sendo decretadas como Unidades de Conservação (UCs) pelos governos municipais, estaduais e nacional. Porém, estas UCs podem sofrer dramaticamente o efeito da urbanização não planejada. Entre tantos efeitos negativos devido à antropização no entorno das UCs, se destacam a poluição em todas as suas formas (sonora, visual, do ar e água), a extinção de componentes da flora e da fauna e a introdução de espécies domésticas no ecossistema (SALGADO et al., 2007).

As principais consequências negativas da interação de animais domésticos *versus* UCs são a perda da biodiversidade local original e o risco de transmissão de patógenos para os animais (silvestres e domésticos) e pessoas que convivem com estes ou próximo a estes acarretando diversas doenças (SALGADO et al., 2007; SILVA et al., 2010). Estas doenças, conhecidas como zoonoses, são responsáveis por milhões de mortes em todo o mundo (ANGELUCCI et al., 2009; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2002; PRELEZOV et al., 2008; SILVA et al., 2007). A epidemiologia destas doenças está baseada na relação entre meio ambiente e agentes físico, tais como locais onde o indivíduo reside; fatores culturais; convivência com possíveis vetores de patógenos; hábitos alimentares, fatores socioeconômicos e religiosos. Este último devido a prática de algumas religiões não permitirem o consumo de alguns tipos de carne e outros produtos (AGELUCCI et al., 2009; SILVA et al., 2007; TENTER, 2009).

Entre estas doenças a toxoplasmose se destaca por ser uma doença cosmopolita que pode causar sérios danos à saúde de humanos e animais, bem como perdas econômicas (da SILVA et al., 2010; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2002; LEHMANN et al., 2003; TENTER, 2009).

A prevalência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em mamíferos silvestres tem sido documentada em diversos trabalhos em todo mundo (CLIMENI; MONTEIRO, 2009; DARABUS et al., 2011; HEJLICEK et al., 1981; KARATEPE et al., 2004), inclusive entre animais marinhos que nunca tiveram contato com o homem (CABEZÓN et al., 2004; CONRAD et al., 2005; DUBEY et al., 2003; FORMAN et al., 2009).

Embora animais silvestres frequentemente se mostrem reativos em testes sorológicos para *T. gondii* (GONDIM et al., 2010; HEJLICEK et al., 1981), o papel destes animais na transmissão de *T. gondii* ainda não é bem conhecido (AFONSO et al., 2007). Porém, é sabido que a presença de surtos desta doença pode afetar populações de espécies silvestres levando à redução no número de indivíduos.

Nas UCs próximas ou dentro de centros urbanos a investigação do ciclo epidemiológico de *T. gondii* é o primeiro passo para realizar planos de ação na prevenção da toxoplasmose e consequentemente manter a saúde dos envolvidos e o equilíbrio ambiental (GONDIM et al., 2004; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Trabalhos relevantes, visando o diagnóstico de *T. gondii* em mamíferos e aves silvestres, foram realizados no Brasil (DUBEY et al., 2002; GENNARI et al., 2004; MINERVINO et al., 2010; SILVA et al., 2006; YAI, 2009). Entretanto, na região nordeste do país, pouco se sabe sobre o ciclo epidemiológico deste coccídio nestes grupos de animais em

vida livre. A maioria dos estudos realizados contemplam animais silvestres em cativeiro e domésticos (LEITE et al., 2007; PENA et al., 2006; PIMENTEL et al., 2009; SOARES et al., 2010).

Localizado no extremo nordeste do território brasileiro, o Estado do Rio Grande do Norte ocupa área de 53.306,8 km² e em todo seu território são encontradas mais de 20 UCs. Na capital Natal, duas destas unidades se destacam em tamanho e importância. A primeira, o Parque Estadual das Dunas de Natal Jornalista Luiz Maria Alves, constitui a maior UC do Município de Natal. Localizado na região metropolitana da cidade abrange uma área de 1.172 hectares de mata nativa sobre dunas (FREIRE, 1990), sendo parte integrante da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. É uma área rica em recursos naturais, sendo propícias atividades de cunho científico, educacional, turístico e de lazer (CARVALHO, 2001).

A segunda UC de grande importância é um parque municipal denominado Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte que está situado dentro da Capital com grande importância na preservação do último reduto aquífero limpo da cidade. Porém, nesta UC, nos últimos anos, vem sendo relatado o abandono de gatos domésticos, principal hospedeiro definitivo de *T. gondii*. Nenhuma das medidas tomadas pelo município foi eficaz para a redução da população destes animais, que vem crescendo gradativamente.

A íntima relação dos gatos domésticos com os animais silvestres da área dos Parques pode favorecer a emergência de zoonoses ou de doenças restritas ao ambiente silvestre. Pouco se sabe da composição da fauna de mamíferos destas duas UCs e a presença dos gatos domésticos pode se tornar um dos principais riscos para a diminuição e mesmo para a extinção dos pequenos mamíferos que ainda ocorrem nestes fragmentos florestais. Deste modo, é importante pesquisar, avaliar e comparar a presença de *T. gondii* nos gatos domésticos e nos pequenos mamíferos silvestres, que vivem nessas UCs.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a infecção por *T. gondii* em pequenos mamíferos silvestres e em gatos domésticos no parque Estadual das Dunas “Jornalista Luiz Maria Alves” e no Parque Municipal Parque da Cidade “Dom Nivaldo Monte”, ambas no Município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas espécies de pequenos mamíferos capturadas;
- Comparar as ocorrências de anticorpos anti-*T. gondii* encontradas na comunidade de pequenos mamíferos das duas Unidades de Conservação e nos gatos domésticos associados a estas áreas;
- Detectar a presença de fragmentos de DNA de *T. gondii* nas amostras de tecidos de animais silvestres e dos gatos domésticos capturados nas duas Unidades de Conservação.
- Comparar a ocorrência de *T. gondii* na comunidade de pequenos mamíferos das duas Unidades de Conservação nas estações de chuva e seca nas áreas estudadas.
- Detectar a presença de fragmentos de DNA de *T. gondii* nas amostras de água coletadas nas duas Unidades de Conservação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é a única espécie do gênero *Toxoplasma* pertencente à classe Protozoa e à família Sarcocystidae. A primeira descrição do *T. gondii* foi há mais de 100 anos e ainda hoje o agente é descrito nas mais diferentes espécies de vertebrados das classes Mammalia e Aves (CABRAL et al., 2013; PENA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013; VITALIANO, 2012).

Em 1908 Nicolle e Manceaux descreveram o parasita em um pequeno roedor originário da África chamado *Ctenodactylus gundi*. E também em 1908, Splendore descreveu o mesmo parasita em coelhos de laboratório, no Departamento de Bacteriologia do Hospital da Sociedade de Beneficência Portuguesa em São Paulo. Já nesta época este coccídio demonstrava uma grande amplitude de hospedeiros intermediários, uma vez que foi descrito em duas espécies muito distintas de mamíferos e em continentes distintos.

O nome do roedor foi o precursor do nome da espécie do parasita e o nome do gênero deriva das palavras gregas *taxon* (arco) e *plama* (forma), devido à forma alongada e arqueada (NETO et al., 1995). *T. gondii* foi observado em humanos pela primeira vez em 1923 por Janku e o primeiro caso de toxoplasmose no Brasil foi descrito por Magarinos Torres (1927) que descreveu o parasita durante a necropsia de um paciente com meningoencefalite, miocardite e miosite (GUIMARÃES, 1943). O primeiro registro fotográfico foi realizado por Belfort Mattos em 1933 (GUIMARÃES, 1943).

Toxoplasma gondii pode ser classificado como um dos mais complexos protozoários da família Sarcocystidae. É um coccídio intracelular obrigatório que possui um ciclo biológico heteroxeno facultativo. Sua fase assexuada pode ser encontrada nos tecidos de seus hospedeiros intermediários que geralmente resultam na forma de cisto. Já a forma sexuada deste patógeno ocorre somente no intestino delgado de seus hospedeiros definitivos, sendo estes os pertencentes da família Felidae.

Hoje se sabe que este coccídio é capaz de infectar uma ampla variedade de mamíferos e aves, incluindo o ser humano, o que caracteriza seu potencial zoonótico (CABRAL et al., 2013; FIALHO et al., 2009; PENA et al., 2013; PRELEZOV et al., 2008; VITALIANO et al., 2010). Possivelmente é capaz de infectar e se replicar em todas as células nucleadas de seus vários hospedeiros (BUTTY, 2009; DUBEY, 1988; WONG; REMINGTON, 1993), porém,

como já mencionado, a reprodução sexuada ocorre somente nos felídeos, que junto com suas fezes, liberam milhares de oocistos no ambiente (DUBEY; BEATTIE, 1988; LINDSAY et al., 1997).

Ainda em relação ao ciclo biológico deste parasita, três formas infectantes do *T. gondii* já foram observadas. Estas são os taquizoítos livres ou em forma de pseudocistos encontrados em diversos tecidos dos seus hospedeiros, os bradizoítos encontrados nos cistos teciduais e os esporozoítos encontrados nos oocistos esporulados após a liberação no ambiente (DUBEY; BEATTIE, 1988).

No organismo dos hospedeiros intermediários, após estes se infectarem com qualquer uma das formas infectantes do coccídio, inicia-se a multiplicação dos taquizoítas por endodiogenia e assim, formam-se os cistos teciduais (PENA, et al., 2006). Geralmente estes cistos ocorrem em tecidos do sistema nervoso e/ou muscular dos hospedeiros e caracterizam-se pela presença dos bradizoítos dentro dos cistos que se dividem de forma lenta e permanecerão nestes tecidos por toda vida do hospedeiro (DUBEY; BEATTIE, 1988; PENA et al., 2006).

Nas últimas décadas a prevalência de toxoplasmose em populações de humanos e animais tem sido documentada em diversas regiões do globo. Em humanos a taxa de soroprevalência pode chegar a 90% em alguns países (MENESES et al., 2009).

No Brasil a prevalência de anticorpos IgG na população geral varia de 54% na região Centro-Oeste a 75% na região Norte (MENESES et al., 2009). Sabe-se que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos aumenta de acordo com a idade, possivelmente devido a um maior tempo de exposição ao parasito (FRANTI et al., 1975; VITALIANO et al., 2010).

A infecção em humanos imunocompetentes é assintomática em 80% a 90% dos casos, sendo a doença uma exceção no homem (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; SILVA et al., 2007), entretanto, em pacientes imunossuprimidos, a doença pode ser fatal e em mulheres grávidas que se infectem durante a gestação, graves lesões no feto e abortamentos podem ocorrer (MENESES et al., 2009).

Embora isolados de *T. gondii* sejam historicamente considerados altamente similares, as últimas análises moleculares tem revelado diferenças marcantes entre as populações deste coccídio em diversos locais do mundo (SU et al., 2011).

Em um primeiro momento, na década de 1990, pesquisadores acreditavam que o *T. gondii*, apesar de ser uma só espécie, demonstrava populações provenientes de diferentes linhagens, mas que a diversidade genética destas diferentes linhagens era extremamente

limitada. Essa característica poderia ser explicada por uma estrutura populacional clonal muito forte (AJZENBERG et al., 2002; DARDÉ et al., 1992; HOWE; SIBLEY, 1995).

Em 1995, Howe e Sibley diferenciaram *T. gondii* em três linhagens e as denominaram Tipo I, Tipo II e Tipo III. Recentemente uma quarta linhagem clonal do *T. gondii* refere-se ao Tipo 12, esta foi recentemente descoberta na América do Norte em animais selvagens (KHAN et al., 2011).

Estudos moleculares de isolados humanos da Guiana Francesa e de galinhas do Brasil foram os primeiros a revelar uma variabilidade genética do parasita maior do que a previamente relatada (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004). Vários estudos posteriores utilizando isolados de diferentes regiões e hospedeiros confirmaram que os isolados de *T. gondii* do Brasil são biologicamente e geneticamente diferentes daqueles da América do Norte e Europa, apresentando uma alta diversidade (DUBEY et al., 2007; FERREIRA et al., 2006; PENA et al., 2008).

Análises filogenéticas e estatísticas revelaram resultados inesperados mostrando que as três primeiras linhagens descritas se diferem somente em menos de 1% (SU; EVANS; COLE, 2003). Mesmo demonstrando diferenças genéticas mínimas estas cepas se diferem quanto à virulência e quanto ao padrão de ocorrência epidemiológica (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Até o momento, o que se tem observado é que cepas do Tipo I são extremamente virulentas para camundongos e as cepas Tipo II tem sido associadas aos casos de toxoplasmose em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; KLAREN; KIJLSTRA, 2002). Já as cepas do Tipo III estão presentes em animais e também detectados em pacientes com AIDS, mas não são associadas com a toxoplasmose ocular (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

No Brasil a estrutura populacional do *T. gondii* tem se demonstrado atípica. O isolamento de cepas em diversos Estados tem sido descritos por autores através de amostras primárias, principalmente para o grupo de aves e mamíferos. A genotipagem multilocus por PCR-RFLP, tem revelado uma grande diversidade de populações de *T. gondii* (KHAN et al., 2011).

Pena e colaboradores (2008), após analisarem isolados de animais domésticos do Brasil, subdividiram as linhagens em quatro tipos baseados em características biológicas e as denominaram BrI, BrII, BrIII e BrIV. A cepa Br I foi classificada como altamente virulenta para camundongos tendo 100% de mortalidade em bioensaio. A cepa BrII apresenta virulência intermediária em camundongos e a cepa tipo BrIII foi considerada não virulenta. Já

a cepa Br IV, por apresentar uma mortalidade variada em camundongos, foi interpretada como intermediária.

Com a inusitada infecção de *T. gondii* em diversas espécies de animais em todo o mundo, trabalhos que buscam compreender a estruturação genética do parasita tem se multiplicado (CABRAL et al., 2013; PENA et al., 2008, 2006; VITALIANO et al., 2010).

Até o presente, é possível concluir que dentre as diferenças marcantes na estrutura populacional da América do Norte, Europa e Brasil, o hemisfério norte é local de predomínio das três linhagens clonais de *T. gondii*. Já no hemisfério sul, principalmente no Brasil, onde há uma maior quantidade de estudos, existe uma estrutura populacional epidêmica com algumas expansões das linhagens clonais (PENA et al., 2008) demonstrando assim, uma rede altamente reticulada e diversificada. Esta descoberta sugere que exista uma alta taxa de recombinação na população do parasita na América do Sul (PENA et al. 2008).

A facilidade de recombinação do parasita na América do Sul pode ser interpretada de várias maneiras, entre elas a alta interação entre os animais silvestres, os domésticos e o homem que é comumente observada nos trópicos, pode ser um fator que facilite a reprodução sexuada do parasita.

3.2 *Toxoplasma gondii* e mamíferos silvestres

O grupo de pequenos mamíferos silvestres no Brasil é formado pelos marsupiais, roedores que pesam até 1kg e os morcegos (BALKENHOL et al., 2013; GHELER-COSTA et al., 2012). Estes estão presentes em todos os biomas brasileiros ocupando grande parte da base da cadeia alimentar do ecossistema terrestre (BALKENHOL et al., 2013; GHELER-COSTA et al., 2012; PAGLIA et al., 2012).

Segundo Paglia e colaboradores (2012), as ordens com maior número de espécies de mamíferos do Brasil são Rodentia e Chiroptera, com respectivamente 234 (34,7% do total de mamíferos) e 174 (24,8% do total de mamíferos) das 701 espécies que ocorrem no País. Para a Ordem Rodentia somente 20 das 234 espécies não são consideradas pequenos mamíferos. Já os marsupiais brasileiros estão classificados em 55 espécies (7,9% do total de mamíferos), sendo assim o grupo de pequenos mamíferos terrestres representam mais de 63% das espécies de mamíferos brasileiros (PAGLIA et al., 2012). Observando esses números fica evidente que a participação deste grupo de mamíferos no ciclo de diversos parasitas e patógenos é abrangente.

O papel da vida selvagem na transmissão de *T. gondii* tem sido estudado por diversos autores em todas as partes do mundo (CABRAL et al., 2013; DUBEY et al., 1992; HUMPREYS et al., 1995; LINDSAY et al., 2001; VITALIANO et al., 2010). Alguns autores tem citado o grupo de pequenos mamíferos como um grupo de animais de grande importância para a saúde pública (CABRAL et al., 2013; HEJLICEK et al., 1981; VITALIANO et al., 2010). Neste contexto, *T. gondii*, por se tratar de um dos protozoários com maior número de hospedeiros intermediários, tem se destacado nas pesquisas sobre as zoonoses nestes vários tipos de vertebrados endotérmicos presentes no planeta (ANTOLOVÁ et al., 2007; CARME et al., 2009; HEJLICEK et al., 1981; MATTOS et al., 2008; SHAAPAN; KHALIL 2008; TESHAILES et al., 2007).

Entre os mamíferos, os grupos mais comumente infectados são: marsupiais, xenartros, roedores, carnívoros, artiodáctilos e primatas (BRAGA FILHO et al., 2011). Os marsupiais apresentam uma ocorrência de 14% e os primatas de apenas 2% de anticorpos anti-*Toxoplasma* (BRAGA FILHO et al., 2011). Porém é sabido que os primatas do novo mundo são altamente suscetíveis e muitos morrem devido à infecção sendo este o fator provável da baixa prevalência de soropositivos neste grupo de animais (PENA et al., 2013; VITALIANO et al., 2010).

Em 1999, Bouer e colaboradores reportaram a morte de três macacos-barrigudos (*Lagothrix lagotricha*) em um Zoológico no Brasil com diagnóstico confirmado através de imunoistoquímica. Já os xenartros e os roedores apresentam ocorrência de 25% e os índices mais elevados são os dos carnívoros e dos artiodactilos com 35% e 57%, respectivamente (SILVA et al., 2007; VITALIANO et al., 2010).

Pesquisas nas comunidades de mamíferos silvestres são desenvolvidas em sua generalidade por técnicas de aglutinação em látex (LAT) e técnica de aglutinação modificada (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987), por apresentarem alta sensibilidade e não necessitarem de conjugados espécie-específicos (AFONSO et al., 2007; GONDIM et al., 2004).

Até a última década do século XX os morcegos eram vistos como animais que não eram hospedeiros intermediários deste coccídio (HOWE, et al., 1997), porém, diante do advento de técnicas de detecção e diagnóstico de patógenos relacionados às zoonoses, estes animais têm sido apontados como excelentes reservatórios para vários parasitas, uma vez que além de possuírem uma diversa gama de hábitos alimentares, muitas espécies são sinantrópicas, facilitando o ciclo de patógenos (CLIMENI; MONTEIRO, 2009; HEJLICEK et al., 1981; NOGUEIRA, 2009).

Nos animais, o maior interesse na avaliação da ocorrência de toxoplasmose está relacionado às espécies que coabitam com o homem ou que lhe servem de alimento (SINGH et al., 2003; SOGORB et al., 1972). Assim, as espécies sinantrópicas, incluindo diversos morcegos, têm se destacado entre o grupo de animais que devem ser mais investigados para infecção por *T. gondii*.

Recentemente Cabral e colaboradores (2013) obtiveram os primeiros isolados de *T. gondii* em morcegos capturados no Estado de São Paulo. Os isolados são de duas espécies comuns e sinantrópicas de morcegos brasileiros: *Desmodus rotundus* (GEOFFROY, 1810) um morcego hematófago e *Molossus molossus* (PALLAS, 1766) um morcego insetívoro. Os isolados foram denominados TgBatBr1 e TgBatBr2, sendo que o genótipo do isolado a partir de *M. molossus* (TgBatBr1) foi previamente descrito em capivara também do Estado de São Paulo e o genótipo obtido de *D. rotundus* (TgBatBr2) já foi identificado em isolados de gatos, galinhas, capivaras, ovelha, roedor e coelho de diferentes estados brasileiros. Cabral e colaboradores (2013) sugerem que se trata de uma linhagem comum de *T. gondii* que circula em algumas regiões brasileiras. Este estudo revela que os morcegos podem compartilhar os mesmos isolados que são encontrados em animais terrestres domésticos ou selvagens sendo incluídos no grupo de hospedeiros intermediários do *T. gondii*.

3.3 Fragmentação florestal e toxoplasmose

Mudanças na cobertura florestal são conhecidas pelo impacto significativo sobre a diversidade da fauna e funcionamento dos ecossistemas (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011; SALAS et al., 2004).

Muitos autores já descreveram impactos causados pelo desmatamento para instalação de plantações, ou urbanização influenciando na transmissão de zoonoses e seus vetores invertebrados (DOBSON; FOUFOPOULOS, 2001; GALVANI, 2003; OGRZEWALSKA et al., 2011). Porém pouquíssimos estudos têm correlacionado a toxoplasmose com áreas de fragmentação florestal, locais estes onde humanos, animais silvestres e animais domésticos geralmente dividem uma mesma área de vida.

Na Guiana Francesa, casos graves de toxoplasmose em pacientes imunocompetentes estão associados com cepas atípicas de *T. gondii* ligado a um ciclo de floresta neotropical selvagem e uma diversidade genética maior do que normalmente observado para isolados de *T. gondii* obtidos de ambientes urbanos (CARME et al., 2009; MERCIER et al., 2011). O grupo de pesquisa francês da Universidade de Limoges, tem levantado uma questão que ainda

não tinha sido considerada: a relação entre o impacto da antropização em ambiente natural e a diversidade de *T. gondii*.

Ainda são poucos os dados disponíveis sobre cepas circulantes nas áreas antropizadas da Guiana Francesa. A maioria dos animais analisados pelo grupo francês, são originários principalmente de áreas sub-urbanas antropizadas e pontualmente de ambiente selvagem na Guiana, porém os resultados mostram claramente uma diferenciação genética entre as linhagens associadas ao ambiente antropizado e ao selvagem, mas com alguma similaridade entre eles (MERCIER et al., 2011). Os pesquisadores concluíram que as duas populações ambientais "selvagens" e "antropizada" são geneticamente bem diferenciadas e que a antropização do ambiente parece ser acompanhada de uma diminuição da diversidade de *T. gondii*. Neste trabalho, os autores ainda detectaram um potencial de fluxo gênico entre estas duas populações ambientais e que existe uma patogenicidade muito maior em humanos contaminados com genótipos "selvagens" colocando em risco a saúde dos humanos desta região.

Estes resultados comprovam que as mudanças ocorridas nas áreas florestadas devido a interferência humana afetam a diversidade dos parasitas e seus hospedeiros e também elevam a exposição dos humanos às doenças, como foi verificado por Ogrzewalska e colaboradores em 2012 para a febre maculosa e também a transformações no ciclo do parasita como observado por Carme e colaboradores em 2009 para a toxoplasmose na Guiana Francesa.

A exposição também pode estar associada à movimentação de animais domésticos em áreas naturais. Doenças específicas desses animais podem ser transmitidas para animais silvestres e vice-versa (MERCIER et al., 2011; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011). Da mesma forma, pode acontecer que animais selvagens, tanto aves quanto mamíferos ao se deslocarem entre fragmentos florestais, utilizando diferentes elementos da paisagem, dispersem e/ou adquiram parasitas ao entrarem em contato com os animais domésticos e com o homem (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011; PENA et al., 2013).

Estes fatores podem explicar a diversidade de isolados provenientes de galinhas caipiras (BELTRAME et al., 2012; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2013; RUIZ; FRENKEL, 1980). Estes animais geralmente são criados em áreas periurbanas ou rurais ao ar livre e frequentemente são infectados por oocistos liberados no ambiente por felinos silvestres ou domésticos e por esse motivo tem sido amplamente utilizados como bioindicadores de cepas de *T. gondii* predominantes no meio ambiente onde vivem (PENA et al., 2013).

De modo geral, a alta diversidade genética do *T. gondii* em um ambiente selvagem e tropical em comparação com os ambientes urbanos e temperados pode estar ligada a uma

maior diversidade de hospedeiros no ambiente silvestre. Uma pluralidade de alelos se faz necessária para que *T. gondii* colonize um máximo de nichos ecológicos nestes ambientes que apresentam alta diversidade biológica (CARME et al., 2009). Nos fragmentos florestais ainda presentes na região litorânea do Brasil pode-se considerar que exista esta alta diversidade e abundância de hospedeiros, bem como este coccídio deve estar presente, sendo importantes locais para estudos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As licenças para captura e eutanásia de três espécimes por espécie capturadas em cada uma das áreas de estudo e transporte destes indivíduos foram concedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) sob o número 32104-2 e pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte (IDEMA-RN) (Anexo A). Os procedimentos com animais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolo registrado sob o número 204, na folha 117 do Livro 02 de 14 de fevereiro de 2012 com validade de 4 anos.

4.1 Área de estudo

O município de Natal, no Estado do Rio Grande do Norte, possui dez Zonas de Proteção Ambiental definidas pelo Plano Diretor da cidade. Este projeto abrange a Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA 1) e 2 (ZPA2) da cidade de Natal (Figura 1).

A Zona de Proteção Ambiental do Sun Valle (ZPA 1) está localizada na zona sul de Natal e abrange o conjunto Sun Valle, no bairro Pitimbú, é tida como o último reduto de água limpa de Natal, abastecendo 16 bairros da Capital.

O Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte é um parque municipal e está situado dentro da ZPA-1 (entre as coordenadas: 5° 51' 3.63" S e 35° 13' 39.75" O) (AZEVEDO, 2010; RAMALHO; PIMENTA, 2010; SEMURB, 2008). Possui aproximadamente 64 hectares e abrange principalmente três bairros, Pitimbú, Candelária e Cidade Nova.

Figura 1 – Mapa da cidade de Natal indicando os limites das ZPA 1 (Parque da Cidade) e ZPA2 (Parque das Dunas).

Fonte: modificado de SEMURB (2008).

O bioma original do local é a Mata Atlântica constituído por formações dunares cobertas por vegetação de restinga em sua maioria (RAMALHO; PIMENTA, 2010; UFRN, 2007) (Figura 2). O clima local é tropical úmido com temperatura média anual de 26 °C e precipitação pluviométrica anual em torno de 2.500 mm, com período chuvoso mais intenso entre os meses de março a julho (CESTARO et al., 2012; RAMALHO; PIMENTA, 2010).

Figura 2 – Vegetação típica de Restinga que predomina no Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte, Natal, RN, outubro de 2012.

O Parque da Cidade promove a integração de dois bairros com características socioambientais e socioeconômicas distintas e na porção norte está rodeado por ocupações clandestinas ocorridas a mais de uma década (RAMALHO; PIMENTA, 2010; SEMURB, 2008). Um dos principais problemas deste parque é a presença de gatos domésticos abandonados. A prefeitura de Natal estimou em 2012 (SEMURB, 2012) que mais de 150 gatos vivem neste local, porém nenhum trabalho abrangente foi realizado para contabilizar o número real de animais presentes em todo o território do parque.

A ZPA 2 está localizada na zona leste de Natal e se refere ao Parque Estadual Dunas de Natal e a chamada Área de Tabuleiro Litorâneo, sendo as áreas adjacentes Campo de Instrução do Capim Macio e as áreas dunares da Vila Costeira (IDEMA, 2011).

O Parque das Dunas de Natal ($5^{\circ} 48' 49.81''$ – $5^{\circ} 52' 03''$ S e $35^{\circ} 11' 36.11''$ O) caracteriza-se pela predominância de espécies peculiares aos Tabuleiros Litorâneos, Floresta Atlântica e ainda das Caatingas (FREIRE, 1990). A área selecionada para a captura dos animais silvestres do estudo apresenta fitofisionomia típica de Mata Semidecídua com árvores de grande porte e sub-bosque bem definido (Figura 3).

Figura 3 – Área selecionada para captura de dos animais no Parque das Dunas com características de Mata Semidecídua, Natal, RN, outubro de 2012.

As ações antrópicas no Parque das Dunas devem-se à presença de um anel viário, que praticamente circunda toda a sua extensão e na porção sudoeste, da construção do *campus* Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) que abrange 123 hectares (Figura 3). Ainda assim, devido ao seu maior tamanho e importância ecológica mundial, este parque sofre muito menos pressão antrópica que o Parque da Cidade.

4.2 Coleta de amostras biológicas e esterilização dos gatos.

Foi realizada uma campanha de sete dias para captura de gatos domésticos e coleta de amostras biológicas desses animais.

Duas vezes por dia os gatos que habitam o Parque da Cidade e o Parque das Dunas são alimentados por protetores voluntários que percorrem diversos locais ao entorno das duas UCs para tal finalidade. No momento em que os animais estão se alimentando se torna mais fácil a aproximação e a captura dos mesmos.

Estes gatos foram capturados e acondicionados em caixas transportadoras, levados para um alojamento montado exclusivamente para este fim e mantidos em jejum por 12 horas.

Em relação à faixa etária, os animais foram classificados em três grupos: filhotes (com dentes decíduos), jovens (com dentes permanentes e idade aproximada de até um ano) e adultos (com idade maior do que um ano).

Após esse período os animais foram examinados por veterinários, anestesiados e submetidos à cirurgia de esterilização. Durante a cirurgia amostras de sangue foram colhidas de cada um dos animais.

Os úteros foram removidos e conservados refrigerados para realização de bioensaio em camundongos na tentativa de isolamento de *T. gondii*. Os testículos e uma parte do sangue colhido foram conservados em Isopropanol a 80 % para análises moleculares, outra parte do sangue foi separada para retirada do soro para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*.

As amostras foram identificadas e encaminhadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), por via aérea, onde foram realizadas todas as análises.

Os animais permaneceram aos cuidados da equipe veterinária por 48 horas e após avaliação do estado físico foram liberados no mesmo local de captura ou encaminhados para adoção.

Todos os animais submetidos à esterilização tiveram uma pequena ponta da orelha esquerda cortada conforme a marcação internacional. O corte da ponta da orelha esquerda é o único método eficaz que existe atualmente para identificar um gato esterilizado numa colônia em programas Capturar-Esterilizar-Devolver (CED) uma vez que a identificação visual imediata é necessária nestes programas.

4.3 Captura de pequenos mamíferos terrestres e voadores

Para captura dos animais silvestres foram realizadas duas campanhas de campo sendo uma durante o período de seca (outubro de 2012) e outra durante o período de chuva (fevereiro de 2013).

Objetivando a captura dos animais silvestres foram utilizados diferentes métodos de acordo com os grupos pretendidos. Para captura dos animais não voadores foram utilizadas 80 armadilhas do tipo gaiolas com 45 cm de comprimento, 20 cm de altura e 20 cm de largura, (Shermman e Tomahawk). Diferentes atrativos foram utilizados como iscas (uma mistura de fubá, sardinha e pasta de amendoim). Estas armadilhas foram posicionadas em quatro diferentes áreas selecionadas em cada UC (Tabela 1). As armadilhas foram vistoriadas diariamente e os animais capturados foram transportados em sacos de pano para local apropriado nas próprias UCs para realização da coleta de amostras biológicas.

Para a captura de morcegos foram utilizadas três redes de neblina com 3,0 m de altura e 12,0 m de comprimento, que eram armadas no início do entardecer e mantidas abertas por um período de 5 a 6 horas em três diferentes locais em cada UC. Para algumas espécies de morcegos foram realizadas buscas ativas em abrigos e os animais capturados foram transportados em sacos de pano. Os animais foram identificados com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008; PAGLIA et al., 2012).

Todos os vertebrados foram identificados por especialistas e após identificação, coleta de material e de dados, os animais capturados recebiam uma anilha de marcação numerada e eram soltos no mesmo local de captura. Somente os animais das ordens Carnívora, Primates e Cingulata não foram marcados, porém nestes animais buscas de cicatrizes e outras marcas foram fotografadas para posterior identificação no caso de recaptura.

Quando necessário, os animais silvestres capturados eram anestesiados (com uma dose mínima de Xilasina e Quetamina que variou de acordo com o peso e tamanho do animal) para a coleta de sangue que foi realizada por punção cardíaca, pela veia caudal ou pela veia cefálica.

Três animais de cada espécie foram submetidos à eutanásia, para remoção de fragmentos dos pulmões, rins, baço, fígado, coração, língua e cérebro para análises moleculares. Parte do coração, língua e cérebro também foram utilizadas para o bioensaio em camundongos.

Alguns exemplares de animais, cuja identificação da espécie não foi possível no campo, foram também submetidos à eutanásia, fixados e depositados no Museu de História Natural da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUCMinas) após a identificação da espécie.

A amostragem dos animais foi realizada durante 15 dias e noites, dependendo da espécie animal analisada, nos meses de outubro de 2012, período seco na região estudada e fevereiro de 2013, início do período chuvoso.

As formas de coleta, tipo de marcação, tempo de amostragem e áreas (coordenadas geográficas) de captura para cada grupo de animal, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Formas de obtenção de amostras biológicas, tipos de marcação, tempo de amostragem e local de amostragem para cada grupo de animal nas duas Unidades de Conservação (UC) estudadas, Natal, RN.

<i>Animal</i>	<i>Forma de coleta</i>	<i>Tipo de marcação</i>	<i>Tempo de amostragem em cada UC por campanha</i>	<i>Local de Amostragem – Parque da Cidade</i>	<i>Local de Amostragem – Parque das Dunas</i>
Mamíferos não voadores	Captura <i>Live trap</i>	Anilhamento	15 dias/noites	Transecto 1 - 5°51'1.82"S; 35°13'43.12"O Transecto 2 - 5°51'1.08"S; 35°13'40.17"O Transecto 3 - 5°51'6.21"S; 35°13'39.14"O Transecto 4 - 5°50'44.22"S; 35°13'58.77"O	Transecto 1 - 5°48'41.91"S; 35°11'33.91"O Transecto 2 - 5°48'41.17"S; 35°11'32.80"O Transecto 3 - 5°48'47.88"S; 35°11'31.51"O Transecto 4 - 5°48'52.06"S; 35°11'30.16"O
Morcegos	Rede-de-neblina	Anilhamento	7 noites	Rede 1 - 5°50'49.10"S; 35°13'56.66"O Rede 2 - 5°50'39.71"S; 35°14'0.83"O Rede 3 - 5°50'40.06"S; 35°13'56.29"O	Rede 1 - 5°48'46.02"S; 35°11'31.21"O Rede 2 - 5°48'41.65"S; 35°11'34.54"O Rede 3 - 5°48'45.06"S; 35°11'35.32"O
Gatos domésticos	Captura manual	Corte na orelha esquerda	7 dias*	Posto 1 - 5°51'0.78"S; 35°13'34.72"O Posto 2 - 5°50'55.25"S; 35°13'32.01"O Posto 3 - 5°50'47.01"S; 35°13'28.22"O Posto 4 - 5°51'12.02"S; 35°13'36.12"O	Posto único - 5°48'41.91"S; 35°11'33.91"O

Nota: * = A captura ocorreu somente na segunda campanha.

4.4 Coleta de água para bioensaio em camundongos

Nas duas áreas de abrangência do estudo, não existem corpos d'água naturais, porém em ambas existem dois pequenos lagos artificiais (um em cada parque) que acumulam água da chuva e que servem de bebedouros para os animais destas áreas (Figura 4).

Figuras 4 – Corpos d'água registrados nas duas Unidades de Conservação, Natal – RN, 2012.

Imagem A

Imagem B

Legenda: Pequeno acúmulo de água presente no Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte, Natal - RN outubro de 2012. (Imagem A). Lago artificial presente no Parque das Dunas de Natal Jornalista Luiz Maria Alves (Imagem B).

Na tentativa de isolamento de *T. gondii* através de amostras de água destes corpos d'água, na segunda campanha, durante cinco dias consecutivos foram coletadas 10 amostras de água em cada UC, estas foram armazenadas em tubos tipo *Falcon* de 15 mL. Estas amostras permaneceram em temperatura ambiente durante cinco dias e após esse período, foram encaminhadas para o VPS, FMVZ, USP.

4.5 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T gondii*

Os soros obtidos foram examinados através do Teste de Aglutinação Modificada – MAT (DUBEY; DESMONTS, 1987). A diluição dos soros foi feita em microplaca (96 poços), usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146 M; NaH₂PO₄ 0,0026 M; Na₂HPO₄ 0,008 M) filtrada em membrana de policarbonato com 0,45µm de porosidade.

Em seguida, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12 M; H₃BO₃ 0,05m; NaN₃ 0,03 M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4 %), 35 µL de

mercaptoetanol 0,2 M e 50 µL de Azul de Evans 0,2 %. Essa mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25 µL de reagentes por poço.

Os soros diluídos foram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A placa foi selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada durante a noite em estufa a 37 °C. A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa foi anotado como resultado negativo e um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido foi anotado como positivo.

Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 foram considerados positivos (FORNAZARI et al., 2009; SILVA et al., 2001). Em todas as reações foram usados controles positivos e negativos previamente conhecidos e controles do antígeno.

4.6 Bioensaio em camundongos

Três espécimes de cada espécie animal das ordens Didelphimorphia, Rodentia e Chiroptera foram submetidos à eutanásia para a realização do bioensaio em camundongos, análises moleculares e depósito em coleção científica. Aqueles animais que por ventura vieram a óbito durante os procedimentos de captura e ou coleta de sangue também foram utilizados para este fim. Este procedimento segue regularização da licença obtida no SISBio.

Como modelo experimental, foram utilizados camundongos albinos Swiss, fêmeas e machos, com idade aproximada de dois meses provenientes do biotério do VPS, FMVZ, USP.

4.6.1 Digestão péptica de tecidos e filtragem das amostras de água e conteúdo intestinal

Pulmões, rins, baço, coração, língua, fígado e cérebro dos animais foram retirados com auxílio de tesoura e pinça sendo um par para cada animal. Fragmentos de cada um destes órgãos foram removidos e acondicionados, separadamente, em microtubos e identificados com um código de acordo com a espécie do animal e a data de coleta.

Os órgãos de eleição para o bioensaio foram: cérebro, coração e língua. Para as gatas submetidas à cirurgia de esterilização, o útero foi utilizado no bioensaio. As amostras de água coletadas nos dois Parques e amostras de intestino delgado e grosso de três gatos que morreram durante o estudo também foram submetidas ao bioensaio em camundongos.

Os órgãos foram colocados sobre folha de papel alumínio e cortados em pequenos pedaços com auxílio de tesouras e pinças estéreis. Utilizando uma balança de precisão o

material picotado foi pesado e a cada 10 g de tecido foi acrescentado 100 mL de solução salina. O material foi mantido em banho-maria à 37 °C e após atingir esta temperatura, foi adicionada pepsina (v/v), permanecendo em banho-maria por uma hora.

Com auxílio de um filtro de gaze estéril o material digerido foi filtrado, homogeneizado e acondicionado em tubos tipo *Falcon* de 50 mL. As amostras foram centrifugadas em centrífugas refrigeradas por 10 minutos a 2500 g.

O sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução salina para ressuspender o sedimento. Esta solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Após esse procedimento a solução foi completada com salina 0,85% até 50 mL e novamente esta foi centrifugada por 10 minutos a 2500 g.

O sobrenadante foi novamente descartado, ao sedimento foi adicionada penicilina e estreptavidina (v/v) e, após homogeneizar a solução, o conteúdo foi inoculado em três a cinco camundongos sendo 1 mL por via subcutânea por animal.

Para as amostras de água e do conteúdo intestinal dos gatos que vieram a óbito foi realizada a técnica de filtração através do uso de peneiras de 70, 100, 200 e 400 nanômetros e centrifugação por 10 minutos à 12.000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e ao concentrado final foi adicionada uma dose de antibiótico (v/v). Ao final as amostras de água provenientes do mesmo local foram reunidas em somente um tubo *Falcon* totalizando uma amostra de cada UC e as três amostras de conteúdo intestinal de cada gato foram filtradas separadamente. Estas soluções foram inoculadas através da via oral em dois grupos de cinco camundongos.

Todos os camundongos foram marcados com ácido pícrico (cabeça-cauda-dorso) e acondicionados em caixas de poliestireno com cama de maravalha sendo uma caixa para cada grupo de três a cinco camundongos que correspondiam a um animal examinado e das amostras de água. Os animais eram observados diariamente para a presença de eventuais sintomas da infecção por *T.gondii*. Após nove semanas, amostras de soro dos camundongos foram obtidas e testadas pelo MAT para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* com ponto de corte de 25. O sangue dos camundongos foi obtido através da via submandibular com auxílio de lanceta estéril para cada grupo de camundongos.

Depois da nona semana os animais que sobreviveram foram submetidos a eutanásia com injeção intrapulmonar de embutramida e iodeto de mebezônio (T-61[®], Intervet, Cotia, São Paulo, Brasil) e foi realizada a investigação de cistos cerebrais de *T. gondii* através de exames microscópios de esfregaços. Amostras de coração e cérebro de todos os camundongos foram congeladas para realização de testes moleculares.

4.7 Testes moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em material genético extraído de fragmentos todos os órgãos colhidos e de amostras de sangue total conservados em isopropanol a 80%.

4.7.1 Extração do DNA das amostras de tecido e de sangue

A extração do DNA dos tecidos foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit Wizard SV Genomic DNA Purification[®] (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) o qual promove a lise das células através da mistura de 0,5 g de tecido e 20 µL da enzima proteinase K[®] (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Esta solução foi mantida por 24 horas na temperatura de 37 °C e após este período foi acrescentado 1 mL de resina. Esta segunda solução foi colocada em uma coluna contendo um filtro onde fica retido o material genômico após a filtração.

Posteriormente, foram realizadas lavagens para retirada da resina contendo o DNA com soluções descontaminantes. Este eluído foi ressuspensionado em tampão apropriado, para a realização das técnicas de amplificação gênica dos fragmentos específicos para diagnóstico do *T. gondii* e de outros coccídeos da subfamília Toxoplasmatinae.

4.7.2 Extração do DNA das amostras de conteúdo intestinal e de água

A extração do DNA das amostras de conteúdo intestinal e de água foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit Wizard SV Genomic DNA Purification[®] (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Em 100 µL de cada amostra foram acrescentados 700 µL de solução de lise (descrita no item 4.7.1). As soluções foram homogeneizadas vigorosamente e submetidas ao congelamento em banho de gelo seco por dois minutos e em seguida submetidas à temperatura de 37 °C por mais dois minutos. Este processo foi repetido mais duas vezes e após as repetições foram acrescentados 5 µL de PK (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) em cada amostra. Estas amostras foram incubadas por quatro horas a 37 °C e novamente foi realizado o congelamento e descongelamento das amostras por mais três vezes. Adicionou-se mais 5 µL de PK em cada amostra e após este período, as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo para extração utilizado em tecidos e sangue. Para teste da

extração o produto extraído foi quantificado no aparelho nanodrop[®] (Hoefer, Wilmington, Delaware, USA).

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram testadas por meio de uma *nested* PCR (*nPCR*) específica para detecção de material gênico de *T. gondii*, tendo como alvo um fragmento de 155pd do gene B1 deste coccídio (BURG et al., 1989). Para a primeira fase de amplificação da PCR foram utilizados 10µM dos *primers* externos T1 (5'-AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA-3') e T2 (5'-TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT-3') e para a reação de *nPCR* foram utilizados 10µM dos *primers* internos T3 (5'-TGGGAATGAAAGAGACGCTAAT GTG-3') e T4 (5'-TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG-3'), utilizando o protocolo descrito por Yai e colaboradores (2003).

Nesta reação foram utilizados para cada amostra 14,1µL de água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0), 4,0 µL da mistura de dNTPs – dATP, dTTP, dCTP, dGTP (1,25 µM), 1,25 µL de cada *primer* (10 µM), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,15 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) *platinum*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1,0 µL da amostra de DNA extraído. Para a *nPCR* foram utilizadas as mesmas quantidades da mistura de reagentes acrescidas de 1,0 µL do produto amplificado na PCR.

A PCR foi realizada com 25 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1,5 minuto, e a *nPCR* com 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1,5 minutos. As reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose a 2,0 % corado com *Sybr Safe*[®] (Molecular Probes, Portland, Oregon, USA) e visualizados sobre luz ultravioleta.

As alíquotas das amostras positivas foram submetidas a uma nova *nPCR* para realização do sequenciamento. Para tanto, foram utilizando os *primers* desenhados com base nas sequências conservadas de *T. gondii*, *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcosystis neurona*, que amplificam um fragmento do gene que codifica RNA ribossômico 18S (18S rRNA) comum aos parasitas (SU; ZHANG; DUBEY, 2010).

A primeira reação foi realizada usando 25 µM dos *primers* externos Tg18s48F (5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') e Tg18s359R (5'-GTTACCCGTCCTGCCCAC-3'). A segunda reação foi realizada usando 50 µM dos *primers* internos Tg18s58F (5'-CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3') e Tg18s348R (5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC-3')

(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) que amplifica um produto com 290 pb para as espécies *S. neurona*, *N. caninum*, *H. hammondi* e *T. gondii* e com 310 pb para *Sarcocystis* spp (SU; ZHANG; DUBEY, 2010).

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR para uma reação de 36 µL: 22,92 µL de água ultrapura, 3,6 µL de tampão de reação (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0), 2,8 µL da mistura de dNTPs – dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2,5 µM), 0,2 µL de cada *primer* (25 µM), 2,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,28 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) e 6,0 µL da amostra de DNA extraído. Para a *n*PCR foram utilizadas as mesmas quantidades da mistura de reagentes com *primers* a 50 µM, utilizando-se 2 µL do produto da PCR diluído em água ultra pura (1:2). Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura.

A PCR foi realizada com 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 55 °C por 1 min e 72°C por 2 min, e a *nested*-PCR com 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min. As reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 min. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2,0 % corado com *Sybr Safe*® (Molecular Probes, Portland Oregon, USA) e visualizados sobre luz ultravioleta para checar a qualidade do produto da PCR.

4.7.4 Purificação, Precipitação do DNA e reação de sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation®, Santa Clara, California, USA), que é composto por Exonuclease I (*Exo* I) para digerir o excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar o excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

Para determinar a sequência genética, o material já purificado foi utilizado como amostra na reação de sequenciamento através do método de Sanger utilizando-se ddNTP marcados. Para tanto, foi preparado um mix com reagentes para o sequenciamento acrescidos de apenas um dos *primer* e da amostra purificada, para cada amostra duas reações foram executadas, uma com o *primer* senso e outra com o *primer* anti-senso.

Cada reação continha:

- 1 µL de *primer* (senso ou anti senso);
- 2 µL de Tampão *Save Money* 5 x (Tris-HCl 400 mM; MgCL₂ 10 mM, pH 9,0);
- 2 µL de *BigDye* (USB Corporation®, Santa Clara, California, USA) v. 3.1.
- 5 µL de amplificado

As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa de temperaturas:

- Desnaturação inicial: 96 °C por um minuto

- Desnaturação: 96 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/s

- Hibridização: 50 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/s

- Extensão: 60 °C por quatro minutos

Rampa: 1,0 °C/s

Este ciclo se repetiu mais 34 vezes a partir da desnaturação. Finalizando este procedimento, as amostras foram mantidas a 4 °C até a próxima etapa.

O passo seguinte foi a precipitação do material em placa, nessa etapa foram adicionados 5 µL de EDTA (125 mM) e 60 µL de etanol a 100 % em cada poço da placa contendo o material genômico proveniente da reação de sequenciamento. A placa foi vedada com plástico parafilme; homogeneizada com cuidado e incubada por 30 minutos em ambiente escuro.

Após a incubação a placa foi centrifugada por 30 minutos a 12 °C a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida por 30 segundos a 500 rpm. Foram então, adicionados 60 µL de etanol a 70% em cada poço da placa e feita uma nova centrifugação por 15 minutos a 12 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado por inversão e uma nova centrifugação por 30 segundos a 500rpm foi realizada. As amostras eram mantidas a 20 °C até o momento da leitura.

A leitura foi feita em um sequenciador modelo *Applied Biosystem*[®] ABI370 (*Applied Biosystem*, Pasadena, California, USA) e os programas os cromatogramas gerados foram analisados em programas de computador apropriados.

4.7.5 Alinhamento e análises das sequências

A qualidade dos produtos sequenciados foi verificada utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e submetidas a alinhamentos múltiplos alterando os parâmetros relativos à presença de “indels” (penalidade para *indel*=1, extensão=3) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997).

Para que fosse possível selecionar as sequências de organismos conhecidos com a maior porcentagem de similaridade com as sequências encontradas nas amostras analisadas foi utilizada a ferramenta de busca e alinhamento BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). As sequências de nucleotídeos indicadas pelo BLAST que geraram o maior valor de similaridade para as sequências

(99 ou 100 %) disponíveis no *Genbank* foram consideradas como sendo pertencentes à mesma espécie.

4.8 Análise estatística dos dados

Possíveis associações entre os valores de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* nos animais capturados em cada parque foram verificadas através do teste Qui-quadrado de Pearson. Também analisou-se possíveis associações entre a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* nos animais que utilizam o mesmo estrato arbóreo (marsupiais, primatas e morcegos) em cada um dos parques pelo mesmo teste.

As mesmas associações foram verificadas para os animais que foram positivos através do diagnóstico molecular utilizando o teste Exato de Fisher.

Em relação aos gatos capturados, associações entre faixas etárias, sexo e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* foram avaliadas através do teste Qui-quadrado de Pearson. Possíveis associações entre número total de amostras positivas para o teste molecular e número total de amostras coletadas foram verificadas através do teste Exato de Fisher.

Para todas as análises foi utilizado o programa EPI-INFO 6, um programa desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta (Atlanta, Georgia, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

No Apêndice A, encontram-se os dados dos 92 animais silvestres capturados sendo: sorologia para *T. gondii*, pesquisa de *T. gondii* no sangue por métodos moleculares, além de análises dos tecidos (bioensaio em camundongos e teste molecular) dos animais necropsiados (69 indivíduos). No Apêndice B, encontra-se o detalhamento das amostras dos gatos capturados (local de captura, sexo e idade) e os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e das análises moleculares do sangue e tecidos.

5.1 Número de espécies registradas e número de amostras obtidas

Foram identificadas 18 espécies de mamíferos silvestres, sendo três pertencentes a ordem Rodentia, oito pertencentes a ordem Chiroptera, quatro pertencentes a ordem Didelphimorphia, uma espécie pertencente à ordem Cingulata, uma espécie pertencente à ordem Primates e uma espécie pertencente à ordem Carnivora (Tabela 2).

No Parque da Cidade foram capturados representantes de dez diferentes espécies e no Parque das Dunas foram capturados indivíduos de 12 diferentes espécies.

Ao todo foram obtidas amostras biológicas de 154 mamíferos (92 animais silvestres e 62 gatos domésticos). Dos mamíferos silvestres, 34 (37 %) foram provenientes do Parque da Cidade e 58 (63 %) provenientes do Parque das Dunas e, em relação aos gatos, 58 (93,5 %) e 4 (6,5 %) habitavam, respectivamente, o Parque da Cidade e o Parque das Dunas.

Tabela 2 – Ordem, espécies e quantidade de mamíferos silvestres capturados e amostrados nas Unidade de Conservação (Parque da Cidade e Parque das Dunas) em Natal, RN (2012 e 2013).

Ordem	Espécie	Nome Popular	Nº de Indivíduos		
			Pq. da Cidade	Pq. das Dunas	Total
Rodentia	<i>Necromys lasiurus</i>	rato-do-mato	2	0	2
	<i>Thrichomys apereoides</i>	rato-de-espinho	0	1	1
	<i>Rattus rattus</i>	rato-do-telhado	0	1	1
Chiroptera	<i>Artibeus lituratus</i>	morcego	1	15	16
	<i>Myotis nigricans</i>	morcego	0	14	14
	<i>Uroderma bilobatum</i>	morcego	1	7	8
	<i>Sturnira lilium</i>	morcego	1	0	1
	<i>Carollia perspicillata</i>	morcego	6	1	7
	<i>Lichonycteris degener</i>	morcego	2	0	2
	<i>Glossophaga soricina</i>	morcego	0	2	2
	<i>Centronycteris maximiliani</i>	morcego	0	1	1
Carnívora	<i>Lycalopex vetulus*</i>	raposinha	1	0	1
Cigulata	<i>Euphractus sexcinctus*</i>	tatu-peba	2	0	2
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	timbú, gambá	14	11	25
	<i>Monodelphis domestica</i>	cuíca	4	0	4
	<i>Caluromys philander</i>	rato-cachorro	0	1	1
	<i>Cryptomys agricolai</i>	cuíca	0	1	1
Primates	<i>Callithrix jacchus*</i>	saguí, mico	0	3	3
Total			34	58	92

Nota: * = Estas espécies não são consideradas pequenos mamíferos, porém foram capturadas em gaiolas modelo Tomahawk e por esse motivo foram consideradas nas análises.

O delineamento experimental do estudo é apresentado no fluxograma (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma ilustrando o direcionamento das amostras biológicas obtidas nas duas coletas em campo (período de chuva e seca) no Parque da Cidade e no Parque das Dunas, Natal, RN.

5.2 Diagnóstico sorológico

5.2.1 Diagnóstico sorológico em animais silvestres

Foram obtidas ao todo 74 amostras de soro de animais silvestres. A relação dos animais silvestres amostrados e os resultados da sorologia para anticorpos anti-*T. gondii* (MAT) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de indivíduos por espécie examinados e positivos para anticorpos anti-*T. gondii* em cada uma das UCs avaliados pelo MAT (≥ 25), Natal, RN (2012 e 2013).

Espécie	Nome comum	Parque das Dunas		Parque da Cidade		Total	
		Examinados	Positivos	Examinados	Positivos	Examinados	Positivos (%)
Rodentia							
N. lasiurus	rato-do-mato	0	0	2	0	2	0 (0,0)
T. apereoides	rato-punaré	1	1	0	0	1	1 (100,0)
R. rattus	rato-do-telhado	1	1	0	0	1	1 (100,0)
Chiroptera							
A. lituratus	morcego	15	2	1	0	16	2 (12,5)
M. nigricans	morcego	7	2	0	0	7	2 (28,6)
U. bilobatum	morcego	7	2	1	0	8	2 (25,0)
S._lilium	morcego	0	0	1	0	1	0 (0,0)
C. perspicillata	morcego	1	1	3	3	4	4 (100,0)
L. degener	morcego	0	0	1	0	1	0 (0,0)
G. soricina	morcego	2	0	0	0	2	0 (0,0)
C. maximiliani	morcego	1	1	0	0	1	1 (100,0)
Carnivora							
L. vetulus	raposinha	0	0	1	1	1	1 (100,0)
Cingulata							
E. sexcinctus	tatu-peba	0	0	2	1	2	1 (50,0)
Didelphimorphia							
D. albiventris	gambá; timbu	9	6	13	10	22	17 (77,3)
M. domestica	rato-cahorro	0	0	3	2	3	2 (66,7)
Primate							
C. jaccus	sagui; mico	2	0	0	0	2	0 (0,0)
Total (%)		46 (100)	16 (34,8)	28 (100)	18 (64,3)	74 (100)	34 (45,9)

Houve associação entre o número total de animais silvestres soropositivos e a UC de origem, quando avaliadas através do teste de Qui-quadrado de Pearson ($p = 0,018$), demonstrando que animais do Parque da Cidade apresentaram uma ocorrência maior (64,3 %) a anticorpos anti-*T. gondii* que os do Parque das Dunas (34,8 %).

Entre os animais que utilizam o mesmo estrato arbóreo (marsupiais, primatas e morcegos) também foi observada associação quando comparadas as ocorrências de animais soropositivos em cada uma das UCs ($p = 0,021$), e também observou-se maior ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* nos animais do Parque da Cidade (70 %) em relação aos do Parque das Dunas (31,8 %). Para esta associação foram selecionados animais que utilizam o mesmo estrato arbóreo e que tenham em sua dieta itens similares (como frutas e insetos).

A figura 6 ilustra as proporções e as respectivas porcentagens de espécies que apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* em cada uma das UCs avaliadas.

Figura 6 - Número de indivíduos de cada espécie de animal silvestre capturado que apresentaram sorologia positiva para anticorpos anti-*T. gondii* no Parque da Cidade e no Parque das Dunas, Natal - RN, 2013.

Levando em consideração os dois diferentes estratos (estrato arbóreo e solo) em ambos os Parque, não foi observada associação entre os animais arborícolas soropositivos e os semi-fossoriais, em cada uma das UCs, segundo o método exato de Fisher ($p = 0,67$).

Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* variaram de 25 a 3.200, sendo que 88,3% (30 animais) dos soropositivos apresentaram títulos de 25 a 100 e 11,7% (4 animais) apresentaram títulos entre 200 a 3.200 (Tabela 4).

Não houve associação entre animais positivos para anticorpos anti-*T. gondii* e as diferentes estações do ano avaliadas (seca e chuva) segundo o método exato de Fisher ($p = 1,00$).

Tabela 4 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em animais silvestres naturalmente infectados no Parque das Dunas e no Parque da Cidade nos períodos de chuva e seca. Natal - RN, 2013.

Título	Parque das Dunas		Parque da Cidade		% Total
	Chuva	Seca	Chuva	Seca	
25	6	2	4	2	41,2
50	0	0	9	0	26,5
100	2	2	1	2	20,6
200	2	0	0	1	8,8
3.200	0	0	1	0	2,9
Total	10 (n =21)	4 (n =25)	15 (n =21)	5 (n =7)	100

Nota: n = número total de animais examinados pelo MAT.

5.2.2 Diagnóstico sorológico em gatos domésticos

Em relação aos gatos, das 53 amostras de soro obtidas, 52 eram de gatos que viviam no Parque da Cidade e somente uma foi proveniente de um gato que vivia no Parque das Dunas. Dessas, 28 foram soropositivas para *T. gondii* representando 52,8% do total analisado.

Durante as duas campanhas de campo o número de gatos observados e contados no Parque das Dunas não ultrapassou 20 animais e destes somente quatro foram passíveis de captura. Do único gato que foi possível obter amostra de sangue, uma fêmea adulta, esta apresentou soropositividade para *T. gondii* com título igual a 50. Já no Parque da Cidade o número de gatos contados nas duas campanhas ultrapassou 150 animais. Devido ao baixo número de gatos domésticos testados no Parque das Dunas não foi possível fazer comparações estatística entre as duas áreas.

Entre os animais considerados jovens capturados no Parque da Cidade 50 % (22/44) foram soropositivos. Os adultos apresentaram soropositividade de 62,5 % (5/8). Não houve

diferença estatística entre as proporções de animais soropositivos jovens e adultos ($p = 0,55$). Em relação ao sexo, 50 % (15/30) das fêmeas e 54,5 % (12/22) dos machos foram positivos e também não foi observada associação entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* e o sexo dos gatos ($p = 0,79$).

A proporção de gatos soropositivos segundo a faixa etária e o sexo é apresentada na figura 7.

Figura 7 - Proporção de gatos do Parque da Cidade soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*, segundo o sexo e a faixa etária. Natal, RN, 2013.

Os títulos variaram de 25 a 12.800, sendo que 13 animais apresentaram título de 25, três de 50; seis de 100, um de 200, dois de 400, um de 1.600, um de 6.400 e um de 12.800. Os valores individualizados de anticorpos anti-*T. gondii* encontram-se no anexo B.

5.3 Bioensaio em camundongos

Apartir das amostras obtidas em campo, foram realizados 116 bioensaios em camundongos, sendo dois destes com as amostras de água obtidas de cada uma das UCs, 69 com tecidos de animais silvestres (cérebro, coração e língua) e 45 com tecidos dos gatos domésticos. Dos felinos, 37 bioensaios utilizaram tecidos de úteros de gatas esterilizadas, três utilizaram pool de cérebro, coração e língua de animais que vieram a óbito durante o período

de amostragem, três foram realizados com pool de amostras de conteúdo intestinal, obtidas dos mesmos gatos que vieram a óbito, e dois com amostras de fetos de duas gatas gestantes que foram submetidas à esterilização (Tabela 5).

Tabela 5 – Número e tipo de amostras de animais e de água obtidas e bioensaios em camundongos realizados, para o isolamento de *T. gondii* Natal – RN (2012 e 2013).

Amostra	Tecido utilizado	Via de inóculo	Número de amostras obtidas	Número de bioensaios realizados
Morcegos	Língua, coração, cérebro	Subcutâneo	53	53
Marsupiais	Língua, coração, cérebro	Subcutâneo	12	12
Roedores	Língua, coração, cérebro	Subcutâneo	4	4
Gatos	Língua, coração, cérebro	Subcutâneo	3	3
	Fetos	Subcutâneo	2	2
	Úteros	Subcutâneo	37	37
	Conteúdo intestinal	Oral	3	3
Água	-	Oral	20	2

De todos os camundongos submetidos ao MAT no final da nona semana pós-inoculação, somente sete (representando quatro amostras) apresentaram sorologia positiva e com o mesmo título (100). Sete camundongos vieram a óbito durante o período do bioensaio. Estes animais foram necropsiados e tiveram seus corações e cérebros removidos para pesquisa de *T. gondii* através de leitura microscópica de lâminas com fragmentos de parte destes órgãos e também, através de exames moleculares (os mesmos realizados para as amostras primárias).

Das amostras de silvestres submetidas ao bioensaio em camundongos, 18 amostras eram provenientes de animais soropositivos e das amostras de gatos 17 eram provenientes de gatos soropositivos. Destas amostras, não foi possível obter nenhum isolado de *T. gondii*, porém, um camundongo, que recebeu inóculo proveniente de *pool* de tecido de coração, língua, cérebro e fetos de uma gata encontrada atropelada na entrada do Parque da Cidade (amostra 69), veio a óbito cinco dias após a inoculação. Neste, foi possível observar taquizoítas em fluido pulmonar. Devido a uma infecção bacteriana, este material foi impedido de ser repassado para outros camundongos, impossibilitando o isolamento do parasita. Quatro outros camundongos que receberam o mesmo inóculo também vieram a óbito após sete dias, porém não foram observados taquizoítas em fluido pulmonar. Pelo bioensaio em camundongos nenhum isolado de *T. gondii* foi obtido.

5.4 Pesquisa molecular de *T. gondii*

A *n*PCR para amplificação do gene B1 foi feita diretamente em 682 amostras obtidas dos animais. Estas amostras representavam os 92 animais silvestres capturados. Destes, 69 foram necropsiados (483 amostras de tecidos) e 74 tiveram o sangue coletado totalizando 557 amostras. As amostras restantes foram obtidas dos gatos submetidos à histerectomia total (62 animais), os animais que vieram a óbito durante o período de coleta de amostras (8 amostras provenientes de 3 animais) e/ou que tiveram o sangue coletado (53 animais) totalizando 123 amostras. Amostras de água coletadas durante as campanhas, 2 amostras, completaram o total analisado.

5.4.1 Testes moleculares de amostras provenientes de animais silvestres

Todos os animais silvestres capturados foram testados em pelo menos um tipo de amostra (tecidos ou sangue). Aqueles animais que foram soltos tiveram o sangue coletado e, portanto, foram testados somente pelo sangue. Do total de animais silvestres testados, 15 animais (16,3 %) foram positivos em pelo menos um dos tecidos ou pelo sangue analisados (Tabela 6).

As amostras positivas no diagnóstico molecular baseados em sequências do gene B1 para *T. gondii* (29 amostras correspondendo a 15 animais), foram submetidas a uma nova reação de *n*PCR cujo alvo foi a região do espaçador intergênico transcrito da subunidade menor do gene ribossômico (ITS-SSU rDNA) para sequenciamento e confirmação do agente. Foi obtida uma sequência proveniente de *D. albiventris* que mostrou-se 100 % similar a *T. gondii* de isolados de galinha no estado da Bahia (GONÇALVES et al., 2012).

Tabela 6 – Identificação dos animais de cada Parque amostrados e resultados obtidos para a presença de *T. gondii* pelo gene B1 utilizando-se diferentes tecidos e sangue relacionados com os resultados da sorologia e do sequenciamento.

Código	Espécie	Local	Campanha	Órgãos Examinados para B1								MAT	Sequenciamento *Identidade com isolados de <i>T.gondii</i>
				Co	Ce	Li	Ba	Fi	Ri	Pu	Sa		
24S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. da Cidade	1	N	N	N	P	P	N	N	N	N	CHICKTGBRBA30,03,86,24,23,11
46S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	1	P	P	N	P	P	P	P	N	N	
42S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	1	P	P	P	N	N	N	N	N	P	
74S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	2	P	P	N	N	N	N	N	N	N	
73S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	2	N	P	N	P	P	N	P	N	N	
97S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	2	N	N	N	P	N	N	N	N	N	
98S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	2	P	N	N	N	N	N	N	N	N	
99S	<i>A. lituratus</i> (morcego)	Pq. das Dunas	2	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
16S	<i>C. perspicillata</i> (morcego)	Pq. da Cidade	1	P	N	N	N	N	N	N	N	P	
17S	<i>C. perspicillata</i> (morcego)	Pq. da Cidade	1	P	N	N	N	N	N	N	N	P	
28S	<i>D. albiventris</i> (gambá)	Pq. da Cidade	1	N	P	N	P	N	P	N	N	P	
48S	<i>D. albiventris</i> (gambá)	Pq. das Dunas	1	P	P	N	N	N	N	N	N	P	
68S	<i>D. albiventris</i> (gambá)	Pq. das Dunas	2	N	N	N	P	N	N	N	N	P	
40S	<i>G. soricina</i> (morcego)	Pq. das Dunas	1	N	N	N	N	N	N	N	P	N	
25S	<i>M. domestica</i> (cuica)	Pq. da Cidade	1	N	P	N	N	N	N	N	N	P	
Total = 15				7	8	1	6	3	2	2	1	-	

Nota: Co = Coração; Ce = Cérebro; Li = Língua; Ba = Baço; Fi = Fígado; Ri = Rim; Pu = Pulmão; Sa = Sangue; **P** = positivo; N = Negativo; * = comparações pelo Genbank, Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.

A análise da presença de *T. gondii* através da amplificação molecular da região do gene B1, demonstrou positividade em 16,3% (15/92) dos 92 animais analisados. Do total de morcegos analisados nas duas UCs, 21,6% (11/51) foram positivos. Já os marsupiais positivos em ambos os parques representaram 12,9% (4/31) do total analisado.

Não houve associação entre o número de animais positivos quanto à presença de DNA de *T. gondii* e a UC de origem ($p = 1,00$), segundo o teste exato de Fisher. Do total de animais amostrados no Parque das Dunas 17,2 % (10/58) foi positiva em pelo menos uma amostra de tecido ou sangue examinado e do Parque da Cidade foram 14,7 % (5/34) os positivos, em pelo menos uma amostra.

Levando em consideração os animais capturados em cada UC e os dois diferentes estratos (arbóreo e solo) também não houve associação entre a detecção de *T. gondii* pelo gene B1 e o estrato utilizado segundo o teste exato de Fisher ($p = 0,59$). Dos animais positivos para o gene B1 somente a espécie *M. domestica* é considerada uma espécie não arborícola.

Oito morcegos que foram positivos no teste molecular não apresentaram sorologia positiva para *T. gondii*. Estes resultados estão detalhados no apêndice A.

5.4.2 Testes moleculares de amostras provenientes dos gatos

Fragmentos de DNA de *T. gondii* foram detectados em cinco gatos que tiveram o sangue ou tecidos analisados. Este resultado representa 8,1 % (5/62) dos gatos avaliados nas duas UCs (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da nPCR (gene B1) de amostras de DNA positivas para *T. gondii* obtidas de tecidos e sangue dos gatos domésticos das UCs e a relação com os resultados do MAT, Natal, RN, 2013.

Código	Idade	Sexo	Local	Tecido positivo em B1								MAT
				Co	Ce	Li	CI	Ut	Te	Sa	Fe	
G69* [#]	Adulto	Fêmea	Pq da Cidade	P	P	N	N	P	-	N	P	P
G213	Jovem	Macho	Pq da Cidade	-	-	-	-	-	P	N	-	P
G27	Adulto	Fêmea	Pq da Cidade	-	-	-	-	N	-	P	-	P
G110	Jovem	Fêmea	Pq da Cidade	-	-	-	-	N	-	P	-	P
G107 $\triangle$ *	Filhote	Fêmea	Pq da Cidade	N	P	N	N	N	-	-	-	-
Total = 19				1	2	0	1	1	1	1	0	14

Nota: Co = Coração; Ce = Cérebro; Li = Língua; CI = Conteúdo Intestinal; Ut = Útero; Te = Testículo; Sa = Sangue; Fe = Fetos; * = Animal testado para todos os tecidos; # = animal encontrado morto, $\triangle$ = animal sem amostra de sangue coletada; **P** = Positivo; N = Negativo; - = exame não realizado.

Não houve associação entre o sexo ($p = 0,14$) e a idade dos gatos e a detecção molecular de *T. gondii* nos tecidos ($p = 0,70$).

5.4.3 Testes moleculares realizados nas amostras de água provenientes das UCs

Todas as amostras de água foram negativas nas análises moleculares. O produto extraído foi quantificado no aparelho nanodrop (Hoefer[®], Wilmington, Delaware USA) e foi detectada a presença de ácidos nucleicos em todas as amostras.

5.4.4 Testes moleculares dos camundongos utilizados no bioensaio

Todos os camundongos do bioensaio tiveram seus órgãos (coração, baço, fígado, rim, língua, pulmão e cérebro) removidos para o diagnóstico molecular de *T. gondii*.

As *n*PCR realizadas nas amostras de tecidos coletados dos camundongos detectaram dez amostras positivas provenientes de cinco camundongos inoculados com tecidos de língua, coração, cérebro e fetos da gata encontrada atropelada na portaria do Parque da Cidade (amostra 69), confirmando a presença de *T. gondii* nestes animais.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram um quadro geral já conhecido e bem estabelecido para as regiões tropicais do globo. É claramente visível que na cidade de Natal *T. gondii* tem uma população bem estabelecida e conta com uma variedade de hospedeiros intermediários bem abrangente, o que geralmente não ocorre na maioria dos centros urbanos de outras regiões onde não existem amplas áreas verdes dentro da região urbanizada dos municípios e o número de animais silvestres é reduzido (PENA et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2013).

Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 34 (45,9 %) dos 74 animais silvestres capturados e examinados através do MAT. A comparação com outros estudos é difícil, uma vez que as amostras foram colhidas de animais silvestres de diversas espécies que possuem hábitos distintos entre si e que não são frequentemente alvos de pesquisas referentes à sanidade.

Um estudo recentemente, publicado por Siqueira e colaboradores (2013), identificou anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT (≥ 25), em diversas espécies de roedores e marsupiais em áreas próximas ao município de Recife, região nordeste do Brasil. Nos animais analisados no estudo de Recife, 6,7 % (15/223) dos marsupiais e 5,7 % (10/174) dos roedores apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*.

No presente estudo, 76 % (19 / 25) dos marsupiais apresentaram soropositividade para *T. gondii* demonstrando uma ocorrência muito maior de animais infectados com este parasito quando comparado a outras regiões florestadas do nordeste brasileiro (SIQUEIRA et al., 2013). Estes resultados apontam a possível interferência causada pela presença da grande quantidade de gatos domésticos nas áreas estudadas e reforça a necessidade de maiores estudos desse agente na cidade de Natal, bem como a intervenção dos órgãos governamentais para a realização de planos de ação para o controle da população de gatos abandonados na cidade e campanhas de esclarecimento, junto à população, da importância desse controle.

Dentre as espécies capturadas nas Ucs estudadas se destaca a espécie *Didelphis albiventris*, que demonstrou altos valores de ocorrência para anticorpos anti-*T. gondii* (77,8 % do Parque da Cidade e 76,9 % no Parque das Dunas). *D. albiventris*, conhecido popularmente como gambá-de-orelha-branca em parte do país ou timbú no nordeste, é comumente encontrado na área de estudo. Durante a segunda campanha um indivíduo foi visto comendo restos de lixo orgânico em uma rua do entorno do Parque da Cidade, confirmando suspeitas

do alto grau de antropização desta espécie. Estes animais não correm risco de extinção local e são vistos como espécie oportunista em ambientes antropizados. Além disso, quando em altas densidades têm sido descritos como bioindicadores de áreas florestais degradadas (MIKICH et al., 2003; PAGLIA et al., 2012). Uma amostra positiva para *T. gondii* proveniente de um *D. albiventris* foi sequenciada e obteve 100 % de similaridade com *T. gondii* de isolados de galinhas caipiras da Bahia (GONÇALVES et al., 2012).

O verdadeiro papel dos pequenos mamíferos na epidemiologia da toxoplasmose só pode ser avaliado pelo isolamento do parasita viável (DUBEY et al., 1995). Há poucos dados comparando a soroprevalência e o isolamento do parasita em amostras de animais silvestres e *T. gondii* viável tem sido isolado de roedores soronegativos (DUBEY et al., 1995; SIQUEIRA et al., 2013). Em animais silvestres é muito difícil realizar o isolamento do *T. gondii* através das técnicas convencionais que demandam tecidos de amostras primárias, o que é inviável em relação à preservação da fauna silvestre, ecologia e a ética científica. No presente estudo, apesar do grande esforço empregado (116 bioensaios realizados) não foi possível isolar *T. gondii* de nenhum animal.

O número de animais positivos no teste molecular (16,3 %) foi relativamente baixo se comparado à sorologia (45,9 %). De todos os tecidos examinados para o gene B1, amostras do cérebro, coração e baço foram as mais frequentemente positivas (8, 7 e 6 amostras respectivamente), com exceção do baço estes são órgão de eleição para o diagnóstico de *T. gondii* em grande parte dos estudos com espécies domésticas (DUBEY et al., 2012).

O diagnóstico molecular de *T. gondii* utilizado neste estudo, tendo como alvo o gene B1, é bastante difundido em estudos com este coccídio. O gene B1, desde a década de 80, é considerado altamente específico para o este parasito por possuir múltiplas repetições dentro do DNA, além de ser uma sequência bastante conservada entre suas diversas formas e cepas (BURG et al., 1989; KAUFMANN et al., 1996; SCHATZBERG et al., 2003; TERRA et al., 2004). O baixo valor de ocorrência nos animais avaliados pode ter ocorrido devido à baixa carga parasitária nos órgãos analisados, principalmente nos morcegos que são grupos de animais pouco conhecidos a respeito do parasitismo deste coccídio neste grupo de animais.

O número de morcegos positivos no diagnóstico molecular e negativos na sorologia (8 indivíduos) foi outro fator observado neste estudo. Não existe nenhum dado relativo à fisiologia destes mamíferos que demonstre o tempo necessário para que o animal produza anticorpos anti-*T. gondii* após se infectar e por quanto tempo estes anticorpos podem ser encontrados na circulação. Cabral e colaboradores (2013) realizaram bioensaio em camundongos em amostras de 283 morcegos e foi possível realizar o isolamento de *T. gondii*

em somente duas amostras, confirmando a dificuldade de isolamento a partir de amostras de morcegos.

Para o melhor entendimento da participação dos morcegos no ciclo da toxoplasmose seria importante a realização de trabalhos de infecção experimental nesses animais, o que forneceria informações sobre os títulos de anticorpos, aparecimento e tempo de persistência dos mesmos na circulação e informações sobre a patogenicidade deste coccídio nesses mamíferos voadores.

Comparando as duas UCs estudadas, pode-se concluir que o Parque da Cidade apresenta um quadro mais sério no tangente ao equilíbrio ecológico. Esta comparação não pode ser pautada somente na maior proporção de animais soropositivos para *T. gondii*, uma vez que mais da metade das amostras analisadas (59,8 %) eram provenientes de espécies da ordem Chiroptera, animais voadores que são capazes de transitar por grandes áreas e, portanto, não necessariamente estão presentes sempre no mesmo Parque. Entretanto, quando são analisados os resultados dos gatos, estes nos sugerem um quadro mais alarmante no Parque da Cidade.

Sabe-se que morcegos possuem extensas áreas de vida, que podem exceder 500 hectares (BERNARD; FENTON, 2003; ESBÉRARD, 2006; ESTRADA; COATES-ESTRADA, 2001). Estudos com radio-telemetria demonstraram o uso de mais de um habitat a cada noite por algumas espécies de morcegos enquanto outras usam pequenas áreas e restringem-se a proximidade do refúgio (BERNARD; FENTON, 2003). Entre estes animais existem espécies que possuem tanto a fidelidade ao refúgio, como a troca periódica deste (BERNARD; FENTON 2003). Também é comumente observado, em estudos de comportamento de morcegos, que vôos exploratórios estão restritos a algumas noites e a atividade de deslocamento e forrageio é reduzida ou intercalada por vários períodos de baixa atividade (FENTON et al., 1998; MORRISSON 1978, 1980). Tais aspectos resultam em baixas taxas de recaptura, geralmente inferior a 10% dos animais marcados (ESBÉRARD, 2006; MELLO; FERNANDEZ, 2000).

Dentre as espécies de morcegos analisadas se destaca *C. perspicillata* que apresentou altas taxas de positividade tanto pelo MAT (4 / 4) como pela *n*PCR para o gene B1(2 / 4). *C. perspicillata* é um morcego de pequeno porte encontrado comumente em áreas de restinga. Costumam ser muito abundantes em bordas de florestas e vegetações secundárias. Trata-se de uma espécie generalista que se alimenta tanto de frutas como de pequenos insetos (MIKICH et al., 2003). Trabalhos apontam que esta espécie é uma das mais fieis ao abrigo e sempre estão associadas à altas taxas de recaptura (ZORTÉA et al., 2010).

Entre outras diferenças das UCs estudadas, a presença de gatos domésticos no Parque da Cidade é bem maior que no Parque das Dunas. O estreitamento entre a relação de animais domésticos e animais silvestres pode, além de propiciar o aumento da competição por *habitat* selvagens e antropizados, resultar em transmissão de doenças de um grupo para o outro (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011).

No presente estudo, havia poucas informações sobre o número de gatos domésticos nas duas áreas estudadas, mesmo assim uma contagem inicial, realizada por profissionais da Prefeitura de Natal, em 2012, ressaltou que no Parque da Cidade havia em média 150 gatos concentrados em quatro pontos distanciados entre si por 400 metros (SEMURB, 2012). Estes pontos são locais onde existem os postos de coleta de água no lençol freático que abastece a cidade.

No Parque das Dunas não foi realizado nenhum senso para estimar o número de gatos presentes neste local, porém, durante a segunda campanha de campo deste trabalho, foram contabilizados somente 20 animais. Este número, mesmo que não seja respaldado por uma metodologia científica, demonstra que existe uma diferença nítida nas populações de gatos presentes em cada Parque estudado.

No Parque das Dunas o baixo número de animais capturados também pode ser explicado pelo extenso tamanho desta UC e ao grande número de pessoas que frequentam diariamente o local e afugentam os animais para partes mais internas do parque. Neste os gatos formam pequenos grupos no interior da mata e não permitem aproximação humana, sendo totalmente ferais.

De modo geral, o resultado de gatos soropositivos a *T. gondii* no entorno do Parque da Cidade (51,9 %) expressa um quadro alarmante para a saúde pública, porém, não muito distante do que tem sido observado por outros pesquisadores em animais domésticos com livre acesso às ruas e a áreas florestadas. Este tipo de população (gatos de rua) tem apresentado prevalências altas (DUBEY et al., 2002; GAUSS et al., 2003; LUCAS et al., 1999; SILVA et al., 2002), confirmando que animais não confinados apresentam um risco maior de exposição a *T. gondii*, seja pelos oocistos, ou através da ingestão de cistos ao se alimentarem principalmente de pássaros e roedores, confirmando a importância do carnivorismo.

Não existem estudos de soroprevalência em gatos no estado do Rio Grande do Norte, mas alguns dados já publicados em outras localidades do país demonstram diferenças marcantes entre as ocorrências em cada estado. No estado de São Paulo, no ano de 2006, Pena e colaboradores encontraram soropositividade para *T. gondii* em 23,4 % das amostras testadas

provenientes de gatos de rua de 15 diferentes municípios do Estado. Resultados semelhantes (26,7%) foram encontrados na cidade de São Paulo e Guarulhos, por Silva e colaboradores em 2002. Ambos os trabalhos utilizaram o MAT (≥ 25) como teste diagnóstico, o mesmo teste utilizado no presente estudo.

No Estado do Paraná, dois estudos, feitos em áreas rurais, revelaram frequências elevadas de anticorpos anti-*T. gondii* na população de gatos. Em propriedades rurais de Jaguapitã, foram encontrados 73 % de animais positivos (GARCIA et al., 1999) através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 16). Em Santa Isabel do Ivaí, 84,4 % dos gatos foram positivos através do MAT (≥ 25) (DUBEY et al., 2004). Apesar de aqui citados, comparações de valores de ocorrência devem ser analisadas com atenção devido a diferenças nas amostragens, técnicas sorológicas e pontos de corte utilizados nos diferentes estudos.

A alta ocorrência de gatos positivos para anticorpos anti-*T. gondii* pode ser fator importante no papel que estes animais representam na epidemiologia da toxoplasmose desse local, pela contaminação do ambiente com oocistos. É sabido que cada gato naturalmente infectado pode eliminar, em poucos dias, mais de 500 milhões de oocistos no ambiente quando infectado (DUBEY et al., 1989). Levando em consideração este valor, somente no Parque da Cidade, onde 28 gatos apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, pode-se estimar que estes animais possam ter sido os responsáveis pela eliminação de aproximadamente 14 bilhões de oocistos durante um período de suas vidas. É também bastante conhecida a alta resistência desses oocistos no ambiente, podendo permanecer viáveis por meses ou até anos (DUBEY et al., 1989). Vale lembrar que recentemente, no ano de 2010, um surto epidêmico de toxoplasmose humana foi registrado neste município, época em que foi instaurado um inquérito civil para apurar as ações empreendidas pelas Secretarias Municipais de Saúde de Natal e de Estado da Saúde do Rio Grande do Norte em face do aumento de casos de toxoplasmose humana naquele ano.

Em Santa Isabel do Ivaí, no Estado do Paraná, um surto de toxoplasmose humana foi associado à contaminação de um reservatório de água com oocistos de *T. gondii* (DUBEY et al., 2004), indicando o importante papel da água na epidemiologia de surtos por *T. gondii*. No Parque da Cidade, encontra-se um reservatório de água para grande parte da capital e os maiores grupos de gatos foram observados nestes locais de captação de água pela Companhia de Água e Esgotos do Estado do Rio Grande do Norte (CAERN).

A via hídrica é considerada uma das mais importantes vias de infecção para humanos por oocisto. Em Campos dos Goytacazes, norte do Rio de Janeiro, Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) realizaram o levantamento da prevalência e fatores de risco para a

infecção por *T. gondii* em humanos e concluíram que, na população testada, beber água não filtrada foi o fator de risco mais importante para o aumento da prevalência entre o grupo socioeconômico mais baixo.

No presente trabalho, não houve diferenças na porcentagem de gatos soropositivos entre machos e fêmeas, sugerindo que eles são igualmente suscetíveis à infecção por *T. gondii*. Este resultado corrobora com estudos anteriores (DEFEO et al., 2002; GARCIA et al., 1999; GAUSS et al., 2003; LANGONI et al., 2001; LUCAS et al., 1999; PENA, et al., 2006).

Em relação à faixa etária, os animais foram divididos em três grupos: filhotes, jovens e adultos. Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos, porém o número de animais considerados adultos foi muito inferior aos de animais considerados filhotes ou jovens, sendo um fator que pode ter interferido nesta análise. Sabe-se que animais errantes, geralmente apresentam baixa sobrevivência e, alguns autores descrevem que devido ao estresse causado pela vida feral, os gatos e cães sem dono vivem em média somente um ano (GATES, 2013; GENARO, 2010; MOLENTO et al., 2005). Há também o fato de que a captura de animais adultos é sempre mais difícil que a de jovens e filhotes, o que pode ter facilitado a captura de uma maior quantidade de animais mais jovens.

No presente estudo, o número de gatos domésticos positivos no diagnóstico molecular, baseado no gene B1 de *T. gondii* também foi baixo (8,1 %), se comparado aos resultados de sorologia (52,8 %). Este dado pode ser explicado pelo fato de não ter sido realizada a pesquisa em tecidos de eleição como cérebro, musculatura esquelética e cardíaca (DUBEY et al., 2012), uma vez que a grande maioria dos gatos não foram submetidos à eutanásia e que os tecidos utilizados foram da esterilização destes animais. Porém os resultados demonstraram que tecidos de órgãos do aparelho reprodutor de gatos (testículos e úteros) também podem abrigar *T. gondii*. Estes órgãos, apesar de não serem órgãos de eleição para o diagnóstico, podem ser mais facilmente obtidos. O sangue, também aqui utilizado para pesquisa do DNA do parasita, só apresenta grandes quantidades de *T. gondii* circulantes durante a fase aguda da doença (PENA et al., 2006), o que torna o uso desse também pouco indicado para o diagnóstico molecular. Mesmo assim, das 53 amostras testadas pelo método molecular através do sangue, duas foram positivas.

Amostras de água foram negativas para o teste molecular, porém não se deve descartar que estes corpos d'água estejam livres de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, uma vez que o número de amostras foi pequeno se comparado ao volume de água presente nos lagos.

Na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, tanto em ambientes urbanos como em ambientes silvestres, o carnivorismo é a principal via de transmissão do parasita para o felídeo (DUBEY et al., 2010). No ambiente silvestre os pequenos mamíferos são considerados itens básicos na dieta de diversas espécies de felídeos silvestres e eventualmente do gato doméstico (CANÓN-FRANCO et al., 2013).

Alguns estudos demonstram que a taxa de infecção por *T. gondii* nestes felídeos está relacionada com a relação presa-predador (AFONSO et al., 2007). É também sabido que em ambientes naturais, a relação presa-predador está relacionada com a disponibilidade de alimento para as espécies consideradas presas.

No Brasil os períodos de maior abundância de alimento estão relacionados com o período chuvoso, onde a disponibilidade de frutas e gramíneas é suficiente para manter grandes populações de espécies herbívoras, que por sua vez controlam a abundância dos predadores (ROCHA-MENDES et al., 2010). Nesta complexa cadeia alimentar é concluível que os parasitas tendem a aumentar as suas populações também neste período.

No período de realização deste estudo, os índices pluviométricos do estado do Rio Grande do Norte, foram considerados muito baixos. De outubro de 2012 a março de 2013, a precipitação variou de normal a baixo da média climatológica em praticamente toda a região do nordeste do país (INMET, 2013). Este período foi marcado por uma seca na região afetando toda a cidade de Natal. Segundo dados da Estação 82598 de Natal disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia, a precipitação de chuvas neste período para a cidade foi em média 100,0 mm, sendo um dos períodos mais secos dos dois últimos anos.

Diferente dos animais silvestres, os gatos domésticos destas duas UCs recebem alimentos diariamente por um grupo de moradores locais por todo ano, este alimento é constituído basicamente de restos alimentares, provenientes de restaurantes locais. Sabe-se que mesmo alimentados, os gatos domésticos mantem hábitos de caça e geralmente consomem a caça ou parte desta (GATES, 2013). Este fator pode reforçar o papel do gato na diminuição da fauna local e explicar que mesmo em períodos secos onde a fartura de caça é diminuída a população de gatos domésticos não é afetada, mantendo-se alta por todo o ano.

Outro fator agravante para o Parque da Cidade é a falta de predadores topo de cadeia, como os felinos silvestres, com isso a população de gatos domésticos tem a probabilidade de se proliferar sem competição interespecífica, diferentemente do Parque das Dunas onde a floresta é mais densa e capaz de abrigar diversas espécies de predadores, incluindo felinos de grande porte. Já é conhecido que os pequenos mamíferos registrados nas duas UCs fazem parte da dieta alimentar de felinos silvestres como *Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e

Puma concolor e que estes felinos, são descritos para a região litorânea do Rio Grande do Norte, local onde estão cituadas as UCs (PAGLIA et al., 2012). A presença de felinos silvestres geralmente está associada às áreas mais preservadas e estes animais são os primeiros a serem extintos quando existem grandes impactos ambientais (GATES, 2013; PAGLIA et al., 2012). Provavelmente estes felinos silvestres não ocorrem mais no Parque da Cidade, devido à pequena área e a alta antropização do local, mas podem estar ainda presentes no Parque das Dunas, mesmo que em populações reduzidas, podendo, inclusive estar controlando a populacional de gatos domésticos daquele parque. A não presença destes felinos no Parque na Cidade e a baixa presença no Parque nas Dunas reforçam a importante participação dos gatos na epidemiologia da toxoplasmose entre os animais dessas UCs, fazendo desta espécie a única capaz de agir como hospedeiro definitivo do *T. gondii* nesses ambientes.

Populações de mamíferos silvestres têm importante papel nos ecossistemas, nesta pesquisa foi possível estabelecer a circulação de *T. gondii* nas espécies presentes nos dois parques estudados, da cidade de Natal, e na população de gatos domésticos que habitam estas áreas demonstrando a participação de ambos os grupos de animais (silvestres e domésticos) no ciclo do *T. gondii* que abrange os ambientes silvestre, urbano e peri-urbano. Este trabalho também fornece informações da possível transmissão na interface entre homem, animais domésticos e animais silvestres com potenciais efeitos na saúde pública, uma vez que estas duas UCs são frequentadas por um grande número de pessoas por todo o ano e há, inclusive, comunidades que se instalaram no seu entorno, fazendo parte deste ambiente como os animais silvestres e domésticos que lá habitam.

Como não há dados anteriores de levantamento da fauna local antes da antropização da área em nenhuma das duas UCs, comparações da população ora encontrada com a anterior à introdução deste grande número de gatos, não podem ser feitas. Porém as observações deste estudo mostram evidências de uma região bastante afetada pela proximidade do homem e de seus animais domésticos e da interferência destes na sanidade dos animais silvestres.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- ✓ Anticorpos anti *T. gondii* estão presentes em animais silvestres e em gatos que habitam as duas UCs estudadas.
- ✓ A introdução e manutenção dos gatos domésticos no Parque da Cidade e a ausência de outras espécies de felinos no local, indica serem os gatos domésticos os grandes responsáveis pela ocorrência de infecção por *T. gondii* na fauna silvestre desta UC.
- ✓ Espécies de morcegos (*A. lituratus*, *G. soricina* e *C. perspicillata*) e de pequenos mamíferos não voadores (*D. albiventris*, *M. domestica* e *Calluromys* sp.), amplamente distribuídos na região, estavam infectados pelo *T. gondii*.
- ✓ A análise direta de tecidos de órgãos reprodutores de gatos, através da *nPCR* para o gene B1, permite a detecção de *T. gondii*, podendo ser útil quando há restrições de outros tecidos desses animais para tal finalidade.

REFERÊNCIAS*

- AFONSO, E.; POULLE, M. L.; LEMOINE, M.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; GILOT-FROMONT, E. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Small Mammals from the Ardennes Region, France. **Folia Parasitologica**, Branisovska, v. 54, p. 313–314, 2007.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDE, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v. 32, p. 27–38, 2002
- AJZENBERG, D.; SU, A. L. C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDE, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v. 34, p. 1185–1196, 2004.
- AKCA, A.; BABUR, C.; ARSLAN, M. O.; GICIK, Y.; KARA, M.; KILIC, S. Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Horses in the Province of Kars, Turkey. **Journal Veterinarni Medicina**, Galway, v. 49, n. 1, p. 9-13, 2004.
- ANGELUCCI, A. P.; CONTENTE, P. F.; DOMINGUES, R. C. S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Ostriches (*Struthio camelus*) From Commercial Breeding Facilities in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2009.
- ANTOLOVÁ, D.; REITEROVÁ, K.; DUBINSKÝ, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Boars (*Sus scrofa*) in the. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 14, p. 71-73, 2007.
- ASTRID, M.; TENTERA, A.; HECKEROTHA, R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From Animals to Humans. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- AZEVEDO, O. G. **Vulnerabilidades Socioambientais na Zona de Proteção Ambiental – 9, RN-Brasil**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Programa de Pós-Graduação em Geografia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Washington, v. 9, p. 55–62, 2003.
- BALKENHOL, N.; PARDINI, R.; BULLET, C.; FERNANDES, F.; SOMMER, S. Landscape -level comparison of genetic diversity and differentiation in a small mammal inhabiting different fragmented landscapes of the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Genetics**, New York, v. 4, n. 14, p. 249-251, 2013.
- BERNARD, E.; FENTON, B. Bat mobility in a fragmented landscape in Central Amazonia. **Biotropica**, Florida, v. 35, p. 262–277, 2003.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELTRAME, M. A. V.; PENA, H. F. J.; TON, N. C.; LINO, A. J. B.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PEREIRA, F. E. L. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 188, p. 225-230, 2012.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan – Americano de Febre Aftosa, 2008. 122 p.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human disease: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 438-442, 2002.

BRAGA FILHO, E. Diagnóstico Sorológico De *Toxoplasma Gondii* Através Do Teste Da Hemaglutinação Indireta Em Ovinos Criados Em Dois Municípios Do Nordeste Paraense. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Garça, v. 9, n. 17, p. 1-19, 2011.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, Cambridge, v. 27, p. 1787–1792, 1989.

BUTTY, E. T. Diagnostic Study of *Toxoplasma gondii* in Turkey (*Meleagris gallopavo*) in Some Regions in Ninevah Governorate, Iraq. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, Mosul, v. 23, p. 57-62, 2009.

CABEZÓN, O.; RESENDES, A. R.; DOMINGO, M.; RAGA, J. A.; AGUSTI, C.; ALEGRE, F.; MONS, J. L.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild Dolphins from the Spanish Mediterranean Coast. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 3, p. 643–644, 2004.

CABRAL, A. D.; GAMA, A. R.; SODRÉ, M. M.; SAVANI, E. S. M. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; JORDÃO, L. R.; MAEDA, M. M.; YAI, L. E. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 193, p. 100-104, 2013.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; DE ARAÚJO, F. A. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.50, p.55-67, 2013.

CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Severe acquired toxoplasmosis caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 15, n. 4, 2009.

CARVALHO, M. M. **Clima urbano e vegetação**: estudo analítico e prospectivo do Parque das Dunas em Natal. 2001. 278 f. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) - Programa de Pós-graduação em Arquitetura e Urbanismo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

CESTARO, L. A.; FERNANDES, E.; PEREIRA, V. H. C. Zoneamento de Áreas de Proteção Ambiental Urbanas. O exemplo da Zona de Proteção Ambiental 7 em Natal, RN. **Revista GeoNorte**, Manaus, v. 3, p. 1391-1404, 2012

CLIMENI, B. S. O; MONTEIRO, M. V. Toxoplasmose. ano VII. Periódicos Semestral, **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 1, n. 12, p. 1-8, 2009.

CONRAD, P. A.; MILLER, M. A.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MAZET, J.; DABRITZ, H.; JESSUP, D. A.; GULLAND, F.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v. 35, p. 1155–1168, 2005.

DĂRĂBUȘ, J.; AFRENIE, M.; OLARIU, R. T.; ILIE, M. S.; BALINT, A.; HOTEA, I. Epidemiological remarks on *Toxoplasma gondii* Infection in Timișoara Zoo. **Sciency Parasitology**, Timișoara, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2011.

DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M.; Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 78, p. 786–794, 1992.

DEFEO, M. L. ; DUBEY, J. P.; MATHER, T. N.; RHODES III, R. C.; Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 63, n. 12, p. 1714-1717, 2002.

DOBSON, A.; FOUFOPOULOS, J. Emerging infectious pathogens of wildlife. **Physiological Transaction of the Royal Society of London**, London, v. 356, p. 1001-1012, 2001.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, East Lansing, v. 17, n. 6, p. 1389-1405, 1987.

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

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1988. 220 p.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

Dubey, J. P. Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 32, p. 133–144, 1989.

DUBEY, J. P.; HAMIR, A. N.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C.E. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in raccoons. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 200, p. 534–536. 1992.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long term antibody responses of cat fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 6, p. 887-893, 1995.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, Milan, v.106, n.1 p. 121–153, 2002.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; BONND, D. W. V.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMANDI,

S.; THULLIEZ, P.. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*- like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 116, p. 275–296, 2003.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN; THULLIEZ, P. LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 143, p. 182–188, 2007.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; SINNETT, D.; MAJUMDAR, D.; SU, C. A. New atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from A wild black bear in Alaska. **Journal Parasitology**, Lawrence, v. 96, n. 4, p. 713–716, 2010.

ESBÉRARD, C. E. L.; NOGUEIRA, T. J.; LUZ, L. L.; MELO, G. G.; MANGOLIN, R.; JUCÁ, N.; RAÍCES, D. S. L.; ENRICI, M. C.; BERGALLO, H. B. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 8, p. 147-153. 2006.

ESTRADA, A.; COATES-ESTRADA, R. Bat species richness in live and in corridors of residual rain Forest vegetation at los Tuxtlas, Mexico. **Ecography**, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 94-102, 2001.

FENTON, M. B.; RAUTENBACH, I. L.; RYDELL, J.; ARITA, H. T.; ORTEGA, J.; BOUCAHRD, S.; HOVORKA, M. B.; LIM, B.; ODGREN, E.; PORTFORS, C.V.; SCULLY, W. M.; VONHOF, M. J. Emergence, echolocation, diet and foraging behavior of *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae). **Biotropica**, Florida, v. 30, n. 2, p. 314-320, 1998.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, California, v. 6, p. 22–31, 2006.

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

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; LOPEZ, E. H.; SENOFONTE, F. R. A.; SOUZA JUNIOR, V.G.; BOTELHO, C. A.; FIGUEIREDO, M. S.; DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 442-449, 2005.

FORMAN, D.; WEST, N.; FRANCIS, J.; GUY, E. The Sero-Prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 296-298, 2009.

FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C.; GUAZZELLI, A.; RIBEIRO M. G.; CHIACCHIO, S. B. *Toxoplasma gondii* infection in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 14, n. 164, p. 2-4, 2009.

FRANTI, C. E.; CONNALLY, G. E.; RIEMANN, H. P.; BEHYMER, D. E.; RUPPANNER, R.; WILLADSEN, C. M. AND LONGHURST, W. A survey for *Toxoplasma gondii* antibodies in deer and other wildlife on a sheep range. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 167, p. 565-568, 1975.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R.; ALMEIDA, E. S. C.; TEIXEIRA, W. L. Sensibilidade comparativa do gerbil (*Meriones unguiculatus*) e do camundongo (*Mus musculus*) inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) da cepa VEG. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 65-69, 2002.

FREIRE, M. S. B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas de Natal. **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 2, n. 1, p. 41-59, 1990.

GALVANI, A. P. Epidemiology meets evolutionary ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 18, n.3, p.132-139, 2003.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GATES, S. Domestic cats kill billions of mice and birds per year, study estimates. **The Huffington Post**, Chicago, 2013. Disponível em: <<http://www.huffingtonpost.com/sara-gates/>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

GAUSS, C. B. L.; ALMERÍA, S.; ORTUÑO, A.; GARCÍA, F.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, p. 1067-1068, 2003.

GENARO, G. Gato doméstico: futuro desafio para controle da raiva em áreas urbanas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p.186-189, 2010.

GENBANK **Statistics**. Bethesda: National Center Biotechnology Information, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats-2008/>>. Acesso em: 20 Jul. 2013.

GENNARI, S. M.; FRANCO, W. A. C.; SOUZA, S. L. P.; YAI, L. E. O.; SANTOS, L. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 121, p. 337-340, 2004.

GHELER-COSTA C.; VETORAZZ, C. A.; PARDINI, R.; VERDADE, L. M. The distribution and abundance of small mammals in agroecosystems of southeastern Brazil. **Mammalia**, Paris, v.76, p.185-191, 2012.

GONDIM, L. F. P.; LASKI, P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Variation of the Internal Transcribed Spacer 1 Sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90; n. 1, p. 119-122. 2004.

GONDIM, L. S.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M.; GONDIM, L. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 168, n. 1-2, p. 121-124, 2010.

GUIMARÃES, F. N. Toxoplasmose humana, Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém-nascido. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 257-320, 1943.

HEJLICEK, K.; PROSEK, F.; TREML, F. Isolation of *Toxoplasma gondii* in free-living small mammals and birds. **Acta Veterinaria Brasilica**, Feira de Santana, v. 1, n. 1, p. 233-236. 1981.

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

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. P. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.6, p.1411–1414, 1997

HUMPHREYS, J. G.; STEWART, R.L.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of hunter-killed white-tailed deer in Pennsylvania. **American Journal of Veterinary Research**, Overland, v.56, p.172–173, 1995.

IDEMA. Parque Estadual Dunas de Natal Jornalista Luiz Maia. Núcleo de Gestão de Unidades de Conservação. **Governo do Estado do Rio Grande do Norte**, 2011. Disponível em: <<http://www.idema.rn.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2011.

INMET. Banco de dados 2012 e 2013 da Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática, Natal-RN. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2013. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

KARATEPE, M.; BABÜR, C.; KARATEPE, B.; KILIÇ, S.; ÇAKIR, M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in anatolian ground squirrels, *Spermophilus xanthophrymnus* (rodentia: sciuridae) from Nigde, Turkey. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 155, n. 11, p. 530-532, 2004.

KAUFMANN, H.; YAMAGE, M.; RODITI, I.; DOBBELAERE, D.; DUBEY, J. P.; HOLMDAHL, O. J.; TREES, A.; GOTTSTEIN, B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 289-297, 1996.

KHAN A, , DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal of Parasitology**, Cairns, v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011.

KLAREN, V. N.; KIJLSTRA, A. Toxoplasmosis, an overview with emphasis on ocular involvement. **Ocular Immunology and Inflammation**, Tübingen, v. 10, p. 1–26, 2002.

- LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P.; CUTOLO, A. A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 243-244, 2001.
- LEHMANN, T. BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, S. F. DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 4, p. 107-114, 2004.
- LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; LAUNER, F.; CORN, J. L.; GAMBLE, H. R.; DUBEY, J. P. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, p. 135-141, 2003.
- LEITE, A. S.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Serological survey of Toxoplasmosis in birds from Cracidae Family in a Wild Bird Center Facility at Pernambuco State, Northeast of Brazil. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 55-57. 2007.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BUTLER, J. M.; BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 73, p. 27-33, 1997.
- LINDSAY, D. S.; WESTON, J. L.; LITTLE, S. E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 97, n. 2, p. 159-164, 2001.
- LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; LOUREIRO, V. S.; IKESAKI, J. Y. H.; BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatients cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 221-224, 1999.
- MATTOS, B. C.; PATRÍCIO, L. L. F.; PLUGGE, N. F.; LANGE, R. R.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Goiânia, v. 17, n. 1, p. 267-272, 2008.
- MELLO, M. A. R.; F. A. S. FERNANDEZ. Reproductive cycle of the bat *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a fragment of the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Zietschrift Säugetierkunde**, Berlin, v. 65, p. 340-349, 2000.
- MENESES, A. M. C.; NEGRÃO, K. A.; MIRANDA, C. F.; BASTOS, R. K. G.; SOUZA, N. F.; KUDORA, R. B. S.; MORAES, C. C. G.; BENIGNO, R. N. G. Ensaio Imunoenzimático Indireto para Detecção de Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em Gatos na Cidade de Belém do Pará, Brasil. **Revista de Ciências. Agrárias**, Manaus, v. 1, n. 52, p. 99-105, 2009.
- MERCIER, A.; AJZENBERG, D.; DEVILLARD, S.; DEMAR, M. P.; DE THOISY, B.; BONNABAU, H.; COLLINET, F.; BOUKHARI, R.; BLANCHET, D.; SIMON, S.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. **Infection Genetics and Evolution**, Irvine, v. 11, n. 6, p. 1378-1387, 2011.
- MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; MAIA, B. H. L. N. S.; TEIXEIRA, S. D. Attraction of the fruiteating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**, Florida, v. 29, n. 10, p. 2379-2383, 2003.

- MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRETO-JÚNIOR, R.; NEVES, K. A. L.; PENA, H. F. J.; ORTOLANI, L. E.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 41, n. 3, p. 572-574, 2010.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREUX, J. e FONSECA, G. A. B. Hotspots revisited. Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. **Centro de Excelência em Medicina do Exercício**, Brasília, 2005. 392 p.
- MOLENTO, C. F. M.; INOE, A. P.; REGO, M. I. C.; LAGO, E.; MEZA, S. K. L.; LEME, M. C.; MOLENTO, M. B. Controle populacional de cães e gatos em dez Vilas Rurais do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2005.
- MORRISON, D. W. Foraging and day-roosting dynamics of canopy fruit bats in Panama. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 61, p. 20-29, 1980.
- MORRISON, D. W. Foraging ecology and energetics of the frugivorous bat *Artibeus jamaicensis*. **Ecology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 716-723, 1978.
- MÜLLER, P. The dispersal centers of terrestrial vertebrates in the neotropical realm. W. Junk B.V. Publishers: **Biogeographica**, The Hague, n. 2, 1973. 244 p.
- NETO, V. A.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 154 p.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J. R.; DEERFIELD, D. W. I. I. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Emblnew News**, Santos, v. 4, p. 14, 1997.
- NOGUEIRA, J. A. **Principais Moléstias de Origem Parasitaria Encontradas em Lobo-guará**. 35 f. Monografia - Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos. CMCasem, 2009.
- OGRZEWALSKA, M; UEZU, A; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Journal Parasitology Research**, New York, v. 108 n. 3, p. 665-670, 2011.
- PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A.; RYLANDS, B. R.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, Y. P.; SILICIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Annotated checklist of Brazilian mammals. 2. ed. **Conservation International**, Occasional paper, Arlington, 2012. n. 6, 82 p.
- PENA, H. F. J.; SOARES, R.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, Grã-Bretanha, v. 81, p. 58-67, 2006.
- PENA, H. F. J.; VITALIANO, S. N.; BELTRAMEB, M. A. V.; PEREIRA F. E. L.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. 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**, Milan, v. 192, p. 111– 117, 2013.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v.38, p.561–569, 2008.

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; NETO, J. E. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 12; p. 1009-1014, 2009.

PRANCE, G. T. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: Prance GT (ed) Biological diversification in the tropics. **Columbia University Press**, New York, p 137–158, 1982. 714p.

PRELEZOV, P.; KOINARSKI, V.; GEORGIEVA, D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in the Stara Zagora Region. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2008.

RAMALHO, A. M. Z.; PIMENTA, H. C. D. Valoração econômica do dano ambiental ocasionado pela extração ilegal da orquídea *Cattleya granulosa* no Parque Natural Dom Nivaldo Monte, Natal/RN. **Holos**, Natal, v. 1, n. 26, p.62-82, 2010.

RIBEIRO, M. C.; MARTENSEN, A. C.; METZGER, J. P.; SCARANO, M. T. F.; FORTIN, M. J. The Brazilian Atlantic Forest: A shrinking biodiversity hotspot. F.E. Zachos and J.C. Habel, **Biodiversity Hotspots**, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2011. 500 p.

ROCHA-MENDES, ROCHA-MENDES, F.; MIKICH, S. B.; QUADROS, J.; PEDRO, W.A. Feeding ecology of carnivores (Mammalia: Carnivora) in Atlantic Forest remnants, Southern Brazil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 21-30, 2010.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Columbus, v. 29, p. 1150-1160, 1980

SALAS, V.; ERNESTO, P.; GALINDEZ-SILVA, C.; GOLS-RIPOLL, A.; HERRERA, E. A. Methods for capturing and marking wild capybaras in Venezuela. **Wildlife Society Bulletin**, Bethesda, v. 32, n.1, p. 202-208, 2004.

SALGADO, A. C.; SALES, L. C.; ANDRADE, D. A. P.; RODRIGUES, L. A. Percepção dos funcionários residentes no Parque Estadual Alberto Löfgren sobre o conceito de posse responsável. **IF Série Registros**, Botucatu, v. 1. n. 31, p. 107-111, 2007.

SCHATZBERG, S. J.; HALEY, N. J.; BARR, S. C.; LAHUNTA, A.; OLBY, N.; MUNANA, K.; SHARP, N. J. H. Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, n. 12, p. 1507-1513, 2003.

SEMURB. **Situação dos gatos de rua em natal**, Diário de Natal - RN. Prefeitura Municipal de Natal – RN, Brasil 2012. Disponível em: <www.pmnatal.gov.br>. Acesso em: 20 set. 2012.

SEMURB. **Zoneamento Ambiental de Natal**. Prefeitura Municipal de Natal – RN, Brasil. 2008. Disponível em: <www.pmnatal.gov.br>. Acesso em: 20 set. 2011.

SHAAPAN, R. M.; FATHIA KHALIL, A. M. F. Evaluation of different *Toxoplasma gondii* isolates as antigens used in the Modified Agglutination Test for the detection of toxoplasmosis in camels and donkeys. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Deira, v. 3, n. 6, p. 837-841, 2008.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, London, v. 359, n. 1, p. 82-85, 1992.

SILVA, A. F.; SILVA, R. C.; ZAMPROGNA, T. O.; LUCAS, T. M. *Toxoplasma gondii* em Suínos com ênfase na contribuição brasileira. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 120-130, 2010.

SILVA, A.V.; BOSCO, S. M.; LANGODI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 135, p. 81-83, 2006.

SILVA, B. F.; SADOVSKY, A. D. I.; BARCELOS, A. O.; PAULA, B. Uma revisão sistemática sobre as formas de Infecção pelo *Toxoplasma gondii*. **Natureza on line**, Santa Tereza, v. 5, n. 2, p. 63-67, 2007.

SILVA, J. C. R.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E. O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 2, p. 419-420, 2002.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Captive Neotropical Felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 102, p. 217-224, 2001.

SILVA, M. S.; UZEDA, R. S.; COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; MACEDO, A. C.; ABESANDES, K.; GONDIM, L. F. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 162, p. 156-159, 2009.

SINGH, S. Mother-to-child Transmission and Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v. 21, n. 2, p. 69-76, 2003.

SIQUEIRA, D. B.; ALÉSSIO, F. M.; MAUFFREY, J. F.; MARVULO, M. F.; RIBEIRO, V. O.; OLIVEIRA, R. L.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; MOTA, R. A.; FAUSTINO, M. A.; ALVES L. C.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild marsupials and rodents from the Atlantic Forest of Pernambuco State, Northeastern Region, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 1, p. 12-15, 2013.

SOARES, H. S.; ALVES, N. D.; PEREIRA, R. H. M. A.; MATOS, S. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; FEIJÓ, F. M. C.; PEIXOTO, G. C. X. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 2, p. 489-491, 2010.

SOGORB, F.; JAMRA L. F.; GUIMARÃES, E. C. DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 14, p. 314-320, 1972.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, Z.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X. K.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Boston, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2011.

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**, Cairns, v. 36, p. 841-848, 2010.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**. New York, v. 299, p. 414-16, 2003.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 364-369, 2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. **International Journal Parasitology**, Cairns, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TERRA, M. A. B.; BELLO, A. R.; BASTOS, O. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; COELHO, J. M. C. O.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 185-188, 2004.

TESHALE, S.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M. L.; MERGA, B.; DORCHIES, P. Serological survey of caprine toxoplasmosis in Ethiopia: Prevalence and Risk factors. **Parasite**, Paris, v. 14, p. 155-159, 2007.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

UFRN. **Diagnóstico Ambiental da Zona de Proteção Ambiental 1 – ZPA 1**. Natal. 2007. Disponível em: <www.pmrn.gov.br>. Acesso em: 22 set. 2011.

VITALIANO, S. N. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

VITALIANO, S. N.; MINEO, T. W. P.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z.; MINEO, J. R.; WERTHER, K. Experimental infection of Crested Caracara (*Caracara plancus*) with *Toxoplasma gondii* simulating natural conditions. **Veterinary parasitology**, Milan, v. 172, p. 71-75, 2010.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, San Francisco, v. 7, p. 299-316, 1993.

YAI, L. E. O.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E. L.; CAMARGO, M. C. G. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal de Parasitology**, Lawrence, v. 89, p. 870-871, 2003.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Milan, v. 162, p. 332-337. 2009.

ZORTÉA, M.; MELO, F. R.; CARVALHO, J. C.; ROCHA, Z. D. Morcegos da Bacia do rio Corumbá, Goiás. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 611-617, 2010.

APÊNDICE A - Amostras de animais silvestres capturados nas duas UCs em outubro de 2012 (campanha 1) e fevereiro de 2013 (campanha 2), Natal-RN.

Continua

Cod	Local	Ca	Espécie	Hábito			Sexo	Idade	BE	MAT	B1							
				A	SA	NA					co	ce	li	pu	ba	fi	ri	sa
2S	PC	1	<i>E. sexcinctus</i>			X	F	Ad	-	50	-	-	-	-	-	-	-	N
7S	PC	1	<i>S. lilium</i>	X			F	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Jo	-	25	-	-	-	-	-	-	-	N
9S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	50	-	-	-	-	-	-	-	N
10S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Ad	-	50	-	-	-	-	-	-	-	N
11S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	100	-	-	-	-	-	-	-	N
16S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			F	Ad	N	25	P	N	N	N	N	N	N	N
17S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			M	Ad	N	50	P	N	N	N	N	N	N	N
18S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
19S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
20S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			M	Ad	N	50	N	N	N	N	N	N	N	N
21S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Jo	-	25	-	-	-	-	-	-	-	N
22S	PC	1	<i>L. degener</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
23S	PC	1	<i>L. degener</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24S	PC	1	<i>A. lituratus</i>	X			F	Ad	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N
25S	PC	1	<i>M. domestica</i>			X	M	Ad	N	50	N	P	N	N	N	N	N	N
26S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	50	N	N	N	N	N	N	N	N
27S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	50	N	N	N	N	N	N	N	N
28S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	N	3200	N	P	N	N	P	N	P	N
31S	PC	1	<i>M. domestica</i>			X	M	Jo	N	50	N	N	N	N	N	N	N	N
32S	PC	1	<i>M. domestica</i>			X	M	Ad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
33S	PC	1	<i>C. perspicillata</i>	X			M	Jo	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
34S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	50	-	-	-	-	-	-	-	N
35S	PC	1	<i>N. lasiurus</i>			X	F	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
36S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Jo	-	100	-	-	-	-	-	-	-	N
37S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Jo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
38S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Jo	-	N	-	-	-	-	-	-	-	N
39S	PD	1	<i>C. perspicillata</i>	X			F	Ad	N	25	N	N	N	N	N	N	N	N
40S	PD	1	<i>G. soricina</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
41S	PD	1	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
42S	PD	1	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	25	P	P	P	N	N	N	N	N

43S	PD	1	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	25	N	N	N	N	N	N	N	N
44S	PD	1	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
45S	PD	1	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	200	N	N	N	N	N	N	N	N
46S	PD	1	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	P	P	N	P	P	P	P	N
47S	PC	1	<i>M. domestica</i>			X	M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
48S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	25	P	P	N	N	N	N	N	N
49S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Jo	-	25	-	-	-	-	-	-	-	N
50S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Ad	-	25	-	-	-	-	-	-	-	N
51S	PD	1	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52S	PD	1	<i>G. soricina</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53S	PD	1	<i>M. nigricans</i>	X			F	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
54S	PD	1	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
55S	PD	1	<i>C. maximilian</i>	X			M	Ad	N	200	N	N	N	N	N	N	N	N
56S	PD	1	<i>U. bilobatum</i>	X			F	Ad	N	100	N	N	N	N	N	N	N	N
57S	PD	1	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
58S	PD	1	<i>C. agricolai</i>	X			F	Ad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
59S	PD	1	<i>C. jacchus</i>	X			M	Fi	-	N	-	-	-	-	-	-	-	N
60S	PD	1	<i>C. jacchus</i>	X			F	Ad	-	N	-	-	-	-	-	-	-	N
61S	PD	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	25	-	-	-	-	-	-	-	N
62S	PD	1	<i>Calluromys sp.</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
63S	PD	1	<i>C. jacchus</i>	X			M	Fi	-	-	N	N	N	N	N	N	N	N
64S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
66S	PC	1	<i>D. albiventris</i>		X		F	Fi	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N
67S	PC	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
68S	PD	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	N	25	N	N	N	N	P	N	N	N
69S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
71S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
72S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
73S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	P	N	P	P	P	N	N
74S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
75S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
76S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			F	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
78S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			F	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
79S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Conclusão																	
80S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
81S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N
82S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
83S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
84S	PC	2	<i>E. sexcinctus</i>			X	M	Ad	-	N	-	-	-	-	-	-	N
85S	PC	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	N	-	-	-	-	-	-	N
86S	PC	2	<i>L. vetulus</i>			X	M	Fi	-	100	-	-	-	-	-	-	N
88S	PC	2	<i>R. rattus</i>			X	F	Ad	N	100	N	N	N	N	N	N	N
89S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			F	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N
91S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N
92S	PC	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	100	-	-	-	-	-	-	N
93S	PC	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
94S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	25	N	N	N	N	N	N	N
95S	PD	2	<i>U. bilobatum</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
96S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
97S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	N	N	N	P	N	N
98S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	P	N	N	N	N	N	N
99S	PD	2	<i>A. lituratus</i>	X			M	Ad	N	N	N	P	N	N	N	N	N
100S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N
101S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	100	N	N	N	N	N	N	N
102S	PD	2	<i>M. nigricans</i>	X			M	Ad	N	-	N	N	N	N	N	N	N
103S	PD	2	<i>T. apereoides</i>			X	M	Jo	N	100	N	N	N	N	N	N	N
104S	PD	2	<i>D. albiventris</i>		X		F	Fi	N	-	N	N	N	N	N	N	N
105S	PC	2	<i>N. lasiurus</i>			X	M	Ad	N	N	N	N	N	N	N	N	N
106S	PD	2	<i>D. albiventris</i>		X		M	Ad	-	100	-	-	-	-	-	-	N

Nota: Ca = Campanha; A = arborícola; SA = Semi arborícola; NA = Não arborícola; M = macho e F = fêmea; Ad = adulto; Jo = jovem e Fi = filhote; BE = Bioensaio; N = negativo ; P = positivo; co = coração; ce = cérebro; li = língua; pu = pulmão; ba = baço; fi = fígado; ri = rim; sa = sangue; - = exame não realizado.

APÊNDICE B – Dados das amostras provenientes de gatos do parque das Dunas e Parque da Cidade em Fevereiro de 2013 (campanha 2).

Continua

Cod	Local	Sexo	Idade	Prenhes	BE	MAT	B1							
							co	ce	li	CI	Ut	Te	Sa	Fe
G107	PC	F	Fi	-	N	-	N	P	N	N	N	-	-	-
G108	PC	M	Fi	-	N	-	N	N	N	N	-	N	N	-
G1	PC	M	Jo	-	N	100	-	-	-	-	-	N	N	-
G123	PD	F	Ad	N	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
G10	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G10282	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G11	PC	F	Jo	N	N	200	-	-	-	-	N	-	N	-
G113	PC	F	Ad	P	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G110	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	P	-
G12	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G12282	PC	F	Ad	N	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
G1272	PC	F	Ad	N	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G13	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G13282	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G14	PC	F	Jo	N	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
G15	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G15282	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G16	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G17	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G18	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G19	PC	M	Ad	-	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G2	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G223	PD	F	Ad	N	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
G20	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G21	PC	F	Jo	N	N	50	-	-	-	-	N	-	N	-
G213	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	P	N	-
G2272	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G23	PC	M	Ad	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G24	PC	M	Ad	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G25	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G26	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-

G27	PC	F	Ad	N	N	N	-	-	-	-	N	-	P	-
G28	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G29	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G313	PC	M	Ad	-	N	-	-	-	-	-	-	N	-	-
G323	PC	M	Ad	-	N	-	-	-	-	-	-	N	-	-
G30	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G31	PC	F	Jo	N	N	100	-	-	-	-	N	-	N	-
G32	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G33	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G34	PC	M	Jo	-	N	25	-	-	-	-	-	N	N	-
G35	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G3272	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G4	PC	F	Jo	N	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
G4272	PC	F	Jo	N	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G413	PC	F	Jo	N	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G5272	PC	F	Jo	N	N	25	-	-	-	-	N	-	N	-
G513	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G5	PC	F	Jo	N	N	50	-	-	-	-	N	-	N	-
G613	PC	F	Jo	N	N	100	-	-	-	-	N	-	N	-
G6182	PC	M	Jo	-	N	N	-	-	-	-	-	N	N	-
G6	PC	F	Jo	N	N	100	-	-	-	-	-	-	N	-
G6272	PC	F	Jo	N	N	100	-	-	-	-	-	-	N	-
69	PC	F	Ad	P	P	12800	P	P	N	N	P	-	N	P
G9	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G813	PC	M	Ad	-	N	100	-	-	-	-	-	N	N	-
G9181	PC	F	Jo	N	N	400	-	-	-	-	N	-	N	-
G9182	PC	F	Jo	N	N	400	-	-	-	-	N	-	N	-
G8	PC	F	Jo	N	N	N	-	-	-	-	N	-	N	-
G8131	PD	F	Ad	N	N	50	-	-	-	-	N	-	N	-
G01	PD	F	Ad	N	N	50	-	-	-	-	N	-	N	N

Nota: Fi = filhote; Jo = jovem; Ad = adulto; BE = Bioensaio; N = negativo ; P = positivo; co = coração; ce = cérebro; li = língua; CI = conteúdo intestinal; Ut= útero; Te = testículo; Fe = feto; Sa = sangue; - = exame não realizado.

ANEXO A – Licença Consedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para captura e coleta de pequenos mamíferos terrestres, São Paulo, 2013.

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: 32104-2	Data da Emissão: 21/02/2013 13:24	Data para Revalidação*: 23/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: gislene fatima da silva rocha	CPF: 051.934.766-86
Título do Projeto: Pesquisa de Toxoplasmose e Avaliação comparativa dos Fatores de Risco e Soroprevalência em duas Unidades de Conservação na Cidade de Natal ? RN / Brasil	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	primeira campanha - captura e coleta de animais	03/2012	04/2012
2	Segunda campanha - captura e coleta de animais e sangue	06/2012	07/2012
3	Terceira campanha - captura e coleta de animais e sangue	09/2012	10/2012
4	quarta campanha - captura e coleta de animais e sangue	11/2012	12/2012
5	quinta campanha - captura e coleta de animais e sangue	03/2013	04/2013
6	sexta campanha - captura e coleta de animais e sangue	06/2013	07/2013
7	setima campanha - captura e coleta de animais e sangue	09/2013	10/2013
8	oitava coleta - captura e coleta de animais e sangue	11/2013	12/2013
9	retirada das armadilhas (pitfall e sherman)	03/2014	04/2014

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 IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, 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.

Outras ressalvas

1	As armadilhas utilizadas para captura de mamíferos deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido à hipotermia ou hipertermia. Não está autorizada a coleta/transporte de espécimes presente na lista brasileira da fauna ameaçada de extinção.
---	--

Equipe

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

Código de autenticação: 77388153

Página 1/4

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: 32104-2	Data da Emissão: 21/02/2013 13:24	Data para Revalidação*: 23/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: gislene fatima da silva rocha	CPF: 051.934.766-86
Título do Projeto: Pesquisa de Toxoplasmose e Avaliação comparativa dos Fatores de Risco e Soroprevalência em duas Unidades de Conservação na Cidade de Natal ? RN / Brasil	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fernanda Aparecida Nieri Bastos	Veterinária	257.872.638-80	276921288 SSP-SP	Brasileira
2	Danilo Gonçalves Saraiva	Colaborador	071.489.966-60	11837320 ssp-MG	Brasileira
3	Arllei Marçili	Coordenador	282.937.948-95	225872729 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RN	Parque Estadual das Dunas de Natal	Fora de UC Federal
2		RN	Parque da Cidade Dom Nivaldo Montes	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Didelphimorphia, Thryonomyidae, Erethizontidae, Muridae, Chiroptera, Echimyidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Thryonomyidae, Chiroptera, Didelphimorphia, Echimyidae, Erethizontidae, Muridae
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera, Thryonomyidae, Muridae, Erethizontidae, Echimyidae, Didelphimorphia
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Echimyidae (*Qtde: 20), Thryonomyidae (*Qtde: 3), Erethizontidae (*Qtde: 3), Chiroptera (*Qtde: 3), Didelphimorphia (*Qtde: 3), Muridae (*Qtde: 3)
5	Marcação de animais silvestres in situ	Didelphimorphia, Chiroptera, Echimyidae, Erethizontidae, Muridae, Thryonomyidae

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)osso/pele
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Outros métodos de captura/coleta(armadilha de interceptação e queda - pitfall), Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco, Anel

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	coleção

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

Código de autenticação: 77388153

Página 2/4

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: 32104-2	Data da Emissão: 21/02/2013 13:24	Data para Revalidação*: 23/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: gislene fatima da silva rocha	CPF: 051.934.766-86
Título do Projeto: Pesquisa de Toxoplasmose e Avaliação comparativa dos Fatores de Risco e Soroprevalência em duas Unidades de Conservação na Cidade de Natal ? RN / Brasil	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 77388153

Página 3/4

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: 32104-2	Data da Emissão: 21/02/2013 13:24	Data para Revalidação*: 23/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: gislene fatima da silva rocha	CPF: 051.934.766-86
Título do Projeto: Pesquisa de Toxoplasmose e Avaliação comparativa dos Fatores de Risco e Soroprevalência em duas Unidades de Conservação na Cidade de Natal ? RN / Brasil	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 77388153

Página 4/4