

**NATALIA LÓPEZ OROZCO**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PARASITOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM  
AMOSTRAS TECIDUAIS DE ROEDORES SILVESTRES (*Cavia* spp., *Ctenomys*  
spp., *Myocastor coypus*) DEPOSITADAS EM MUSEUS DO RIO GRANDE DO  
SUL**

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

**NATALIA LÓPEZ OROZCO**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PARASITOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM  
AMOSTRAS TECIDUAIS DE ROEDORES SILVESTRES (*Cavia* spp., *Ctenomys*  
spp., *Myocastor coypus*) DEPOSITADAS EM MUSEUS DO RIO GRANDE DO  
SUL**

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

Orozco, Natalia López.

Detecção molecular de parasitos da família Sarcocystidae em amostras teciduais de roedores silvêtres (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) depositadas em museus do Rio Grande do Sul / Natalia López Orozco. -- 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: Coccídios de animais silvestres.

Versão do título para o inglês: Molecular detection of Sarcocystidae family in tissues samples of wild rodents (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) deposited in museums of Rio Grande do Sul.

1. Coccídios 2. Epidemiologia 3. Rodentia 4. Sarcocystidae  
5. Sequenciamento genético 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/SBIB067/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Natalia López Orozco.

Título da Dissertação: Detecção molecular de parasitos da família Sarcocystidae em amostras teciduais de roedores silvêtres (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) depositadas em museus do Rio Grande do Sul.

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

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

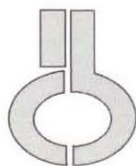
**Aprovado(a)**

**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) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 457/11 referente ao projeto intitulado: “*Detecção molecular de parasitos da família Sarcocytidae em amostras teciduais de roedores silvestres (Cavia aperea, Ctenomys spp., Myocastor coypus) depositadas em museus do Rio Grande do Sul*” sob a responsabilidade de **Natalia Lopez Orozco**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 29 de agosto de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*A Deus,  
por ter dado a mim fortaleza e saúde para alcançar meus objetivos, sua infinita bondade e amor.*

*A William,  
esposo, amigo, companheiro e colega, por toda a compreensão, carinho, apoio e, pela perseverança e  
constância que o caracterizam e que tem infundado em mim sempre.*

*Te amo "Chiqui".*

*A minha família, pelo incentivo, paciência e amor.*

*A minha mãe Blanca, pelo exemplo, apoio e dedicação em todo momento, por seus conselhos, seus  
valores, pela motivação constante que tem permitido que eu seja uma pessoa do bem e, sobre tudo, por  
seu amor.*

*A meus irmãos e sobrinhos, pelo carinho e apoio, ainda na distância.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Profa. Dra. Solange Maria Gennari pela confiança, ensinamentos e paciência, pela amizade e oportunidade de ser mais uma filha.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares e a Profa. Dra. Lara Keid Borges, pela amizade, oportunidade de parceria e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas Aline D. Cabral e Arlei Marcili, sou imensamente grata pela colaboração e ajuda para concluir este trabalho.

Aos curadores, responsáveis e pesquisadores dos museus por ceder o material utilizado, Carla e Amilton da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Márcia e Fabiana da Fundação Zoobotânica; Alexandre e Eduardo da Universidade Luterana do Brasil e Thales e Patricia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela parceria e colaboração neste trabalho.

A família Gennari, Ana, Clarice, Dante, Livia e Flavia, sem esquecer o Mozart, pelo amor, carinho e amizade e por, entre tantas outras coisas, que nos acolheram a mim e o William e fizeram sentir parte da família.

A todos os amigos que eu fiz ao longo deste tempo no Brasil, que acompanharam de perto, dando sempre o apoio necessário nas alegrias e tristezas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2010/14310-3).

## RESUMO

LÓPEZ-OROZCO, N. **Detecção molecular de parasitos da família Sarcocystidae em amostras teciduais de roedores silvestres (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) depositadas em museus do Rio Grande do Sul.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Poucos estudos quantificam o risco relativo da saúde humana baseados nas pesquisas feitas em populações de animais silvestres, o que é crucial na compreensão da história natural das doenças zoonóticas. Coccídios, em particular os da família Sarcocystidae, são importantes agentes transmissíveis na interface homens-animais domésticos e silvestres. No entanto, o diagnóstico destes agentes em relação aos animais silvestres é dificultado pela pouca disponibilidade de amostras, sem agredir a população natural de espécies em risco de extinção. Neste estudo objetivou-se avaliar, pela amplificação do espaçador interno transcrito ITS-1, a frequência de coccídios da família Sarcocystidae em amostras teciduais de três espécies de roedores silvestres; *Cavia* spp., *Ctenomys* spp. e *Myocastor coypus*, depositados nas coleções de museus de Ciências Naturais do estado do Rio Grande do Sul – Brasil e avaliado o papel epidemiológico destes roedores no ciclo silvestre dos parasitas assim como seu possível impacto na saúde pública. Dos 75 roedores amostrados, nove foram positivos para coccídios da subfamília Toxoplasmatinae. DNA de *Toxoplasma gondii* foi caracterizado em três das 386 amostras de tecidos primários, na musculatura esquelética de *M. coypus* (#36) e de *Cavia* spp. (#57) e no cérebro desta última espécie de roedor (#49). Adicionalmente, *Hammondia triffittae* foi obtida no diafragma de *Myocastor coypus* (#36). Seis roedores foram positivos para a subfamília Sarcocystidae, sendo duas amostras confirmadas pelo sequenciamento parcial em músculo esquelético do ITS-1 como *Sarcocystis felis*-like em *Ctenomys* spp. (#5) e *Sarcocystis* spp. em *M. coypus* (#13). A detecção molecular de *T. gondii*, *H. triffittae*, *Sarcocystis* spp. e *S. felis*-like em roedores silvestres brasileiros de vida livre, evidencia a participação desses roedores no ciclo silvestre dos coccídios em estudo e a potencial transmissão ao homem e outros animais, domésticos e silvestres. O uso de amostras de tecidos de animais silvestres depositados em coleções biológicas para estudos epidemiológicos de doenças transmissíveis demonstra ser de grande utilidade.

**Palavras-chave:** Coccídios. Epidemiologia. Rodentia. Sarcocystidae. Sequenciamento genético.



## ABSTRACT

LÓPEZ-OROZCO, N. **Molecular detection of Sarcocystidae family in tissues samples of wild rodents (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *Myocastor coypus*) deposited in museums of Rio Grande do Sul.** 2013. 82 p. Masters thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Few studies quantify the relative risk of human health based on research done in populations of wild animals, which is crucial in understanding the natural history of zoonotic diseases. Coccidia, particularly family Sarcocystidae, are important agents transmitted at the interface human-domestic and wild animals. This study aimed to evaluate, by amplification of the internal transcribed spacer ITS-1, the frequency of Sarcocystidae in tissue samples from three species of wild rodents; *Cavia* spp., *Ctenomys* spp. *Myocastor coypus* deposited in the collections of museums of Natural Sciences of Rio Grande do Sul - Brazil and evaluated the epidemiological role of these rodents in sylvatic cycle of the parasite as well as their potential impact on public health. Of the 75 rodents sampled, nine were positive for coccidia subfamily Toxoplasmatinae. *Toxoplasma gondii* DNA was characterized in three of the 386 samples of primary tissues, the skeletal muscles of *M. coypus* (# 36) and *Cavia* spp. (# 57) and brain of the latter kind of rodent (# 49). In addition, *Hammondia triffittae* was obtained in the diaphragm of *M. coypus* (# 36). Six rodents were positive for the subfamily Sarcocystidae, two samples confirmed by partial sequencing of the ITS-1 in skeletal muscle as *Sarcocystis felis*-like in *Ctenomys* spp. (# 5) and *Sarcocystis* spp. in *M. coypus* (# 13). Molecular detection of *T. gondii*, *H. triffittae*, *Sarcocystis* spp. and *S. felis*-like in Brazilian wild free life rodents, show the role of these rodents in sylvatic cycle of coccidia in study and its potential transmission to humans and other animals, domestic and wild. The use of tissue samples from wild animals deposited in biological collections proves to be very useful for epidemiological studies of diseases.

**Keywords:** Coccidia. Epidemiology. Rodentia. Sarcocystidae. Genetic sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 -  | Ilustração do roedor cavia ou préa ( <i>Cavia aperea</i> ).....   | 35 |
| Figura 2 -  | Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Cavia</i> spp. presentes no Brasil.....  | 36 |
| Figura 3 -  | Ilustração de uma das espécies do roedor tuco tuco ( <i>Ctenomys minutus</i> ).....   | 37 |
| Figura 4 -  | Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Ctenomys</i> presentes no Brasil.....  | 38 |
| Figura 5 -  | Ilustração do roedor ratão do banhado ( <i>Myocastor coypus</i> ).....  | 39 |
| Figura 6 -  | Mapa de distribuição da espécie <i>Myocastor coypus</i> no Brasil.....  | 40 |
| Figura 7 -  | Mapa de distribuição geográfica das amostras (indicadas por números e cores) coletadas de roedores silvestres (n=75) no estado do Rio Grande do Sul.....  | 44 |
| Figura 8 -  | Proporção de amostras teciduais coletadas em diferentes espécies de roedores silvestres depositados nas coleções biológicas de museus do Rio Grande do Sul.....   | 46 |
| Figura 9 -  | <i>Nested-PCR</i> da região ITS-1 em gel de agarose 2%, a partir de amostras primárias de musculatura esquelética de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.....  | 51 |
| Figura 10 - | Mapa de distribuição geográfica das amostras positivas para coccídios da subfamílias Toxoplasmatinae e Sarcocystinae em roedores silvestres do Rio Grande do Sul, segundo a análise das sequências do locus ITS-1.....  | 53 |
| Figura 11 - | Árvore de distâncias das sequências de nucleotídeos da região ITS-1 da subfamília Sarcocystinae das amostras de roedores silvestres (#5Me e #13Me) e de referência, inferida pelo método <i>neighbor-joining</i> com teste bootstrap de 1000 réplicas. Árvore não enraizada gerada com auxílio do programa MEGA. A: disposição retangular e B: disposição radial..... | 55 |

## LISTA DE QUADROS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Quadro 1 – | Espécies de <i>Sarcocystis</i> registradas em roedores das Américas.....  | 22 |
| Quadro 2 – | Isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> em roedores domésticos e silvestres no mundo.....  | 27 |
| Quadro 3 – | Informações referentes à quantidade e espécies de roedores silvestres amostrados no Rio Grande do Sul....   | 43 |
| Quadro 4 - | Características dos 75 roedores silvestres amostrados das coleções biológicas dos museus do Rio Grande do Sul.....  | 45 |
| Quadro 5 - | <i>Nested-PCR</i> para coccídios da família Sarcocystidae em tecidos de roedores contendo DNA dos parasitas e identificação das espécies pelo sequenciamento..... | 53 |
| Quadro 6 - | Identificação molecular das sequências de DNA obtidas de tecidos positivos pela <i>n-PCR-ITS-1</i> de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.....               | 54 |

## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1 – | Dados de detecção de DNA de coccídios da família Sarcocystidae pela amplificação de ITS-1 em roedores silvestres do Rio Grande do Sul (n=75) por sexo, espécie, procedência e período de depósito nas coleções..... | 50 |
| Tabela 2 - | Frequência de roedores silvestres positivos a coccídios das famílias Toxoplasmatinae e Sarcocystinae pela <i>n</i> -PCR-ITS-1.....  | 51 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| °C                | graus celsius   |
| µL                | microlitro (s)  |
| dNTP              | deoxinucleotideos 5'-trifosfato   |
| DNA               | Desoxiribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)  |
| EDTA              | ácido etilenodiaminotetracético   |
| et al.            | et alli (e outros); e colaboradores   |
| HCl               | ácido clorídrico  |
| HD                | hospedeiro definitivo   |
| HI                | hospedeiro intermediário  |
| IBAMA             | Instituto Brasileiro do Medio Ambiente e dos Recursos Renováveis.   |
| ITS               | Internal Transcribed Spacer   |
| IUCN              | International Union for Conservation of Nature and Natural Resources  |
| KCl               | cloreto de potássio   |
| mm                | Milímetros  |
| m <sup>2</sup>    | metros quadrados  |
| M                 | Molar   |
| MAT               | Modified Agglutination Test (teste de aglutinação modificado)   |
| MgCl <sub>2</sub> | cloreto de magnésio   |
| mM                | Milimolar   |
| NaCl              | cloreto de sódio  |
| NAT               | Neospora Agglutination Test   |
| n                 | Número  |
| nPCR              | <i>nested</i> -PCR  |
| pb                | pares de bases  |
| PCR               | Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)  |
| pH                | potencial hidrogênico   |
| pM                | Picomol   |
| rDNA              | DNA ribossomal  |
| RFLP              | Restriction Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de DNA gerados por Enzima de Restrição) |
| RIFI              | Reação de Imunoflorescencia Indireta  |
| RNA               | ácido ribonucleico  |
| s                 | Segundos  |
| SDS               | dodecilsulfato de sódio   |
| SP                | estado de São Paulo   |
| <i>Taq</i>        | <i>Termophilus aquaticus</i>  |
| TBE               | tampão Tris-borato-EDTA   |
| TE                | tampão Tris-EDTA  |
| Tris              | Hidroximetilaminometano   |
| U                 | unidade internacional   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|     |                  |
|-----|------------------|
| <   | Menor            |
| ≥   | maior ou igua a  |
| >   | Maior            |
| %   | Porcentagem      |
| #   | Número           |
| ®   | Marca registrada |
| v/v | volume/volume    |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 16 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 18 |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 19 |
| <b>3.1 Subfamília Sarcocystinae</b> .....   | 20 |
| 3.1.1 <i>Sarcocystis</i> spp. ....  | 20 |
| <b>3.2 Subfamília Toxoplasmatinae</b> .....   | 23 |
| 3.2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....  | 23 |
| 3.2.2 <i>Neospora</i> spp. ....   | 29 |
| 3.2.3 <i>Hammondia</i> spp. ....  | 30 |
| 3.2.4 <i>Cystoisospora</i> spp. ....  | 32 |
| 3.2.5 <i>Besnoitia</i> spp. ....  | 33 |
| <b>3.3 Rodentia</b> .....   | 33 |
| 3.3.1 Roedores das famílias <i>Caviidae</i> , <i>Ctenomyidae</i> e <i>Myocastoridae</i> ..... | 34 |
| 3.3.1.1 <i>Cavia</i> spp. ....  | 34 |
| 3.3.1.2 <i>Ctenomys</i> spp. ....   | 37 |
| 3.3.1.3 <i>Myocastor coypus</i> .....   | 39 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 43 |
| <b>4.1 Amostras analisadas</b> .....  | 43 |
| <b>4.2 Análise molecular</b> .....  | 46 |
| 4.2.1 Extração de DNA .....   | 46 |
| 4.2.2 PCR e n-PCR da região ITS-1 .....   | 47 |
| 4.2.3 Sequenciamento de ácidos nucleicos .....  | 47 |
| 4.2.4 Análise das sequências .....  | 48 |
| <b>4.3 Análise estatística</b> .....  | 48 |

|  |    |
|--|----|
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | 49 |
| <b>5.1 Detecção de DNA pela amplificação do locus ITS-1</b> .....  | 49 |
| <b>5.2 Sequenciamento de produtos amplificados pela n-PCR-ITS-1</b> .....  | 52 |
| <b>5.3 Análise das sequências obtidas</b> .....  | 54 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....   | 56 |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....  | 61 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 62 |
| <b>APÊNDICE A</b> - Informações das amostras de tecidos coletadas em espécimes de roedores silvestres depositados nas coleções biológicas de museus do Rio Grande do Sul.....  | 77 |
| <b>APÊNDICE B</b> – Informações das amostras positivas na <i>n</i> -PCR-ITS-1 para as subfamílias Sarcocystinae, Toxoplasmatinae e outros coccídios detectados em tecidos de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.....   | 79 |
| <b>APÊNDICE C</b> - Número de amostras teciduais examinadas ( <b>E</b> ), positivas ( <b>P</b> ) e porcentagem de positivas (%) para as subfamílias Toxoplasmatinae, Sarcocystidae e outros coccídios distribuídas por gênero de roedores silvestres do Rio Grande do Sul..... | 80 |
| <b>ANEXO A</b> - Alinhamento de sequências ITS-1 para <i>Toxoplasma gondii</i> produzidas neste estudo e de referência.....  | 81 |
| <b>ANEXO B</b> - Alinhamento de sequências ITS-1 para <i>Hammondia triffittae</i> produzidas neste estudo e de referência.....   | 82 |



## 1 INTRODUÇÃO

Parasitas coccídios do filo Apicomplexa possuem uma estrutura exclusiva chamada de complexo apical que facilita a aderência e invasão às células do hospedeiro. Reune ao redor de 5000 espécies, a maioria das quais infectam um amplo número de espécies animais, desde moluscos até mamíferos (CAVALIER-SMITH, 1993). Destaca-se entre estas espécies as da família Sarcocystidae, causadoras de doenças de importância médica e veterinária que ocorrem no mundo inteiro, como *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, que atinge um terço da população humana mundial; *Neospora caninum*, relacionado com afecções neurológicas em caninos e reprodutivas em bovinos; *Sarcocystis* spp., com repercussões zoonóticas importantes nos humanos; *Hammondia* spp, vinculado a infecções gastrintestinais nos animais de companhia, assim como *Cystoisospora* spp, que afeta mamíferos domésticos e silvestres podendo levar a quadros diarréicos, em especial nos animais jovens e *Besnoitia* spp., com potencial clínico ainda desconhecido (FRENKEL; SMITH, 2003; WASMUTH et al., 2009).

Doenças emergentes vêm surgindo cada vez mais na interfase entre o homem, os animais domésticos e de produção e a fauna silvestre, disseminando agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes (KRÜGER, 2006). Entretanto, pouca atenção tem sido dada ao papel destas doenças na biologia da conservação. Assim, a compreensão da biodiversidade parasitária na vida silvestre para estabelecer o papel desses animais como reservatórios de infecções parasitárias e o papel dos parasitas nos ecossistemas são fundamentais no estudo de agentes infecciosos no mundo todo.

Roedores das espécies *Myocastor coypus*, *Cavia* spp. e *Ctenomys* spp. encontram-se distribuídos no sul do Brasil. O *Myocastor* é uma espécie de roedor aquático de origem sul-americana muito bem adaptado a condições ambientais e aos diferentes biomas de diferentes regiões e, considerado como praga em algumas regiões da Europa onde foi introduzido no início do século XX. Em algumas regiões é aproveitado como iguaria, incrementando o risco da transmissão de doenças para o homem. Com uma distribuição maior no continente sul-americano, a *Cavia* possui hábitos terrestres e desempenha um importante papel nos ecossistemas, constituindo-se numa das espécies mais consumidas pelos carnívoros silvestres; desta forma estaria envolvida no ciclo silvestre de vários protozoários que tem a via

presa-predador como forma de transmissão. Menos conhecido, o roedor fossorial e subterrâneo *Ctenomys* é endêmico da América do Sul, onde a grande parte dos estudos feitos até hoje enfocam os aspectos filogenéticos dessa espécie deixando descartado o estado sanitário dos indivíduos dessa espécie.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Detectar e identificar os coccídios da família Sarcocystidae em amostras teciduais de roedores silvestres obtidas no Rio Grande do Sul, pela análise molecular das sequências de nucleotídeos e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) amplificadas por PCR.
- ✓ Avaliar o papel epidemiológico dos protozoários caracterizados, no ciclo silvestre dos parasitas, o possível impacto em outras populações de animais silvestres e as implicações na saúde pública.
- ✓ Ponderar a utilidade de espécimes depositados nas coleções científicas como materiais propícios para estudos de agentes infecciosos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O diagnóstico diferencial pelos métodos tradicionais resulta em discussões científicas que até hoje ainda não foram capazes de fornecer subsídios adequados para distinguir mais de 200 espécies de protozoários que conformam a família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988; ELLIS et al., 1994; FRANZEN et al., 2000; TENTER; JOHNSON, 1997).

Fundamentado em informações fenotípicas, filogenéticas, estruturais, ciclo de vida e de especificidade de hospedeiro, é proposta a seguinte classificação taxonômica, mais recente, porém não consensual (GHIMIRE, 2010; MODRÝ; VOTÝPKA; SVOBODOVÁ, 2004; MORRISON et al., 2004; TENTER et al., 2002):

#### Família Sarcocystidae

##### Subfamília Sarcocystinae

**Gênero**     ***Sarcocystis***

##### Subfamília Toxoplasmatinae

**Gênero**     ***Toxoplasma***

*T. gondii.*

##### ***Besnoitia***

*B. akodoni, B. bennetti, B. besnoiti, B. caprae, B. darlingi, B. jellisoni, B. neotomofelis, B. oryctofelisi, B. tarandi e B. wallacei.*

##### ***Hammondia***

*H. hammondi, H. heydorni, H. truffittae.*

##### ***Neospora***

*N. caninum, N. hughesi.*

##### Subfamília Cystoisosporinae

##### ***Cystoisospora***

*C. felis, C. rivolta, C. ohioensis, C. canis.*

Os coccídios possuem ciclo sexual e assexual, resultando na produção de um estágio ambiental resistente, chamado de oocisto. Hospedeiros que eliminam nas fezes os oocistos, produzidos por multiplicação sexuada, são denominados de hospedeiros definitivos (HD) e aqueles nos quais o ciclo assexual ocorre, com a

formação de cistos, são denominados de hospedeiros intermediários (HI). No gênero *Sarcocystis*, cada um dos ciclos ocorre em diferentes hospedeiros (heteroxeno), enquanto que no *Cystoisospora* os ciclos acontecem no mesmo hospedeiro (monoxeno). No caso de *T. gondii*, ambos os ciclos ocorrem nos felídeos, pelo que é denominado de hospedeiro completo e, o ciclo assexual acontece também em hospedeiros não felinos (heteróxico facultativo).

A infecção causada pelos protozoários Sarcocystidae apresenta notáveis diferenças biológicas, derivadas da composição antigênica, ciclo biológico e manifestações clínicas dos diferentes gêneros. Em termos gerais, a infecção por *N. caninum* nos canídeos (HD) é relacionada com paralisia de membros posteriores, já nos bovinos (HI) causa abortamento. A relevância clínica da *Hammondia* spp. ainda é desconhecida, contrário ao *T. gondii* no qual a infecção apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo potencialmente assintomática na maioria dos hospedeiros imunocompetentes e com gravíssimas lesões nos imunossuprimidos, nas fêmeas gestantes de algumas espécies pode ocorrer o aborto e malformações fetais. *Sarcocystis* spp. atinge um amplo número de HI, nos quais os sinais clínicos associam-se a doença debilitante que pode causar morte. Salienta-se também que *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. são importantes agentes zoonóticos, o que até hoje não tem sido bem documentado para os gêneros *Neospora* e *Hammondia* (DUBEY et al., 2002a).

### **3.1 Subfamília Sarcocystinae**

#### **3.3.1 *Sarcocystis* spp.**

Cerca de 220 espécies de *Sarcocystis* já foram descritas até hoje, em diversas espécies de HI (mamíferos, aves, répteis), aumentando a chance de sobrevivência no ciclo biológico. A especificidade é maior para o HD, não obstante muitos destes sejam ainda desconhecidos (DOLEŽEL et al., 1999; PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012; PRAKAS et al., 2011).

Em geral *Sarcocystis* spp. possui ciclo diheteroxeno, exceto algumas espécies como *S. muris* e *S. rodentifelis* que apresentam ciclo dihomoxeno (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012), dependente da concorrência dos hospedeiros no

ambiente e de uma transmissão ligada às relações presa-predador ou a comportamentos de carnivorismo (FRENKEL; SMITH, 2003).

Com características únicas no ciclo, a reprodução assexuada ocorre nas células endoteliais do intestino delgado dos HI (omnívoro ou herbívoro), são liberados esporozoítos que por endopoligenia originam uma ou várias gerações de merozoítos. Os merozoítos livres da célula invadem fibras musculares e, por endodiogenia, são formados os “sarcocistos”, contendo no seu interior bradizoítos, que permanecem infectantes por vários meses ou anos. Terminada a fase assexuada, os sarcocistos podem ser encontrados em diferentes órgãos do HI como músculo esquelético, coração, língua, esôfago e diafragma (GILLIS et al., 2003; PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012).

Hospedeiros intermediários (presas) apresentando tecidos infectados com sarcocistos são ingeridos por animais carnívoros (HD) e após a ingestão, os bradizoítos são liberados, invadindo as células epiteliais do intestino, dando início à gametogênese. Originam-se oocistos de parede fina, contendo quatro esporozoítos, eliminados nas fezes e que esporulam em sete a 14 dias, tornando-se infectantes no ambiente (CHRISTIE; PAPPAS; DUBEY, 1978; LINDSAY et al., 1999).

Segundo a revisão feita por Tenter (1995) e Odening (1998) em torno de 16 espécies de *Sarcocystis* já foram descritas em pelo menos 11 gêneros de roedores nas Américas (Quadro 1).

**Quadro 1-** Espécies de *Sarcocystis* registradas em roedores das Américas.

| <b>Agente etiológico</b> | <b>Hospedeiro intermediário</b>  | <b>Hospedeiro definitivo</b> | <b>Distribuição</b> |
|--------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------|
| <i>S. azevedoi</i>       | <i>Oryzomys capito</i>           | Desconhecido                 | América do Sul      |
| <i>S. caviae</i>         | <i>Cavia porcellus</i>           | Desconhecido                 | América do Sul      |
| <i>S. crotali</i>        | <i>Mus musculus</i>              | Serpentes                    | América do Norte    |
| <i>S. cymruensis</i>     | <i>Bandicota indica</i>          | Felinos                      | Cosmopolita         |
|                          | <i>Rattus norvegicus</i>         |                              | Cosmopolita         |
|                          | <i>Rattus rattus</i>             |                              | Cosmopolita         |
| <i>S. espinosai</i>      | <i>Peromyscus maniculatus</i>    | Aves                         | América do Norte    |
| <i>S. microti</i>        | <i>Microtus pennsylvanicus</i>   | Desconhecido                 | América do Norte    |
|                          | <i>Microtus longicaudus</i>      |                              | América do Norte    |
| <i>S. montanaensis</i>   | <i>Microtus ochrogaster</i>      | Serpentes                    | América do Norte    |
|                          | <i>Microtus pennsylvanicus</i>   |                              | América do Norte    |
|                          | <i>Microtus longicaudus</i>      |                              | América do Norte    |
| <i>S. muris</i>          | <i>Mus musculus</i>              | Felinos                      | Cosmopolita         |
| <i>S. neotomafelis</i>   | <i>Neotoma micropus</i>          | Felinos                      | México              |
| <i>S. neurona</i>        | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Gambá                        | América do Sul      |
| <i>S. oryzomyos</i>      | <i>Oryzomys capito</i>           | Desconhecido                 | América do Sul      |
| <i>S. peromysci</i>      | <i>Peromyscus maniculatus</i>    | Desconhecido                 | América do Norte    |
| <i>S. rauschorum</i>     | <i>Dicrostonyx richardsoni</i>   | Aves                         | América do Norte    |
| <i>S. roudabushi</i>     | <i>Peromyscus maniculatus</i>    | Serpentes                    | América do Norte    |
| <i>S. rodentifelis</i>   | <i>Rattus norvegicus</i>         | Felinos                      | Cosmopolita         |
| <i>S. sigmodontis</i>    | <i>Sigmodon hispidus</i>         | Desconhecido                 | América do Norte    |

Fonte: Modificado de Odening (1998) e atualizado de Morrison et al. (2004).

## 3.2 Subfamília Toxoplasmatinae

### 3.2.1 *Toxoplasma gondii*

Com distribuição cosmopolita, *T. gondii* é um dos parasitas com maior prevalência na população humana no mundo todo, infectando um grande número de espécies, desde animais de sangue quente até mexilhões e ostras que agem como transportadores de oocistos. Os felídeos, domésticos e silvestres, são hospedeiros definitivos de *T. gondii*, sendo qualquer mamífero e as aves os hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010).

A principal forma de infecção dos felídeos é pela ingestão de cistos tissulares, seguida da liberação dos bradizoítos que penetram as células epiteliais do intestino delgado. A formação de oocistos ocorre em aproximadamente três a dez dias, após endopoligenia e gametogonia (DUBEY, 1998). No entanto hospedeiros definitivos e intermediários também se infectam ao ingerir água e alimentos contaminados com oocistos esporulados. Como no hospedeiro intermediário, paralela ou independentemente do ciclo intestinal, tecidos ou órgãos podem ser invadidos por esporozoítos, com a formação de taquizoítos e bradizoítos (DUBEY, 2010).

No ambiente, os oocistos resistem às condições ambientais extremas por curtos períodos de tempo, mas em condições ideais a viabilidade pode chegar aos 18 meses (DUBEY, 1986). Chuva e vento dispersam os oocistos infectantes para fontes hídricas ou lavouras, com potencial infecção para os hospedeiros susceptíveis (DUBEY, 2010).

Nos HI a infecção pode ser adquirida de duas formas. Na primeira por ingestão de oocistos esporulados; esporozoítos livres invadem a parede intestinal, logo taquizoítos disseminam-se via hematogena e invadem as células. No ciclo extra-intestinal taquizoítos formam cistos teciduais. No interior destes, os bradizoítos multiplicam-se lentamente por endodiogenia. A distribuição dos cistos é aleatória, localizando-se principalmente no músculo esquelético e cardíaco e, em menor grau, no pulmão, fígado e rins. (DUBEY et al., 1988). A segunda forma de infecção é a ingestão de bradizoítos contidos em cistos teciduais e, neste caso, o ciclo é semelhante à ingestão de oocistos (DUBEY, 1998).

No caso dos humanos, pode acontecer a transmissão por várias vias: vertical (da mãe para o feto), pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos ou



pela ingestão de vegetais mal lavados e água contaminada com oocistos (GILOT-FROMONT et al., 2012).

A maioria dos estudos sobre o papel dos roedores na epidemiologia da toxoplasmose envolvem espécies sinantrópicas, em particular de regiões rurais ou próximas a áreas agrárias e de produção, objetivando a avaliação do possível papel desses animais como fonte de infecção para animais carnívoros e omnívoros, uma vez que ratos e camundongos podem facilmente se infectar com oocistos deste parasita (BOBIĆ et al., 2012).

O gênero *Rattus* têm sido um dos mais estudados, a soroprevalência de *T. gondii* neste e em outros gêneros de roedores são referenciados por Dubey (2010) em revisão sobre o tema. Estudos mais recentes, na Tailândia (JITTAPALAPONG et al., 2011), no Iran (MOSALLANEJAD et al., 2012) e no Brasil (COSTA et al., 2012) observaram ocorrência de anticorpos séricos em 50,4%, 24,2% e 38,2%, respectivamente, reforçando a importância epidemiológica dos roedores infectados como potencial via de transmissão do parasita.

Observação interessante é o fato de roedores positivos a anticorpos anti-*T. gondii* apresentarem dificuldade de isolamento do parasita (DUBEY et al., 1997). O tamanho da amostra provavelmente não esteja relacionada à facilidade de isolamento, uma vez que pesquisas com grande número de indivíduos e elevada prevalência não conseguiram o isolamento (AFONSO et al., 2007), em outros estudos, com um pequeno número amostral e baixa prevalência, o isolamento foi obtido (DUBEY, 2010; TEUTSCH et al., 1979).

O bioensaio em camundongos, mesmo sendo uma técnica que exige o uso de animais e um tempo relativamente longo para o isolamento, é o método de referência para o diagnóstico da infecção toxoplásmica. A amplificação biológica do parasita pelo bioensaio e as técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), facilitam a detecção do agente em tecidos como cérebro e coração (PENA et al., 2008).

No Reino Unido, 40,8% (86/206) das amostras de cérebro coletadas do roedor *Apodemus sylvaticus* foram positivas pela PCR do SAG1 de *T. gondii* (THOMASSOM et al., 2011). Positividade similar foi registrada por Yingguang et al. (2012), na China, na detecção molecular do gene B1 em amostras de pulmão do também roedor *Microtus fortis*, com positividade de 50% (137/272). Na Alemanha foram analisados pelo Western blot e PCR da ssu-rDNA, exsudatos e tecidos obtidos

de pulmão e coração coletados de 72 roedores das espécies *Microtus arvalis* (69), *Neomys anomalus* (2) e *Apodemus agrarius* (1), entretanto nenhuma amostra foi positiva para *Toxoplasma* (HERRMANN et al., 2012).

No Brasil, a soropositividade em 64 capivaras de seis municípios de São Paulo foi determinada por diferentes técnicas sorológicas com valores de 75,0% no teste sorológico de aglutinação direta modificadada (MAT) e 76,6% pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), adicionalmente foram obtidos 36 isolados de *T. gondii* pelo bioensaio em camundongos (YAI et al., 2008). Na mesma espécie, Truppel et al. (2010a), no Paraná, relataram soroprevalência de 61,5% (16/26) pela RIFI, resultados positivos na PCR do gene B1 foram obtidos de um indivíduo em tecido de fígado e, em três pela amplificação da região ITS-1 (Espaçador Interno Transcrito 1) de amostras do coração (1) e do fígado (2). Num outro estudo, nas espécies *R. rattus* e *M. musculus*, no Paraná, a soropositividade em 182 indivíduos foi de 5,0% pela RIFI (>25) e, pelo MAT (>50) registrou-se 9,3% e 2,8% em cada espécie, respectivamente.

Também pela amplificação do gene B1 foi detectado DNA de *T. gondii* em coração de *M. musculus* (1/2) e em cérebro e coração de *R. rattus* (2/112) e de *R. norvegicus* (2/7) de roedores obtidos da região urbana da cidade de São Paulo (MURADIAN et al., 2012). Estes resultados foram confirmados pela n-PCR do ITS-1 em *M. musculus* (1/1) e *R. norvegicus* (1/2). Nesta última espécie, pelo bioensaio, foi possível o isolamento do genótipo recombinante I-III-u-1 de *T. gondii* (TgRtBr1), previamente descrito em ovelhas por Ragozo et al. (2008) e em gato doméstico por Pena et al. (2008), ambas do estado de São Paulo.

No que diz respeito às espécies objeto do presente estudo, até hoje nenhum registro de *T. gondii* foi obtido em *Cavia* spp. (preá) e em *Ctenomys* spp. (tuco-tuco). No caso do *Myocastor coypus* (ratão do banhado) o primeiro registro de infecção por *T. gondii* foi feito por Holmes, Illman e Beverley (1977) na Inglaterra, com o encontro de anticorpos séricos em indivíduos desta espécie.

Estudos sobre a virulência são insuficientes para explicar as diferenças existentes entre isolados. A análise de isolados pela Reação em Cadeia pela Polimerase–Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) gerados por enzimas de restrição e de microssatélites indicam uma estrutura populacional clonal do parasita nos isolados oriundos da Europa e Estados Unidos (HOWE; SIBLEY, 1995). A tipificação feita pela PCR-RFLP do gene SAG2 subdividiu

*T. gondii* em três linhagens clonais, designadas como Tipo I, II e III, associando os tipos I e II com toxoplasmose clínica em humanos, enquanto os tipos II e III em sua maioria com isolados de animais (DARDÉ, 2004; HOWE; SIBLEY, 1995; SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

Posteriormente estudos com isolados da Guiana Francesa e do Brasil demonstraram uma variabilidade genética maior do que a previamente relatada (AJZENBERG et al., 2004; DUBEY et al., 2007; KHAN et al., 2005; LEHMANN et al., 2004, 2006; SU; ZHANG; DUBEY, 2006). No Brasil, uma alta diversidade genética foi revelada ao utilizar os marcadores moleculares SAG1, SAG2 (5'3'SAG2), atl. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Dos 125 isolados de gatos, cães e galinhas obtidos de vários estados brasileiros foram tipificados 48 genótipos diferentes, estando grande parte deles incluídos dentro de quatro linhagens clonais BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008). Diferentes graus de virulência em camundongos foram observados nas linhagens descritas: o tipo BrI como altamente virulento, BrIII não virulento e os BrII e BrIV de virulência intermediária.

Alguns isolados de *T. gondii* em roedores domésticos e silvestres no mundo tem sido obtidos, ressaltando a importância destes animais como HI do parasita (DUBEY, 2010). O quadro 2 sumariza os estudos feitos até a presente data.

**Quadro 2-** Isolados de *Toxoplasma gondii* em roedores domésticos e silvestres no mundo.

(continua)

| Espécie                              | Positivos/<br>Examinados | Tipo de<br>amostra           | Detecção   | Genotipagem<br>(número de<br>amostras) | Nome do<br>isolado | País              | Autor                      |
|--------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|--|--------------------|-------------------|----------------------------|
| <i>Hydrochoerus<br/>hydrochaeris</i> | 64/36                    | Cérebro<br>Língua<br>Coração | Bioensaio<br>SAG1, SAG2, SAG3,<br>BTUB, GRA6, c22-8,<br>c29-2, L358, PK1,<br>Apico e CS3 |  | TgCpBr1-<br>36     | Brasil            | Yai et al. (2008,<br>2009) |
| <i>Mus musculus</i>                  | 1/6                      | Cérebro<br>Pulmão            | Bioensaio  | NA                                     | NA                 | Brasil            | Sogorb et al.<br>(1972)    |
|                                      | 7/1502                   | Cérebro<br>Coração           | Bioensaio  | NA                                     | NA                 | Estados<br>Unidos | Dubey et al. (1995)        |
|                                      | 4/127                    | Cérebro<br>Coração           | Bioensaio  | NA                                     | NA                 | México            | Dubey et al. (2009)        |
|                                      | 1/19                     | Cérebro<br>Coração           | Bioensaio<br>SAG1, SAG2, SAG3,<br>BTUB, GRA6, c22-8,<br>c29-2, L358, PK1,<br>Apico e CS3 | Recombinante I, u-1,<br>III (1)        | NA                 | Brasil            | Araújo et al. (2010)       |
| <i>Peromyscus<br/>spp.</i>           | 2/67                     | Cérebro<br>Coração           | Bioensaio  | NA                                     | NA                 | Estados<br>Unidos | Dubey et al. (1995)        |

(conclusão)

|                          |       |                    |  |                            |          |                              |                            |
|--------------------------|-------|--------------------|--|----------------------------|----------|------------------------------|----------------------------|
| <i>Rattus norvegicus</i> | 1/107 | Cérebro<br>Coração | Bioensaio  | NA                         | NA       | Estados Unidos               | Dubey et al. (1995)        |
|                          | 1/23  | Cérebro<br>Coração | Bioensaio  | NA                         | NA       | Panamá                       | Frenkel et al. (1995)      |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 1/238 | Cérebro<br>Coração | Bioensaio<br>SAG1, SAG2, SAG3,<br>BTUB, GRA6   | Genotipo III               | NA       | Granada<br>Índias Ocidentais | Dubey et al. (2006)        |
|                          | 1/20  | Cérebro            | Bioensaio  | Recombinante I, II-u-1 (1) | TgRatBr1 | Brasil                       | Muradian et al. (2012)     |
| <i>Rattus spp.</i>       | 2/249 | Cérebro<br>Coração | Bioensaio  | NA                         | NA       | México                       | Dubey et al. (2009)        |
| <i>Rattus rattus</i>     | 1/24  | Cérebro<br>Coração | Bioensaio<br>SAG1, SAG2, SAG3,<br>BTUB, GRA6, c22-8,<br>c29-2, L358, PK1,<br>Apico e CS3 | Recombinante I, II (1)     | NA       | Brasil                       | Araújo et al. (2010)       |
| Espécie não identificada | 2/112 | Cérebro            | GRA6   | Recombinante III           | NA       | Grécia                       | Messaritakis et al. (2008) |

Abreviaturas: NA: não aplica.

Fonte: Modificado de Dubey (2010).

### 3.2.2 *Neospora* spp.

Rosypal e Lindsay (2005), nos Estados Unidos, e Gondim (2006), no Brasil, já alertavam da existência do ciclo silvestre do *N. caninum*. Os autores referem à possibilidade da participação de canídeos silvestres (HD) e outros mamíferos (HI) no ciclo do parasita. O ciclo biológico possui três estágios de infecção: taquizoítos, bradizoítos e oocistos, sendo os dois primeiros intracelulares no HI. Os oocistos são eliminados nas fezes do HD e posteriormente ocorre a esporulação no ambiente (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

Outra espécie foi descrita em equinos, denominada *N. hughesi*, inicialmente confundida com *N. caninum* e associada com um quadro de mieloencefalite nessa espécie. Morfologicamente *N. caninum* e *N. hughesi* são espécies similares, mas com diferenças antigênicas e genéticas. O locus ITS-1 é considerado um bom marcador molecular para a diferenciação entre *N. caninum* e outros coccídios Sarcocystinae estreitamente relacionados, como *N. hughesi* (MARSH et al., 1998) e *Hammondia heydorni* (ŠLAPETA et al., 2002).

Dubey e Schares (2011), numa revisão sobre a neosporose, detalharam as pesquisas feitas no mundo todo, tanto em animais domésticos quanto em animais silvestres de vida livre ou em cativeiro, confirmando o papel dos roedores como potencial reservatório da infecção.

A primeira descrição da exposição de roedores a *N. caninum* em condições naturais foi feita na China por Huang et al. (2004) em *R. norvegicus*. Foram examinados 55 roedores para a presença de anticorpos, com positividade de 16,4% e a detecção de *N. caninum* pela PCR foi obtida em duas ratas soropositivas.

Na Inglaterra, em roedores capturados em fazendas de criação de ovinos, DNA de *N. caninum* foi detectado em tecido cerebral de *M. musculus* (3/100) e de *R. norvegicus* (2/45) (HUGHES et al., 2006). Com roedores de Granada, Caribe, e dos Estados Unidos, Jenkins et al. (2007) registraram uma baixa frequência de anticorpos séricos em *R. norvegicus* (4,6%; 240) e *M. musculus* (5,0%; 105), analisada pelo teste sorológico NAT (Neospora Agglutination Test).

Baixa frequência molecular também foi encontrada em amostras de cérebro de *Microtus arvalis* (4/264) e *Arvicola terrestris* (2/86), roedores amostrados na Austria (FUEHRER; BLÖSCHL; SIEHS, 2010). Na Itália, infecção pelo *N. caninum* foi confirmada nas espécies *R. norvegicus* (13,6%) e *M. musculus* (13,8%), que

também foi observada em *Arvicola sylvaticus* (3,6%), com detecção do agente pela PCR em rim, cérebro e músculo esquelético. A presença deste coccídio na massa muscular incrementa a chance de transmissão do parasitismo, visto que o ciclo de vida dos protozoários da família Sarcocystidae é estreitamente relacionado com a relação presa–predador (FERROGLIO et al., 2007). No entanto a presença de cistos de *Neospora* pode ter uma distribuição maior em tecidos como cérebro, medula espinhal e fígado, como revelam os resultados obtidos em *M. musculus* (30%), *S. variegatus* (30%) e *R. norvegicus* (18%) capturados em fazendas de produção leiteira no México (MEDINA-ESPARZA et al., 2013).

No Brasil, Muradian et al. (2012) não observaram ocorrência de *N. caninum* em amostras teciduais de 121 roedores urbanos (*M. musculus*, *R. rattus*, *R. norvegicus*) através das técnicas hnPCR-Nc5 e nPCR-ITS-1. No entanto, Yai et al. (2008) verificaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), pela RIFI, com títulos de anticorpos em 20 (9,4%) dos 213 soros de animais provenientes de 11 localidades do estado de São Paulo. Truppel et al. (2010b), no estado do Pará, (11,6%), pela amplificação molecular da região Nc5 do *N. caninum* encontraram três capivaras positivas (19,2%) e, pela região ITS-1 cinco (23%). Os dois estudos sugerem que a capivara possa ter um papel importante no ciclo de vida selvático desse apicomplexa na América do Sul.

### 3.2.3 *Hammondia* spp.

Os primeiros coccídios relatados em cães e gatos pertencem ao gênero *Hammondia*. Inicialmente descritos como *Coccidium bigemina* e posteriormente como *Isospora bigemina* por Stiles em 1891 (DUBEY, 1977). Tadros e Laarman (1976) sugeriram a denominação de *Isospora bigemina* ao ser encontrado nas células do epitélio intestinal de um cão.

O ciclo de vida de *I. bigemina* era considerado o mesmo para cães e gatos e quando infectados poderiam apresentar manifestações clínicas como febre, tremores musculares, fraqueza, diarreia e anemia (LEVINE, 1973). Infecções naturais pelo parasita foram relatadas em cães e gatos que eliminaram oocistos de diferentes tamanhos nas fezes (LEVINE; IVENS, 1965), embora não fosse possível a distinção com os de *T. gondii*, eram considerados pertencentes à mesma espécie (DUBEY; FAYER, 1976; LEVINE, 1973). Posterior à descoberta de *T. gondii*, novos

estudos foram feitos para desvendar a similaridade com *I. bigemina*, parasita que infectava gatos e cães, concluindo-se que *I. bigemina* era um protozoário obrigatoriamente heteroxeno (DUBEY; FAYER, 1976; DUBEY et al., 2002b; HEYDORN; MEHLHORN, 2002).

No ano de 1975, o gênero *Hammondia* foi introduzido, com a descrição de *Hammondia hammondia*, que tem os felídeos como HD (FRENKEL; DUBEY, 1975; DUBEY; SREEKUMAR, 2003). Pouco tempo depois, foi proposto que *I. bigemina* fosse chamada de *Hammondia heydorni*, que tem cães e cachorro-do-mato como HD (SCHARES et al., 2002; SOARES et al., 2009; TADROS; LAARMAN, 1976). A fase sexual do ciclo deste parasita ocorre com a eliminação fecal de oocistos, que levam até três dias para esporular no ambiente e tornarem-se infectantes (ABEL et al., 2006; MOHAMMED et al., 2003; SCHARES et al., 2003).

Algumas espécies de ruminantes foram confirmadas como HI naturais de *H. heydorni*, como gazela (*Gazella gazella*) (MOHAMMED et al., 2003), caprinos (SILVA et al., 2009) e bovinos (SOARES et al., 2009). No entanto, ainda não foram observados cistos deciduais em ruminantes (DUBEY et al., 2002a).

Estudos moleculares da sequência de ITS-1 demonstram a existência de heterogeneidade entre oocistos de *H. heydorni* eliminados por raposas e cães (MOHAMMED et al., 2003; SCHARES et al., 2002; SREEKUMAR et al., 2004). A variabilidade das sequências dos genes ITS-1, alfa-tubulina e HSP70, de amostras teciduais também foi avaliada e verificada a existência das linhagens raposa e canina (ABEL et al., 2006; MONTEIRO et al., 2008).

Estudos epidemiológicos sobre parasitas do gênero *Hammondia* têm sido controversos, devido às descrições de *Hammondia* spp. que puderam ser confundidas com *N. caninum*, dado que não há exames sorológicos disponíveis para a diferenciação entre estas duas espécies de coccídios (MONTEIRO et al., 2007; SCHARES et al., 2001, 2008; SOARES et al., 2011). Barratt et al. (2008), inicialmente indicaram a detecção de *H. heydorni* em amostras teciduais de *M. musculus*, mas o alinhamento das sequências obtidas comprovaram que o organismo detectado correspondia a *N. caninum*, os autores ressaltam a importância da sequência ITS-1 na identificação correta dos coccídios da família Sarcocystidae.

Vários estudos experimentais relataram oocistos de *H. heydorni*-like em fezes de raposas (DAHLGREN; GJERDE, 2010; GJERDE, 1983) e diferentes denominações têm sido atribuídas aos oocistos de *H. heydorni*-like. No entanto,



acreditava-se que varias espécies eram hospedeiro-específicas, nomeando *I. bigemina*-like descritos em raposas no Cazaquistão como *Isospora truffitti* n. sp. (TRIFFITT, 1927), que posteriormente foi alterada para *Isospora truffittae* por Levine (1985).

Adicionalmente a redescrição de *H. truffittae* foi objeto de estudo. Pesquisas demonstram a circulação deste coccídio em ambientes silvestres da Euroásia (ABEL et al., 2006; ELLIS et al., 1999; GERASIMCHIK, 2005; MOHAMMED et al., 2003), onde canídeos, como lobos e raposas, são HD, enquanto que a participação dos HI é ainda desconhecida e as pesquisas sugerem que antílopes, roedores e outros mamíferos possam ser HI eficientes. Recentemente a análise molecular dos locus ITS-1 e ITS-2 permitiram estabelecer que *H. truffittae* é uma espécie diferente de *H. heydorni*, apresentando diferenças moleculares importantes, embora morfologicamente sejam semelhantes (GJERDE; DAHLGREN, 2011).

#### 3.2.4 *Cystoisospora* spp.

Descrito pela primeira vez em 1881 por Schneider, os membros do gênero *Isospora* foram separados e classificados como um novo gênero, *Cystoisospora*, devido à formação de cistos teciduais em hospedeiros paratênicos, com ciclo heteroxeno obrigatório em roedores. Estudos filogenéticos do gene 18sRNA revelam diferenças suficientes para separar o gênero *Cystoisospora* (Sarcocystidae), correspondente a oocistos de mamíferos ausentes de corpo de Stieda nos esporocistos (estrutura residual na parte polar), do gênero *Isospora* com presença do corpo de Stieda (BARTA et al., 2005; SCHRENZEL et al., 2005).

Existem quatro espécies patogênicas para cães nomeadas como *C. canis*, *C. ohioensis*, *C. burrowsi* e *C. neorivolta* e, que por dificuldades de identificação morfológica são agrupadas no complexo *C. ohioensis* e, outras duas espécies cosmopolitas (*C. felis* e *C. rivolta*) que acometem o felino doméstico e felídeos silvestres como leopardos, tigres e leões (BJORK; AVERBECK; STROMBERG, 2000; PATTON; RABINOVITZ, 1994; SCHUSTER et al., 2009).

A presença de oocistos de *Cystoisospora* spp. foi relatada em fezes de *Myocastor coypus* e *Cavia aperea aperea* no sul do Brasil, concomitantes à co-infecção com os outros protozoários *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. (GRESSLER et al., 2010a; SILVA et al., 2007).

### 3.2.5 *Besnoitia* spp.

O nome do gênero *Besnoitia* faz referência ao pesquisador francês Besnoit que juntamente com Robin, no ano de 1912, observaram cistos de um protozoário na musculatura de um bovino. Inicialmente conhecido como *Sarcocystis*, *Gastrocystis* ou *Globidium* e posteriormente denominado como *Besnoitia* (FRENKEL, 1977). Na atualidade, a taxonomia deste gênero ainda não está bem definida. Características biológicas e morfológicas deste protozoário baseiam-se na presença de cistos, grandes e esféricos, em diferentes espécies de hospedeiros intermediários, com ciclo presa-predador entre mamíferos e répteis (FRENKEL, 1977; FRENKEL; SMITH, 2003).

Até hoje foram descritas as espécies *B. akodoni*, *B. bennetti*, *B. besnoiti*, *B. caprae*, *B. jellisoni* e *B. tarandi* e, as espécies *B. darlingi*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi* e *B. neotomofelis* como as únicas com hospedeiro definitivo reconhecido, o gato doméstico (BASSO et al., 2011; DIESING et al., 1988; DUBEY; LINDSAY, 2003; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO et al., 2012). Várias espécies de animais agem como HI, entre eles os roedores (*B. wallacei*, *B. jellisoni*), marsupiais (*B. darlingi*) e ruminantes (*B. besnoiti*) (MASON, 1980; MEHLHORN et al., 2009; MILLÁN et al., 2012).

Algumas espécies de *Besnoitia* têm sido descritas em roedores do Mediterrâneo, América e Ásia (AYROUD; LEIGHTON; TESSARO, 1995; FRENKEL, 1977) como *B. jellisoni* em roedores dos gêneros *Perymuscus* e *Dipodomys* nos Estados Unidos (ERNST et al., 1968); *B. wallacei* que infectou experimentalmente *R. rattus* e *R. norvegicus* na Tasmânia (MASON, 1980) e *B. akodoni* isolada de *Akodon montensis* no Brasil, sendo infectante para camundongos (*M. musculus*) e gerbilos (*M. unguiculatus*), mas não para gatos (*Felis catus*) (DUBEY et al., 2003).

## 3.3 Rodentia

Os roedores representados na ordem Rodentia abrangem 2280 espécies reconhecidas, que correspondem aproximadamente a 42% da biodiversidade de mamíferos do mundo. Podem ser encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida, apresentando ampla diversidade ecológica, vivendo no dossel de florestas úmidas, tocas, ambientes aquáticos ou no deserto. São importantes nos ecossistemas pela sua rápida reprodução, servindo como dispersores de sementes

e principalmente de alimento para animais predadores. O homem utiliza alguns roedores na alimentação, obtenção de peles e pesquisas laboratoriais. Também, são considerados como pragas ao causar prejuízos econômicos nas lavouras, além de transmitir doenças ao homem e atuar como reservatórios de muitas outras (KRÜGER, 2006).

O sistema digestório apresenta um ceco pós-digestivo com flora bacteriana capaz de degradar a celulose. Além disso, fazem coprofagia, que permite a absorção de nutrientes com uma eficiência próxima dos 80% (KRÜGER, 2006). A maioria são onívora, entretanto possuem dieta mais específica, seja herbívoro, frugívoro ou insetívoro (PAGLIA et al., 2012).

Taxonômicamente classificam-se pelas características do crânio e o padrão de mastigação, nas subordens: Sciuromorpha (esquilos, castores e marmotas), Myomorpha (ratos, camundongos, gerbilos e hamsters) e Hystricognathi (porquinhos-da-índia, capivaras e chinchilas).

### **Classificação taxonômica (WILSON; REEDER, 2005).**

Classe Mammalia Linnaeus, 1758

Ordem Rodentia Bowdich, 1821

Subordem Hystricomorpha Brandt, 1855

Infraordem Hysticognathi Brandt, 1855

Família Caviidae Fischer de Waldheim, 1817

Família Ctenomyidae Lesson, 1842

Família Myocastoridae Ameghino, 1904

#### **3.3.1 Roedores das Famílias Caviidae, Ctenomyidae e Myocastoridae**

##### **3.3.1.1 Cavia spp.**

A cavia ou preá (*Cavia spp.*), como é conhecida no Brasil (Figura 1), tem hábito terrestre e crepuscular (RINALDI, 2010) e alimentação constituída principalmente por gramíneas (herbívoros). São roedores de tamanho médio,

habitam savanas e grandes florestas desde o nível do mar até altitudes dos 4200 metros sobre o nível do mar, formando pequenos grupos compostos por um macho e duas fêmeas numa área de movimentação definida (550 a 880 ms), sem interferir com outro grupo adjacente. A distribuição espacial e temporal das fêmeas é dependente da distribuição de recursos, do nível de predação e das atividades de outros machos. Seu sistema social e de acasalamento é poligínico, com um macho que defende suas fêmeas dos machos de outros grupos (ASHER; DE OLIVEIRA; SACHSER, 2004; ASHER et al., 2008). Ninhos são construídos nas moitas de gramíneas onde abrigam duas ninhadas por ano com até cinco filhotes por gestação, que dura em torno de 61 dias (KRÜGER, 2006).

**Figura 1** – Ilustração do roedor cavia ou préa (*Cavia aperea*).



Fonte: Lucas, 2013.

Descobertas arqueológicas no Peru evidenciaram a domesticação deste roedor e seu uso na alimentação e rituais religiosos das civilizações pré-colombianas (DUNNUM; SALAZAR-BRAVO, 2010). São presas fáceis de felídeos silvestres (*Leopardus geoffroyi*, *L. colocolo*, *L. wiedii*, *L. tigrinus* e *Puma yagouaroundi*), gavião-de-cabeça-cinza (*Leptodon cayanensis*), furão (*Galictis vittata*), cuíca-de-cauda-grossa (*Lutreolina crassicaudata*) e quati-de-bando (*Nasua nasua*) (BARSTOW; LESLIE, 2012; CANEPUCCIA; MARTINEZ; VASSALLO, 2007; FURNARI, 2006; HOFFMAN, 2008; RINALDI, 2010; SOUSA; BAGER, 2008).

O gênero *Cavia* está composto por nove espécies endêmicas da América do Sul, dispersas em grande parte do continente, com exceção da Amazônia e das

regiões austrais do Chile e Argentina. Os indivíduos possuem um comprimento de corpo entre 200 e 400 mm, sem cauda externa e com peso que oscila entre 500 e 1500 g (FURNARI, 2006).

No Brasil são encontradas quatro espécies (Figura 2): *C. aperea*, *C. fulgida*, *C. magna* e *C. intermedia* (PAGLIA et al., 2012), esta última é espécie endêmica da Ilha Moleque do Sul, no litoral sul do estado de Santa Catarina, sendo o único mamífero do local com uma população média estimada de 42 indivíduos, considerada pela *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN, 2012) como espécie em perigo crítico de conservação (SALVADOR; FERNANDEZ, 2008).

**Figura 2** – Mapa de distribuição das espécies do gênero *Cavia* spp. presentes no Brasil.



Fonte: Modificado de IUCN (2013)

Poucos trabalhos referem-se ao estado sanitário das espécies do gênero *Cavia* e indicam a presença de agentes bacterianos como *Leptospira pomona* (BLOOD; SZYFRES; MOYA, 1962) e de artrópodos e helmintos (DITTMAR, 2002; GRESSLER et al., 2010b; KRÜGER, 2006), sem registros para gêneros da família Sarcocystidae.



### 3.3.1.2 Ctenomys spp.

Os tuco-tuco (Figura 3), assim chamados comumente, são roedores histricomorfos pertencentes à família Ctenomyidae, com um único gênero *Ctenomys*, sendo considerado um dos mamíferos de maior diversidade, com aproximadamente 80 espécies (FREITAS et al., 2012; REIG et al., 1990; TAMMONE; LACEY; RELVA, 2012; WILSON; REEDER, 2005).

**Figura 3** – Ilustração de uma das espécies do roedor tuco tuco (*Ctenomys minutus*).



Fonte: Noviski, 2013.

O gênero está amplamente distribuído pela América do Sul, no Altiplano andino (Peru e Bolívia), ao nível do mar (Chile), sudeste do Brasil e grande parte da Argentina, com altitudes que oscilam entre 0 e 5000 metros sobre o nível do mar (FREYGANG; MARINHO; FREITAS, 2004; LUNA; ANTENUCCI; BOZINOVIC, 2009; REIG et al., 1990).

São animais solitários e de hábito fossorial (escavam galerias subterrâneas), dos campos e planícies costeiras no sul do Brasil e áreas do Cerrado. Apresentando distribuição restrita em ecossistemas que permitem a formação de tocas. Estes roedores consomem plantas aéreas e raízes subterrâneas e sua massa corporal

oscila entre 100 e 1000 g segundo a preferência de habitat (LUNA; ANTENUCCI; BOZINOVIC, 2009; MORA et al., 2007; VERZI; OLIVARES; MORGAN, 2010).

Podem ser predados por várias espécies de felinos, em especial por *Leopardus colocolo* e *L. geoffroyi*, seguido de canídeos (GARCIA et al., 2009; PALACIOS, 2007; PEREIRA; WALKERA; NOVARO, 2012; WALKER et al., 2007).

No Brasil, sete espécies de tuco-tuco são descritas: *Ctenomys boliviensis* e *C. nattereri*, no Estado de Mato Grosso; *C. brasiliensis* no Estado de Minas Gerais e *C. torquatus*, *C. minutus*, *C. flamarioni* e *C. lami*, nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (FERNANDES et al., 2007; PAGLIA et al., 2012), conforme ilustrado na figura 4. A IUCN (2012) considera que as espécies *C. flamarioni* e *C. lami* do Sul do Brasil estão em risco de conservação, das outras espécies ainda não existem informações.

**Figura 4** – Mapa de distribuição das espécies do gênero *Ctenomys* presentes no Brasil.



Fonte: Modificado de IUCN (2013)

Estudos descrevem estes roedores como hospedeiros de várias espécies de parasitas, principalmente de nematódeos na Argentina (BRANT; GARDNER, 1997; ROSSIN; MALAZIA, 2002, 2005; ROSSIN; MALIZIA; DENEGRI, 2004; ROSSIN;

TIMI; MALIZIA, 2006a, b; ROSSIN; VARELA; TIMI, 2009; ROSSIN et al., 2005; SURIANO; NAVONE, 1994) e não existem estudos relacionados à infecção por coccídios da família Sarcocystidae neste grupo de roedores.

### 3.3.1.3 *Myocastor coypus*

Chamado de coypus ou nutria na Europa, falsa nutria na Argentina ou ratão do banhado no Brasil (Figura 5), este roedor tem origem sul-americana. A espécie foi introduzida na década de vinte do século passado em todos os continentes, exceto Austrália e Antártica (BOLLO et al., 2003; GOLDBY; KACKER, 1963).

**Figura 5** – Ilustração do roedor ratão do banhado (*Myocastor coypus*).



Fonte: Souchard, 2013.

A localidade tipo deste roedor é o rio Maipo na província de Santiago do Chile, mas ocorrem também na Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil, onde inicialmente estavam restritas ao Estado do Rio Grande do Sul e atualmente já foram descritas populações no Estado de São Paulo e, de maneira especial, nos arredores da cidade de Campinas. A figura 6 ilustra a distribuição do *M. coypus* (BOLLO et al., 2003).



**Figura 6** – Mapa de distribuição da espécie *Myocastor coypus* no Brasil.



Fonte: Modificado de IUCN (2013)

O tamanho corporal do ratão do banhado supera os 700 mm, com cabeça arredondada, pescoço e focinho curto de vibrissas grandes, pernas traseiras musculosas e membrana interdigital. Seu habitat são florestas próximas de rios, brejos ou represas, tendo como fim reduzir seu gasto energético para conseguir escapar de possíveis predadores. De comportamento noturno e solitário, sua alimentação é composta por gramíneas, raízes e plantas aquáticas, mas é complementada com moluscos de água doce (ACOSTA et al., 2007). Pode percorrer distâncias de 108 ms em procura de alimento numa área total de alimentação de 19 m<sup>2</sup> (CORRIALE et al., 2006). Possui um período de gestação de 130 dias com ninhadas compostas por um a 13 filhotes, que permanecem junto à mãe até os seis a 10 meses de idade (COLARES et al., 2010; IHERING, 1967; SONE et al., 2007).

Seu alto índice de reprodução, tamanho avantajado e rápida adaptação ao ambiente facilitaram sua ampla distribuição. Enquanto que em algumas regiões é considerado como um importante recurso pela sua carne e pele, em outras regiões é qualificado como praga, visto seu papel na dispersão de doenças e nos graves prejuízos às lavouras e zonas de irrigação (NEWSON; HOLMES, 1968). Campanhas de controle foram iniciadas em vários países, mas o sucesso da erradicação só foi

registrado na Inglaterra (BERTOLINO; PERRONE; GOLA, 2005; CARTER; LEONARD, 2000). Na Argentina, diferentemente do resto do mundo, a população vem apresentando declive pela caça indiscriminada, já que estes roedores constituem-se na principal carne silvestre comercializada no país (GUICHÓN; DONCASTER; CASSINI, 2003).

Agem como predadores naturais do ratão do banhado: *Puma concolor*, *Leopardus geoffroyi* e *Nasua nasua* (DE LUCCA, 2010; HOFFMAN, 2008; RAU; JIMENEZ, 2010; ROCHA-MENDES et al., 2010; SOUSA; BAGER, 2008).

A importância deste hospedeiro na transmissão de outros parasitas como trematódeos e nematódeos a outros animais e humanos próximos ao seu habitat tem sido avaliada (MARTINO et al., 2012; NEWSON; HOLMES, 1968; PAVLÁSEK; KOZAKIEWICZ, 1991).

Alguns estudos da toxoplasmose no *Myocastor coypus* existem na literatura. Um caso de toxoplasmose congênita em ratão do banhado em cativeiro foi relatado por Holmes, Illman e Beverly (1977) na Inglaterra. Os indivíduos não apresentaram nenhuma manifestação clínica e os autores consideram que estes animais poderiam ser resistentes a algumas cepas de *T. gondii*.

Na Itália a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 36,6% (n=41) pelo teste de aglutinação direta (BOLLO et al., 2003) e estudos feitos na França apresentam frequências menores, de 14,6% (n=48) e 12% (n=117) pelo MAT (AFONSO et al., 2007).

As condições sanitárias de 312 indivíduos de *M. coypus* de quatro diferentes biorregiões de Buenos Aires (Argentina) foram avaliadas entre os anos 1987 e 2006. *T. gondii* esteve presente, na forma clínica como toxoplasmose cerebral e hepática, em três dos animais coletados, com títulos sorológicos >64 pelo MAT (MARTINO et al., 2008).

A avaliação sorológica pelo MAT em *M. coypus* provenientes da região central da Itália, demonstrou uma frequência de títulos de anticorpos entre 20 a 40960 nos 44 (59,4%) dos 74 animais adultos testados e DNA de *T. gondii* foi amplificado pelo PCR do gene B1 em 12 nutrias soropositivas (NARDONI et al., 2011).

Embora esta espécie circule no Brasil, nenhum estudo foi feito até hoje no tangente à infecção por protozoários da família Sarcocystidae.

Nota: Abreviaturas:

PUCRS: Museu de Ciências e Tecnologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FZB: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular

ULBRA: Museu de Ciências da Universidade Luterana do Brasil

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os tecidos dos animais utilizados neste estudo fazem parte do material biológico consignado em coleções científicas de museus do Rio Grande do Sul, procedentes de animais atropelados e mortos em rodovias do Estado. Segundo a Instrução Normativa Federal nº154 de 01 de março de 2007 e na normativa do IBAMA Nº 119 de 11 de outubro de 2006, estes animais podem ser aproveitados em trabalhos científicos. A presente pesquisa tem certificado de isenção pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA e pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPESH do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### 4.1 Amostras analisadas

Um total de 75 roedores silvestres depositados nas coleções científicas do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB), Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Museu de Ciências da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), localizados nas cidades de Porto Alegre e Canoas, RS, foram coletados. O quadro 3 apresenta o número de indivíduos de cada espécie nos diferentes museus.

**Quadro 3** – Informações referentes à quantidade e espécies de roedores silvestres amostrados no Rio Grande do Sul.

| Gênero de<br>Roedor     | Museus (Quantidade amostrada) |     |       |       | Total     |
|-------------------------|-------------------------------|-----|-------|-------|-----------|
|                         | PUC                           | FZB | UFRGS | ULBRA | Amostrado |
| <i>Cavia</i> spp.       | 11                            | 2   | 0     | 19    | 32        |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 0                             | 1   | 28    | 1     | 30        |
| <i>Myocastor coypus</i> | 0                             | 11  | 0     | 2     | 13        |
| <b>Total</b>            | 11                            | 14  | 28    | 22    | 75        |

A pesquisa molecular de coccídios da família Sarcocystidae pela amplificação do espaçador interno transcrito ITS-1, foi realizada em amostras teciduais dos roedores silvestres sendo registradas, quando disponíveis, as variáveis espécie, sexo, procedência e data de depósito na coleção (Figura 7 e Quadro 4).

**Figura 7** – Mapa de distribuição geográfica das amostras (indicadas por números e cores) coletadas de roedores silvestres (n=75) no estado do Rio Grande do Sul.



Nota: Localidades de origem dos indivíduos por mesorregiões Centro ocidental n=1 (#30); Metropolitana n=23 (#13, 14, 15, 26, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 53, 54, 56, 67, 80, 83); Sudeste n=17 (#41, 42, 43, 48, 49, 50, 51, 52, 58, 59, 60, 63, 64, 68, 82, 85, 87) e Sudoeste n=21 (#16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 40, 55, 57, 61, 62, 65, 66, 84, 86).

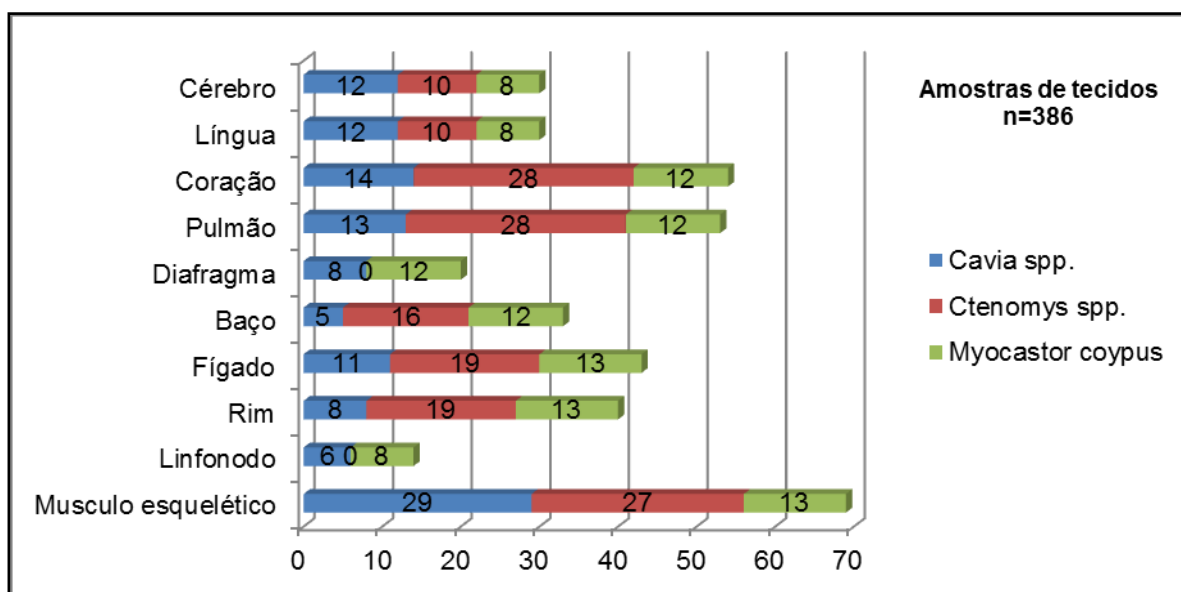
**Quadro 4** - Características dos 75 roedores silvestres amostrados das coleções biológicas dos museus do Rio Grande do Sul.

| Gênero                  | Indivíduos (%) | Sexo  |       | Procedência conhecida | Período de depósito |             |
|-------------------------|----------------|-------|-------|-----------------------|---------------------|-------------|
|                         |                | Macho | Fêmea |                       | 1999 - 2005         | 2006 - 2011 |
| <i>Cavia</i> spp.       | 32 (42,7)      | 11    | 14    | 29                    | 7                   | 16          |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 30 (30,0)      | 1     | 1     | 20                    | 2                   | 19          |
| <i>Myocastor coypus</i> | 13 (17,3)      | 12    | 1     | 13                    | 2                   | 10          |
| <b>Total</b>            | 75(100,0)      | 24    | 16    | 62                    | 11                  | 45          |

As 75 carcaças de roedores silvestres foram submetidas à necropsia taxidérmica para obtenção dos seguintes tecidos: músculo esquelético do quadríceps femoral, diafragma, língua, fragmentos de linfonodo, rim, fígado, baço, coração, pulmão e cérebro. Devido ao estado das carcaças, por serem de animais atropelados, o número de tecidos coletados por animal não foi sempre o mesmo.

Ao todo, 386 tecidos foram obtidos conforme o seguinte protocolo: a) Descongelamento prévio da carcaça; b) Retirada da pele sem prejuízo à integridade do material; c) Coleta de fragmentos de tecidos retirados com ajuda de pinças, tesouras e bisturi (fazendo esterilização em autoclave dos instrumentos utilizados em cada animal, evitando a contaminação cruzada entre indivíduos). A Figura 8 apresenta a quantidade dos diferentes tecidos obtidos de cada uma das espécies de roedor. Informações mais detalhadas são apresentadas no Apêndice A.

**Figura 8** - Proporção de amostras teciduais coletadas em diferentes espécies de roedores silvestres depositados nas coleções biológicas de museus do Rio Grande do Sul.



## 4.2 Análise molecular

A pesquisa de DNA de *T. gondii* existente nos tecidos foi realizada conforme a metodologia que se apresenta a seguir:

### 4.2.1 Extração de DNA

Um grama de tecido (dependendo da disponibilidade do órgão), foi macerado em TE pH 8,0 (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) na proporção 1:4, duas alíquotas de 200 µL do macerado final foram obtidas no intuito de aumentar a chance de detecção (MURADIAN et al., 2012). Seguido de extração enzimática com proteinase K e purificação com fenol – clorofórmio na proporção v/v (PENA et al., 2008). O DNA foi precipitado com etanol 70%, ressuspenso em TE buffer pH 8,0 (30 µL) e estocado à -20 °C até a execução da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.2.2 PCR e n-PCR da região ITS-1

A amplificação pela PCR foi realizada com os primers externos JS4 (CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C) e CT2c (CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC) dirigidos aos genes 18S e 5,8S rRNA, seguida da *nested*-PCR (*n*-PCR-ITS-1) com os primers internos JS4b (AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG) e CT2b (TTG CGC GAG CCA AGA CAT C) que flanqueiam a sequência completa do ITS-1 comum para coccídios Sarcocystidae (SOARES et al., 2011).

As condições do ciclo da PCR foram de 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 30 s a 56 °C e 30 s a 72 °C (ŠLAPETA et al., 2002). Cada 25 µL da reação contendo 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) platinum high fidelity (Invitrogen); 2,5 µL de tampão de reação 10x (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,5 µL da mistura de dNTPs (10 mM); 1,5 µL de cada primer sensu e anti-sensu (10 pM) e 2,5 µL da amostra de DNA.

Na *n*-PCR-ITS-1 usaram-se quantidades iguais da mistura da reação de PCR com a substituição dos primers. Controles positivos de *T. gondii* (RH) e *N. caninum* (Nc1) foram incluídos, assim como controles negativos já testados. Os amplicons obtidos na *n*-PCR-ITS-1 foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio, com um tamanho de banda esperado de ~500 pb para a subfamília Toxoplasmatinae e ~1000 pb para a subfamília Sarcocystinae.

#### 4.2.3 Sequenciamento de ácidos nucleicos

Os produtos amplicados positivos na *n*-PCR-ITS-1 foram purificados com ExoSAP-IT USB® (Affymetrix, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento foram adicionados 5 µL dos primers internos (JS4b e CT2b), utilizando BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). O processamento foi feito no ABI 3100 DNA Analyser (Applied Biosystems, CA, USA).



#### 4.2.4 Análise das sequências

A qualidade das sequências foi verificada pelo programa *Phed/Phrap/Consed* contido na suíte *Codoncode Aligner* (EWING et al., 1998). Utilizando-se o mesmo programa foi realizada a montagem da sequência final. Posteriormente, as sequências derivadas da *n*-PCR-ITS-1 foram submetidas na busca BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), a fim de identificar sequências homólogas (100% de identidade) à espécie do parasita disponíveis no *Genbank*, logo importadas e alinhadas com auxílio do programa Clustal W, contido na suíte *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999; THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As sequências foram empregadas para avaliar o grau de diversidade nucleotídica existente entre elas com auxílio do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007). Para a construção das árvores foi empregado o método de distancia *neighbor-joining* e a confiabilidade estatística foi avaliada pelo teste de *bootstrap*.

#### 4.3 Análise estatística

Para esta amostragem por conveniência, o teste de chi-quadrado com um nível de significância de  $p < 0,05$  foi utilizado para estabelecer possíveis associações entre as variáveis estudadas (espécie, sexo, localidade e ano de depósito na coleção) e o encontro dos diferentes coccídios. Os dados coletados foram analisados no software IBM SPSS Statistics19.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Detecção de DNA pela amplificação do locus ITS-1

Positividade para coccídios da família Sarcocystidae pela amplificação molecular do ITS-1, foi obtida em 24 roedores (32,0%) dos 75 analisados das espécies *Cavia* spp. (11/32), *Ctenomys* spp (8/30) e *Myocastor coypus* (5/13).

Em relação às variáveis analisadas, os machos (42%) apresentaram uma positividade maior que as fêmeas (25%) para os coccídios em estudo. Quanto à procedência, 21 indivíduos (34%) positivos possuíam local conhecido. Um pequeno número de animais positivos foi detectado dentre os depositados no período entre 2000 a 2005 (n=2) quando comparado aos 18 do período entre 2006 a 2011. Nenhuma das variáveis em análise teve associação com a positividade para algum dos coccídios Sarcocystidae estudados ( $p>0,05$ ), como apresentado na tabela 1.

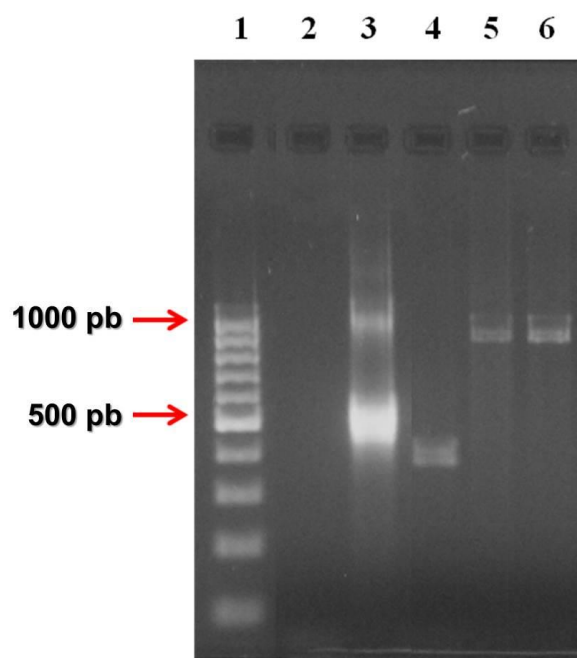
**Tabela 1** – Dados de detecção de DNA de coccídios da família Sarcocystidae pela amplificação de ITS-1 em roedores silvestres do Rio Grande do Sul (n=75) por sexo, espécie, procedência e período de depósito nas coleções.

| Variável                   | Número de animais |           |             |
|----------------------------|-------------------|-----------|-------------|
|                            | Examinados        | Positivos | Porcentagem |
| <b>Espécie</b>             |                   |           |             |
| <i>Cavia</i> spp.          | 32                | 11        | 34,4        |
| <i>Ctenomys</i> spp.       | 30                | 8         | 26,7        |
| <i>Myocastor coypus</i>    | 13                | 5         | 38,5        |
| <b>Sexo</b>                |                   |           |             |
| Macho                      | 24                | 10        | 41,7        |
| Fêmea                      | 16                | 6         | 37,5        |
| <b>Localidade</b>          |                   |           |             |
| Centro Ocidental           | 1                 | 0         | 0,0         |
| Metropolitana              | 23                | 6         | 26,1        |
| Sudeste                    | 17                | 10        | 58,8        |
| Sudoeste                   | 21                | 5         | 23,8        |
| <b>Período de depósito</b> |                   |           |             |
| 1999 a 2005                | 11                | 2         | 18,2        |
| 2006 a 2011                | 45                | 18        | 40,0        |

n= número de indivíduos.

DNA de coccídios da subfamília Toxoplasmatinae foi identificado em nove indivíduos (12,0%) e da subfamília Sarcocystinae em seis (8,0%). Outros coccídios, sendo estes considerados como amplificações diferentes ao tamanho de referência esperado para Toxoplasmatinae (~500pb) e Sarcocystinae (~1000pb) (Figura 9), foram detectados em 13 roedores (17,3%) (Tabela 2 e Apêndice B).

**Figura 9** - *Nested-PCR* da região ITS-1 em gel de agarose 2%, a partir de amostras primárias de musculatura esquelética de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.



Legenda: Linha 1: Marcador de peso molecular (100pb)  
 Linha 2: H<sub>2</sub>O controle negativo.  
 Linha 3: controle positivo *T. gondii* (cepa RH)  
 Linha 4: amostra 36 - músculo esquelético de *M. coypus*  
 Linha 5: amostra 13 - músculo esquelético de *M. coypus*  
 Linha 6: amostra 29 - músculo esquelético de *Cavia* spp.

**Tabela 2** - Frequência de roedores silvestres positivos a coccídios das famílias Toxoplasmatinae e Sarcocystinae pela *n*-PCR-ITS-1.

| Especie de Roedor       | Número e percentagem (%) de animais positivos por subfamília |                 |                |                  |                                    |
|-------------------------|--|-----------------|----------------|------------------|------------------------------------|
|                         | Positivos/Examinados   | Toxoplasmatinae | Sarcocystinae  | Outros coccídios | Toxoplasmatinae – Outros coccídios |
| <i>Cavia</i> spp.       | 11/32  | 3 (9,4)         | 2 (6,3)        | 5 (15,6)         | 1(3,1)                             |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 8/30   | 2 (6,7)         | 1 (3,3)        | 4 (13,3)         | 1(3,3)                             |
| <i>Myocastor coypus</i> | 5/13   | 2 (15,4)        | 2 (15,4)       | 1 (7,7)          | 0 (0,0)                            |
| <b>Total</b>            | <b>24/75</b>   | <b>7 (9,3)</b>  | <b>5 (6,7)</b> | <b>10 (13,3)</b> | <b>2 (2,7)</b>                     |

Do total de 386 tecidos analisados, 31 amostras (8,0%) foram positivas a pelo menos uma das subfamílias de coccídios pesquisadas. Quanto à detecção de DNA dos coccídios, segundo os tecidos analisados, houve presença majoritária em músculo esquelético (20/69), seguido por coração (3/54), fígado (2/43), língua (2/30), cérebro (2/30), pulmão (1/53) e diafragma (1/20). A subfamília Toxoplasmatinae foi detectada em 10 (3,4%) amostras teciduais. A subfamília Sarcocystinae em seis (1,6%) e outros coccídios em treze (3,4%) amostras teciduais. Duas amostras, uma de *Cavia* spp. (#64) e outra de *Ctenomys* spp. (#68), referentes à musculatura esquelética, apresentaram perfis de banda dupla, isto é a co-infecção entre coccídios da subfamília Toxoplasmatinae e outro coccídio não identificado. O número de amostras positivas para as subfamílias Toxoplasmatinae, Sarcocystinae e outros coccídios, por tecido e espécie de roedor silvestre, é apresentado em detalhe no Apêndice C.

## 5.2 Sequenciamento de produtos amplificados pela n-PCR-ITS-1

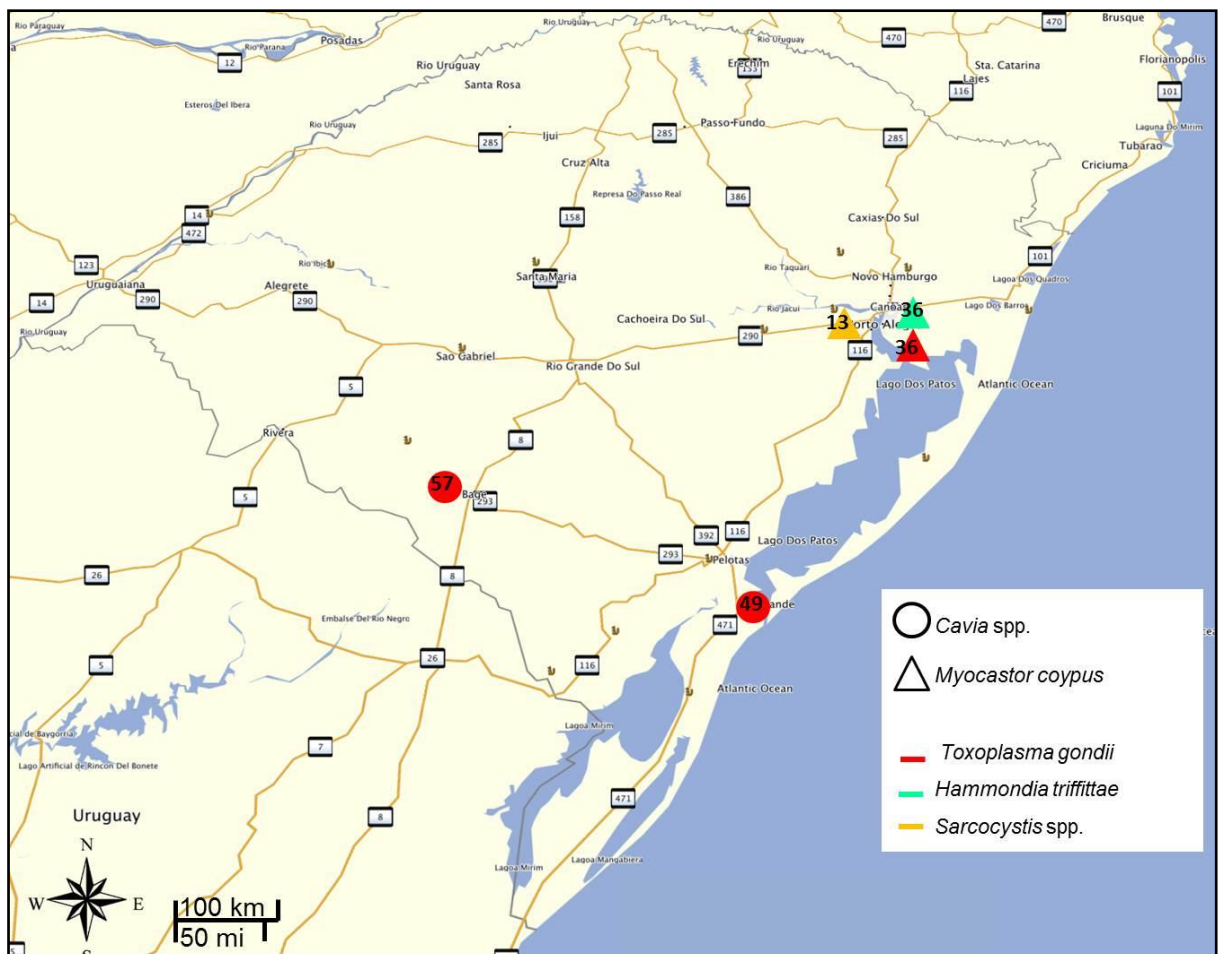
A sequência total do ITS-1 para *Hammondia triffittae* foi obtida de uma amostra de diafragma de um *Myocastor coypus* (#36) e DNA de *T. gondii* foi confirmado na musculatura esquelética (#57) e cérebro (#49) de dois roedores do gênero *Cavia* spp e na musculatura esquelética de um *Myocastor coypus* (#36). Uma sequência idêntica a *Sarcocystis* spp. foi parcialmente resolvida em uma amostra de musculatura esquelética de *Myocastor coypus* (#13) e de *Sarcocystis felis*-like no mesmo tecido em um *Ctenomys* spp. (#5). A distribuição geográfica de cinco amostras positivas sequenciadas e a identificação das seis amostras sequenciadas são representadas no quadro 5 e na figura 10.

**Quadro 5** - Nested-PCR para coccídios da família Sarcocystidae em tecidos de roedores contendo DNA dos parasitas e identificação das espécies pelo sequenciamento.

| Coccídio                      | Musculatura esquelética | Cérebro | Diafragma | Total |
|-------------------------------|-------------------------|---------|-----------|-------|
| <i>Toxoplasma gondii</i>      | 2 (Mc*; C)              | 1 (C)   | 0         | 3     |
| <i>Hammondia triffittae</i>   | 0                       | 0       | 1 (Mc*)   | 1     |
| <i>Sarcocystis</i> sp.        | 1 (Mc)                  | 0       | 0         | 1     |
| <i>Sarcocystis felis-like</i> | 1 (Ct)                  | 0       | 0         | 1     |

Mc: *Myocastor coypus*; C: *Cavia* spp.; Ct: *Ctenomys* spp. \*: tecidos do mesmo indivíduo.

**Figura 10** – Mapa de distribuição geográfica das amostras positivas (#13, 36, 49 e 57) para coccídios da subfamilias Toxoplasmatinae e Sarcocystinae em roedores silvestres do Rio Grande do Sul, segundo a análise das seqüências do locus ITS-1.



### 5.3 Análise das sequências obtidas

Utilizando a ferramenta BLAST foram recuperadas as sequências do Genbank e calculado a percentagem de identidade das seis amostras teciduais (Quadro 6). Para as três sequências de *T. gondii* (#36Me, #49Ce e #57Me) e para a sequência de *H. triffittae* (#36D) foi realizado o alinhamento com as sequências homólogas pelo software *BioEdit* (Apêndice D).

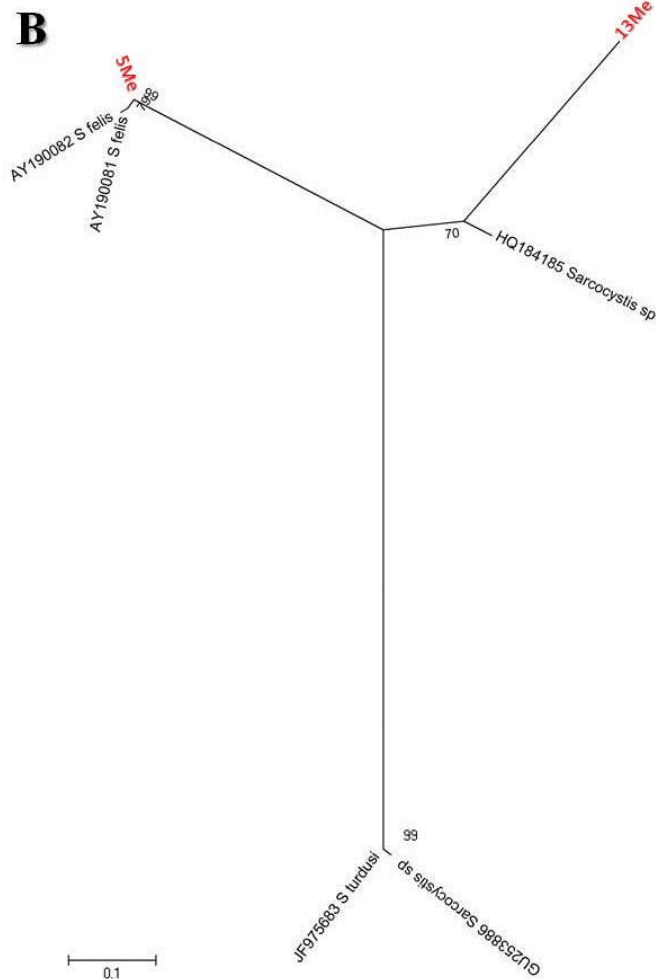
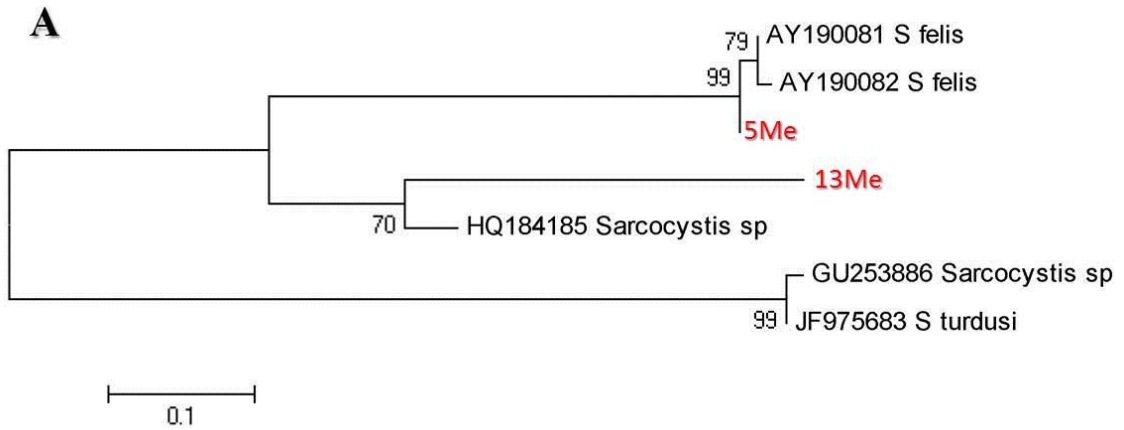
**Quadro 6** - Identificação molecular das sequências de DNA obtidas de tecidos positivos pela *n*-PCR-ITS-1 de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.

| Amostra | Espécie                 | Localidade de origem | Identidade molecular (Número de acesso no Genbank)   |
|---------|-------------------------|----------------------|--|
| 5Me     | <i>Ctenomys</i> spp.    | SD                   | 98% de id. com <i>S. felis</i> -like (AY190081)<br>97% de id. com <i>S. felis</i> -like (AY190082) |
| 13Me    | <i>Myocastor coypus</i> | Porto Alegre         | 84% de id. com <i>Sarcocystis</i> sp. (HQ184185)   |
| 36D     | <i>Myocastor coypus</i> | Viamão               | 100% de id. com <i>H. triffittae</i> (GQ984216;GQ984215)   |
| 36Me    | <i>Myocastor coypus</i> | Viamão               |  |
| 49Ce    | <i>Cavia</i> spp.       | Ilha dos Marinheiros | 100% de id. com <i>T. gondii</i> (AF252408; X75429; X75453)  |
| 57Me    | <i>Cavia</i> spp.       | Bagé                 |  |

Me: musculatura esquelética; D: diafragma; Ce: cérebro; SD: sem dado; id: identidade

Para a reconstrução filogenética das sequências obtidas para *Sarcocystis* (amostras #5Me e #13Me) utilizou-se o método de distância *neighbor-joining*. Cinco sequências obtidas no BLAST foram usadas como referências conhecidas (HQ184185, GU253886, JF975683, AY190081, AY190082). Esta reconstrução gerou a árvore da figura 11A, na qual os diversos táxons podem ser diferenciados pelas distâncias entre as sequências do locus ITS-1. Na figura 11B, a árvore de disposição radial facilita a visualização da distância entre as espécies de *Sarcocystis*.

**Figura 11** - Árvore de distâncias das sequências de nucleotídeos da região ITS-1 da subfamília Sarcocystinae das amostras de roedores silvestres (#5Me e #13Me) e de referência, inferida pelo método *neighbor-joining* com teste bootstrap de 1000 réplicas. Árvore não enraizada gerada com auxílio do programa MEGA. A: disposição retangular e B: disposição radial.





## 6 DISCUSSÃO

Roedores silvestres servem como importantes indicadores para avaliar a ocorrência e o nível de contaminação do meio ambiente e a apresentação de doenças zoonóticas em carnívoros de vida livre. No entanto, a variabilidade na abundância e distribuição das espécies de roedores e suas taxas de infecção, são fatores relevantes para a transmissão das doenças (REPERANT et al., 2009).

Até o momento, são limitadas as informações a respeito da infecção por coccídios Sarcocystidae nas espécies de roedores silvestres que são objeto do presente estudo. Anticorpos séricos para *Toxoplasma gondii* já foram documentados na Europa e Argentina em *Myocastor coypus* (BOLLO et al., 2003; HOLMES; ILLMAN; BEVERLY, 1976; MARTINO et al., 2008; NARDONI et al., 2011) entretanto, nenhum estudo foi realizado com as espécies *Cavia* e *Ctenomys*, assim, os resultados obtidos neste estudo são o primeiro registro da circulação deste coccídio nessas duas espécies de roedores silvestres no Brasil.

Pela amplificação do marcador ITS-1, DNA de *T. gondii* foi detectado na musculatura esquelética e cérebro de três roedores silvestres, sendo positivos dois dos 32 (6,3%) indivíduos do gênero *Cavia* e um dos 13 (7,7%) da espécie *M. coypus*. Estudos anteriores, também demonstraram a presença deste parasita com frequências moleculares maiores em pulmão 50% (YINGGUANG et al., 2012), cérebro 40,8% (THOMASSOM et al., 2011) e rim 27,3% (NARDONI et al., 2011) de roedores, no entanto Truppel et al. (2010a) e Muradian et al. (2012) obtiveram frequências baixas em amostras teciduais de coração (1/26) e cérebro (2/121), resultados similares aos aqui relatados (3/75).

Embora ainda seja desconhecida a distribuição tecidual de *T. gondii*, as pesquisas feitas no modelo camundongo apontam para uma maior afinidade do parasita pelo sistema nervoso central (cérebro). Na musculatura esquelética a quantidade de DNA é inferior a 250 µg por cada 100 gramas de tecido, sustentando a necessidade de realizar a amplificação pelo bioensaio (DUBEY et al., 2004), o que explicaria a baixa positividade obtida nas amostras teciduais analisadas. Há ainda o fato de que as amostras utilizadas neste estudo estavam congeladas há vários anos e algumas delas em estado não muito adequado, o que poderia também ter influenciado na qualidade do DNA tecidual.

Na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, o carnivorismo é a principal via de transmissão (DUBEY, 2010) e os roedores são considerados itens básicos na dieta de diversas espécies de felídeos silvestres e eventualmente do gato doméstico (CAÑÓN-FRANCO; ARAÚJO; GENNARI, 2013). Vários estudos demonstram que a taxa de infecção de *T. gondii* nestes felinos está relacionada com a relação presa-predador (AFONSO et al., 2007), o que torna o encontro de *T. gondii* nestes três roedores silvestres de duas espécies diferentes um fato importante na epidemiologia de *T. gondii* nos ambiente estudados.

Carnes de animais silvestres são fontes importantes de proteína em comunidades sul-americanas (SAADOUN; CABRERA, 2008). *Cavia* e, em especial, o *Myocastor coypus* são roedores altamente apreciados como iguarias em países sul-americanos (DUNNUM; SALAZAR-BRAVO, 2010; GUICHÓN; DONCASTER; CASSINI, 2003). O consumo destas carnes cruas ou mal cozidas pode constituir uma importante via de infecção para o homem, como ocorre pelo consumo de carnes de animais criados para tal finalidade (KIJLSTRA; JONGERT, 2008). Os registros da existência da toxoplasmose clínica no *M. coypus* na Argentina (MARTINO et al., 2008) e a detecção de *T. gondii* em tecidos de *Cavia* (preá) e *M. coypus* (ratão do banhado) provenientes do sul do Brasil, alertam sobre a possibilidade de risco de infecção para a população humana desta região, onde os roedores são amplamente distribuídos e frequentemente caçados, apesar de que registros de ingestão destas carnes pela população local são inexistentes.

Na mesma região onde esses roedores foram detectados com *T. gondii* há relatos de presença de felídeos neotropicais de vida livre e, alguns desses também positivos ao mesmo coccídio (CAÑÓN-FRANCO, 2013). Nesse estudo as espécies de felídeos *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii* e *Puma yagouaroundi* apresentaram DNA em seus tecidos e, já é conhecido que os roedores estudados nesta pesquisa (*Cavia* spp., *Ctenomys* spp., *M. coypus*), fazem parte da cadeia alimentar desses felídeos apontando a relação presa-predador e so pequenos roedores silvestres como de grande importância, provavelmente maior no ciclo selvagem do que doméstico de *T. gondii*.

A patogenicidade da infecção toxoplásmica no homem apresenta grande relação com o tipo de genótipo infectante e a genotipagem de *T. gondii* obtidos de amostras primárias ou isolados em camundongo vem sendo feita em diferentes partes do mundo. As técnicas de PCR-RFLP e de marcadores microssatélites

auxiliam na identificação do polimorfismo de *T. gondii* e no conhecimento da participação dos isolados na epidemiologia da doença (DARDÉ, 2004; DARDÉ; PEYRON, 2013), entretanto, no presente estudo, feito exclusivamente com amostras teciduais primárias, a qualidade e/ou quantidade do DNA obtido não levou a uma boa amplificação da região ITS-1 ou em alguns casos uma obtenção de sequência de nucleotídeos, o que não permitiu que as amostras de *T. gondii* obtidas fossem genotipadas.

O espacador interno transcrito ITS-1 tem sido utilizado no intuito de estabelecer diferenças entre coccídios estreitamente relacionados (MARSH et al., 1998; ŠLAPETA et al., 2002). Neste estudo a inferência de patogenicidade não pode ser realizada com base neste marcador, no entanto o alinhamento da sequência completa do ITS-1 de *T. gondii* resultante nas três amostras teciduais provenientes de duas *Cavia* spp. e de um *M. coypus* (436 pb) teve 100% de identidade com a sequência de referência AF252408 isolada de *Phoca vitulina richadsi* (foca-comum), num caso de meningoencefalomielite fatal por *T. gondii* nos Estados Unidos (MILLER et al., 2001) e, com o isolado de referência da cepa RH (X75429, X75453) tipificada como do tipo I.

Oocistos de *Hammondia triffittae* foram previamente descritos em fezes de *Vulpes vulpes fulva* (raposa vermelha) e *Vulpes lagopus* (raposa-do-Ártico) e inicialmente identificados pelas semelhanças morfológicas como *Isospora triffitti* / *Isospora triffittae* (GERASIMCHIK, 2005, 2006; NUKERBAEVA; SVANBAEV, 1973). Na atualidade, é consenso entre os pesquisadores, a existência de dois halogrupos de *H. heydorni* em relação aos possíveis hospedeiros definitivos, um que têm os cães domésticos e outro os canídeos silvestres.

O estudo feito por Gjerde e Dahlgren (2011) estabelece que a espécie que acomete os animais silvestres trata-se de *H. triffittae* e concluem que os genes *lsu* rRNA e *alfa* tubulina são suficientes para discriminar entre estas duas espécies de *Hammondia*. Não entanto, os hospedeiros intermediários deste coccídio ainda são desconhecidos e provavelmente fazem parte os ruminantes como as renas, ovelhas, caprinos, além de roedores e coelhos.

A sequência completa obtida do ITS-1 de 437 pb na amostra #36D de *Myocastor coypus*, foi 100% correspondente às sequências de referência para *H. triffittae* (GQ984215 e GQ984216) provenientes de oocistos de fezes de *Vulpes vulpes* da Dinamarca. O alinhamento da sequência da amostra #36D demonstrou

diferenças de nucleotídeos nas posições 348, 372, 386, 411 e 414 em comparação às sequências de referência para *H. heydorni* (AF317281; AF317282), obtidas de oocistos de cães domésticos na República Checa.

Embora existam importantes diferenças no locus ITS-1 que permitam estabelecer a possível identidade da amostra #36D como *H. triffittae*, este locus mostrou-se menos discriminante entre as duas espécies de *Hammondia* (GJERDE; DAHLGREN, 2011), sendo necessária a utilização de outros marcadores moleculares como os genes 1su rRNA e alfa tubulina, para definir a identidade deste coccídio.

Neste estudo, cinco dos 75 roedores silvestres analisados (6,7%) foram positivos para *Sarcocystis* spp. pela amplificação do ITS-1 e no sequenciamento uma única amostra positiva, identificada na musculatura esquelética de *Ctenomys* spp. (#5Me), foi semelhante à de *Sarcocystis felis* com 97 e 98% de identidade, com respeito às sequências de referência (AY190081; AY190082), ambos clones provenientes de gato doméstico dos Estados Unidos (GILLIS et al., 2003).

Cistos teciduais de *Sarcocystis felis* foram documentados em felídeos silvestres como *Acinonyx jubatus*, *Puma concolor*, *Lynx rufus*, *Panthera leo* e a eliminação de oocistos nas fezes de indivíduos destas espécies ainda não foi descrita, portanto sendo considerados como HI (ANDERSON et al., 1992; BRIGGS et al., 1993; DUBEY, 1982; DUBEY et al., 1992; GREINER et al., 1989; KINSEL et al., 1998; KLUGE, 1967). A participação de outros animais como HI, dentro da cadeia alimentar destes carnívoros, deve ser motivo de estudos para maiores informações da epidemiologia deste coccídio na região estudada.

Pequenos felídeos silvestres alimentam-se de roedores, marsupiais, aves, lagartos e excepcionalmente de espécies de maior tamanho (REIS et al., 2006). Recentemente, Cañón-Franco (2013) descreveu a presença de *S. felis*-like em amostras teciduais de cinco das seis espécies de pequenos felinos neotropicais do Rio Grande do Sul, entre eles o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) e o gato-domato-grande (*Leopardus geoffroyi*), considerados predadores da espécie *Ctenomys* spp., o que reforça a importância da relação presa-predador e a transmissão pelo carnivorismo deste coccídio na região sul do Brasil.

A amostra #13Me de *M. coypus* também foi sequenciada e foi correspondente à *Sarcocystis* sp., com uma identidade de 84% com referência à sequência

HQ184185, obtida de tecido muscular de um mamífero marinho dos Estados Unidos (cachalote – *Physeter macrocephalus*) por Gibson et al. (2011).

Uma árvore de distâncias foi construída pelo método de *neighbor-joining* com teste bootstrap de 1000 réplicas. As sequências do locus ITS-1 de *Ctenomys* spp. (#13Me) e de *M. coypus* (#5Me) foram utilizadas junto às sequências homólogas recuperadas do BLAST. Pela observação da topografia gerada, pode-se observar que a amostra #5Me possui claramente uma elevada proximidade com amostras de *Sarcocystis felis*. Entretanto, esta não parece pertencer a esta espécie devido às diferenças na sua sequência de nucleotídeos, razão pela qual foi denominada como *Sarcocystis felis-like*. A mesma consideração é válida para a sequência da amostra #13Me que encontra-se próxima da espécie *Sarcocystis* sp., isolado proveniente de um mamífero marinho. É importante lembrar que a amostra #13Me foi obtida do roedor *M. coypus* que possui hábitos aquáticos tal qual o isolado de referência que foi obtido de musculatura esquelética de um mamífero aquático.

Do total de indivíduos positivos (24) neste estudo não foi possível sequenciar amostras para Toxoplasmatinae, Sarcocystinae e outros coccídios de 4, 4 e 10 amostras, respectivamente, em razão da baixa qualidade e quantidade do DNA extraído. Entretanto, não se descarta a possibilidade da presença de outros gêneros de Sarcocystidae como *Besnoitia*, *Neospora* e *Cystoisospora*. Para tentar obter informações que possam auxiliar no diagnóstico desses coccídios será realizada a clonagem para amplificar a quantidade de material genético.

Populações de roedores silvestres têm papel importante nos ecossistemas, nesta pesquisa foi possível estabelecer a circulação de *Sarcocystis*, *Toxoplasma* e *Hammondia* nas três espécies de roedores silvestres da região sul do Brasil (*Cavia*, *Ctenomys* e *Myocastor coypus*), demonstrando a participação destes animais no ciclo silvestre destes coccídios, além de fornecer informações da possível transmissão na interfase homem-animais silvestres com potenciais efeitos na saúde pública, o que requer pesquisas complementares.

Vale ressaltar que o uso de animais silvestres depositados em coleções biológicas, muitas vezes originados de espécies em extinção e muito raros, deve ser incentivado, não só com enfoque populacional, mas também de sanidade para obter informações diretas sobre as espécies em estudo e indiretas sobre aquelas espécies que fazem parte de suas cadeia alimentares. Este estudo mostrou que estas coleções têm um amplo potencial de fornecer tais amostras e valiosas informações.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Espécies de roedores silvestres *Cavia* spp., *Ctenomys* spp. e *Myocastor coypus*, distribuídos na região sul do Brasil, são capazes de albergar formas teciduais de coccídios dos gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Sarcocystis*.
- Amostras teciduais (musculatura esquelética e diafragma) e cérebro são importantes órgãos para a pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae por métodos moleculares.
- As coleções biológicas são importantes acervos de material genético e o uso de tecidos de animais silvestres nelas depositados podem ser feitos, sem prejuízo às populações de vida livre e aos outros usos a que se destinam essas coleções biológicas.

## REFERÊNCIAS\*

- ABEL, J. et al. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, London, v. 132, p. 187-192, 2006.
- ACOSTA, L. et al. Recientes registros del coipú (*Myocastor coypus*) para Bolivia. **Kempffiana**, v. 3, n. 1, p. 35-38, 2007.
- AFONSO, E. et al. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. **Parasitology**, London, v. 134, p. 1963-1971, 2007.
- AJZENBERG, D. et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 34, p. 1185-1196, 2004.
- ANDERSON, A. J. et al. *Sarcocysts* in the Florida Bobcat (*Felis rufus floridanus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 28, n. 1, p. 116-120, 1992.
- ARAÚJO, J. B. et al. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, p. 328-331, 2010.
- ASHER, M.; DE OLIVEIRA, E. S.; SACHSER, N. Social system and spatial organization of wild guinea pigs (*Cavia aperea*) in a natural population. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 85, n. 4, p. 788-796, 2004.
- ASHER, M. et al. Large males dominate: ecology, social organization, and mating system of wild cavies, the ancestors of the guinea pig. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 62, n. 9, p. 1509-1521, 2008.
- AYROUD, M.; LEIGHTON, F. A.; TESSARO, S. V. The morphology and pathology of *Besnoitia* sp. in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 31, p. 319-326, 1995.
- BARRATT, J. et al. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 228-233, 2008.
- BARSTOW, A. L.; LESLIE, D. M. Jr. *Leopardus braccatus* (Carnivora: Felidae). **Mammalian species**, Lawrence, v. 44, n. 891, p. 16-25, 2012.
- BARTA, J. R. et al. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, p. 726-727, 2005.
- BERTOLINO, S.; PERRONE, A.; GOLLA, L. Effectiveness of coypú control in small Italian wetland areas. **Wildlife Society Bulletin**, Washington DC, v. 33, p. 714-720, 2005.

\* De acordo com:

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

BJORK, K. E.; AVERBECK, G. A.; STROMBERG, B. E. Parasites and parasite stages of free-ranging wild lions (*Panthera leo*) of northern Tanzania. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 31, p. 56-61, 2000.

BLOOD, B. D.; SZYFRES, B.; MOYA, V. Natural *Leptospira pomona* Infection in the Pampas Cavy. **Public Health Reports**, Washington DC, v. 77, p. 583-588, 1962.

BOBIĆ, B. et al. *Toxoplasma gondii* infection in South-East Europe: Epidemiology and Epizootiology. In: DJURKOVIĆ, O. D. (Ed.). **Toxoplasmosis - Recent Advances**. 2012. ISBN: 978-953-51-0746-0, InTech, DOI: 10.5772/50831. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis-recent-advances/toxoplasma-gondii-infection-in-south-east-europe-epidemiology-and-epizootiology>>. Acesso em: 01 nov. 2012.

BOLLO, E.; PREGEL, P.; GENNERO, S.; PIZZONI, E.; ROSATI, S.; NEBBIA, P.; BIOLATTI, B. Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 75, p. 21-25, 2003.

BRANT, S. V.; GARDNER, S. L. Two new species of *Litomosoides* (Nemata: Onchocercidae) from *Ctenomys opimus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the altiplano of Bolivia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, p. 700-705, 1997.

BRIGGS, M. B.; LEATHERS, C. W.; FOREYT, W. J. *Sarcocystis felis* in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Washington DC, v. 60, p. 227-229, 1993.

CANEPUCCIA, A. D., MARTINEZ, M. M.; VASSALLO, A. I. Selection of waterbirds by Geoffroy's cat: Effects of prey abundance, size, and distance. **Mammalian Biology**, Jena, v. 72, n. 3, p. 163-173, 2007.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. **Detecção molecular de coccídios da família Sarcocystidae em amostras teciduais de pequenos felídeos neotrópicos do Rio Grande do Sul**. 2013. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 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, 2013. In press.

CARTER, J.; LEONARD, B. A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypus (*Myocastor coypus*). **Wildlife Society Bulletin**, Washington DC, v. 30, p. 162-175, 2000.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological Reviews**, Washington DC, v. 57, p. 953-994, 1993.

CHRISTIE, E.; PAPPAS, P. W.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of excystment of *Toxoplasma gondii* oocysts. **The Journal of Protozoology**, New York, v.25, p. 438-443, 1978.

COLARES, I. G.; OLIVEIRA, R. N. V.; OLIVEIRA, R. M.; COLARES, E. P. Feeding habits of coypu (*Myocastor coypus* Molina 1978) in the wetlands of the Southern



region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 671-678, 2010.

CORRIALE, M. J. et al. Habitat-use patterns of the *coypu Myocastor coypus* in an urban wetland of its original distribution. **Acta Theriologica**, Bialowierza, v. 51, n. 3, p. 295-302, 2006.

COSTA, D. G. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 98, p. 679-680, 2012.

DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B. The red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Vulpes lagopus*) are definitive hosts of *Sarcocystis alces* and *Sarcocystis hjorti* from moose (*Alces alces*). **Parasitology**, London, v. 137, p. 1547-1557, 2010.

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.

DARDÉ, M.-L.; PEYRON, F. Toxoplasma y toxoplasmosis. **EMC – Pediatría**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2013.

DE LUCCA, E. R. Presencia del puma (*Puma concolor*) y conflicto con el hombre en las pampas Argentinas. **Nótulas Faunísticas**, Buenos Aires, v. 48, n. 2, p. 1-17, 2010.

DIESING, L. et al. *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. **Parasitology Research**, Berlin, v. 75, p. 114-117, 1988.

DITTMAR, K. Arthropod and helminth parasites of the wild guinea pig, *Cavia aperea*, from the Andes and the cordillera in Peru, South America. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 409-411, 2002.

DOLEŽEL, D. et al. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 29, p. 795-798, 1999.

DUBEY, J. P. Taxonomy of *Sarcocystis* and other Coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, p. 778-782, 1977.

DUBEY, J. P. *Sarcocystis* and other coccidia in foxes and other wild carnivores from Montana. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 181, n. 11, p. 1270-1271, 1982.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in cats. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 16, n. 4, p. 12-45, 1986.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2010. 440 p.

DUBEY, J. P.; FAYER, R. Development of *Isopora bigemina* in dogs and other mammals. **Parasitology**, London, v. 73, p. 371-380, 1976.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 33, p. 807-819, 2003.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals —The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C. Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 33, p. 1437-1453, 2003.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002b.

DUBEY, J. P. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 1107-1108, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 93, p. 60-64, 2007.

DUBEY, J. P. et al. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, p. 67-71, 2004.

DUBEY, J. P. et al. *Sarcocystis felis* spp. n. (Protozoa: Sarcocystidae) from the bobcat (*Felis rufus*). **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Washington DC, v. 59, p. 227-229, 1992.

DUBEY, J. P. et al. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, p. 66-69, 2002a.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, London, v. 115, p. 9-14, 1997.

DUBEY, J. P. et al. Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodoni* n.sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent *Akodon montensis* in Brazil. **Parassitologia**, Roma, v. 45, p. 61-70, 2003.

DUBEY, J. P. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from Animals in Durango, Mexico. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, n. 2, p. 319-322, 2009.

DUBEY, J. P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 5, p. 723-729, 1995.

DUNNUM, J. L.; SALAZAR-BRAVO, J. Molecular systematics, taxonomy and biogeography of the genus *Cavia* (Rodentia: Caviidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 376-388, 2010.

ELLIS, J. T. et al. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 64, p. 303-311, 1994.

ELLIS, J. T. et al. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, London, v. 118, p. 357-362, 1999.

ERNST, J. V. et al. *Besnoitia jellisoni* (Sporozoa: Toxoplasmea) in rodents from Utah and California. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.54, n.3, p. 545-549, 1968.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERNANDES, F. A. et al. The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 67, p. 839-847, 2007.

FERROGLIO, E. et al. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, p. 346-349, 2007.

FRANZEN, C. et al. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isoospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. **Parasitology Research**, Berlin, v. 86, p. 669-676, 2000.

FREITAS, T. R. O. et al. An endemic new species of tuco-tuco, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 93, n. 5, p. 1355-1367, 2012.

FRENKEL, J. K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 63, p. 611-628, 1977.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. *Hammondia hammondi* gen. nov., sp. nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 46, p. 3-12, 1975.

FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. **Parasitology Research**, Berlin, v. 91, p. 384-389, 2003.

FRENKEL, J. K. et al. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 458-468, 1995.

FREYGANG, C. C.; MARINHO, J. R.; FREITAS, T. R. O. New karyotypes and some considerations about the chromosomal diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul. **Genetica**, Gravenhage, v. 121, p. 125-132, 2004.

FUEHRER, H. P.; BLÖSCHL, I.; SIEHS, C. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles

(*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 469-479, 2010.

FURNARI, N. **Corte intra e interespecifica em cobaias (*Cavia porcellus*) e preás (*Cavia aperea*)**. 2006. 148 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GARCÍA, C. M. E. et al. Microvertebrados depredados por *Leopardus pajeros* (Carnivora: Felidae) en el sur de la Provincia de Mendoza, Argentina. **Mastozoología Neotropical**, Mendoza, v. 16, n. 2, p. 455-457, 2009.

GERASIMCHIK, V. A. The parasite fauna of silver-black foxes (*Vulpes fulvus*) on fur farms of the Republic of Belarus. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Agrarian Sciences**, v. 3, p. 79-83, 2005.

GERASIMCHIK, V. A. Epizootology of isosporosis and nematodosis of polar foxes in the fur farms of the Republic of Belarus. **Epizootiology, Immunology, Pharmacology and Sanitation**, v. 1, p. 7-10, 2006.

GHIMIRE, T. R. Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin; 1903. **International Journal of Life Science**, Kathmandu, v. 4, p. 26-47, 2010.

GIBSON, A. K. et al. Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii*-infected marine sentinel species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001142.

GILLIS, K. D. et al. Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis catus*). **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 33, p. 877-883, 2003.

GILOT-FROMONT, E. et al. The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. In: DJURKOVIĆ, O. D. editor. **Toxoplasmosis - Recent Advances**. 2012. ISBN: 978-953-51-0746-0, InTech, DOI: 10.5772/48233. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis-recent-advances/the-life-cycle-of-toxoplasma-gondii-in-the-natural-environment>>. Acesso em: 02 nov. 2012.

GJERDE, B. Shedding of *Hammondia heydorni*-like oocysts by foxes fed muscular tissue of reindeer (*Rangifer tarandus*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 24, p. 241-243, 1983.

GJERDE, B.; DAHLGREN, S. S. *Hammondia truffittae* n. comb. of foxes (*Vulpes* spp.): biological and molecular characteristics and differentiation from *Hammondia heydorni* of dogs. **Parasitology**, London, v. 138, p. 303-321, 2011.

GOLDBY, F.; KACKER, G. N. A survey of the pyramidal system in the coypus rat, *Myocastur coypus*. **Journal of Anatomy**, London, v. 97, p. 517-531, 1963.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 247-252, 2006.

GREINER, E. C. et al. *Sarcocystis* spp. in muscles of free-ranging Florida panthers and cougars (*Felis concolor*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 25, p. 623-628, 1989.

GRESSLER, L. T. et al. Gastrointestinal parasites of cavy (*Cavia aperea aperea*) in Southern Brazil. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 89, p. 206-208, 2010a.

GRESSLER, L. T. et al. New serovars of *Leptospira interrogans* in cavy (*Cavia aperea*). **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 19, p. 119-120, 2010b.

GUICHÓN, M. L.; DONCASTER, C. P.; CASSINI, M. H. Population structure of coypus (*Myocastor coypus*) in their region of origin and comparison with introduced populations. **Journal of Zoology**, London, v. 261, p. 265-272, 2003.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D. et al. Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 19-28, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Londres, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERRMANN, D. C. et al. *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: Seroprevalence and genotypes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, p. 78– 85, 2012.

HEYDORN, A. O.; MEHLHORN, H. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, p. 174-184, 2002.

HOFFMAN, L. C. The yield and nutritional value of meat from African ungulates, camelidae, rodents, ratites and reptiles. **Meat Science**, Barking, v. 80, p. 94-100, 2008.

HOLMES, R. G.; ILLMAN, O.; BEVERLEY, J. K. Toxoplasmosis in coypus. **The Veterinary Record**, London, v. 101, p. 74-75, 1977.

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

HUANG, C-C. et al. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, London, v. 35, p. 283-290, 2004.

HUGHES, J. M. et al. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, London, v. 132, p. 29-36, 2006.

IHERING, R. **Da vida dos nossos animais**. Sao Leopoldo, RS: Editora Rotermond, 1967. 320 p.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Red List of Threatened Species**. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 14 abr. 2013.

JENKINS, M. C. et al. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 161-165, 2007.

JITTAPALAPONG, S. et al. Toxoplasmosis in Rodents: Ecological Survey and First Evidences in Thailand. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 11, p. 231-237, 2011.

KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, n. 9, p. 2980-2992, 2005.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. *Toxoplasma* – safe meat: close to reality?. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 18-22, 2008.

KINSEL, M. J. et al. Gastric spiral bacteria and intramuscular *Sarcocysts* in African lions from Namibia. **The Journal of Wildlife Diseases**, Oxford, v. 34, p. 317-324, 1998.

KLUGE, J. P. Trichinosis and sarcosporidiosis in a puma. **Bulletin of the Wildlife Diseases Association**, Ames, Iowa, v. 3, p. 110-111, 1967.

KRÜGER, C. P. **Artrópodes e Helmintos parasitas de *Cavia aperea* Exerleben, 1777 (Rodentia: Caviidae) no sul do Brasil**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

LEHMANN, T. et al. 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. et al. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington DC, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

LEVINE N. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2nd ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Company Editors, 1973.

LEVINE, N. D. *Erhardorina* n. g., *Ascogregarina polynesiensis* n. sp., *Eimeria golemanskii* n. sp., *Isospora tamariscini* n. sp., *Gregarina kazumii* n. nom., new combinations and emendations in the names of apicomplexan protozoa. **Journal of Protozoology**, New York, v. 32, p. 359–363, 1985.

LEVINE, N. D.; IVENS, V. *Isospora* species in the dog. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 51, p. 859-864, 1965.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 82, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D. S. et al. Development of *Sarcocystis falcatula* in cell cultures demonstrates that it is different from *Sarcocystis neurona*. **Parasitology**, London, v. 118, p. 227-233, 1999.

LUCAS, K. **Brazilian guinea pig (*Cavia aperea*)**. 2013. Disponível em: <<http://www.arkive.org/brazilian-guinea-pig/cavia-aperea/image-G42787.html>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

LUNA, F.; ANTENUCCI, C. D.; BOZINOVIC, F. Comparative Energetics of the Subterranean *Ctenomys* Rodents: Breaking Patterns. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 82, n. 3, p. 226-235, 2009.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 84, p. 983-991, 1998.

MARTINO, P. E. et al. Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). **Helminthologia**, London, v. 49, n. 3, p. 164-168, 2012.

MARTINO, P. et al. A mortality survey of free range nutria (*Myocastor coypus*). **European Journal of Wildlife Research**, Berlin, v. 54, p. 293-297, 2008.

MASON, R. W. The discovery of *Besnoitia wallacei* in Australia and the identification of a free-living intermediate host. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 61, p. 173-178, 1980.

MEDINA-ESPARZA, L. et al. Frequency of infection by *Neospora caninum* in wild rodents associated with dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, p. 11-14, 2013.

MEHLHORN, H. et al. Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, p. 861-868, 2009.

MESSARITAKIS, I. et al. Prevalent Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Pregnant Women and Patients from Crete and Cyprus. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 2, p. 205-209, 2008.

MILLÁN, J. et al. Large-scale serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in free-living carnivores in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 241-245, 2012.

MILLER, M. A. et al. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 4, p. 816-822, 2001.

MODRÝ, D.; VOTÝPKA, J.; SVOBODOVÁ, M. Note on the taxonomy of *Frenkelia microti* (Findlay & Middleton; 1934) (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Systematic Parasitology**, The Hague, v. 58, n. 3, p. 185-187, 2004.

MOHAMMED, O. B. et al. *Hammondia heydorni* from the Arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, p. 535-539, 2003.

MONTEIRO, R. M. et al. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 235-238, 2008.

MONTEIRO, R. M. et al. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, London, v. 134, p. 1195-1203, 2007.

MORA, M. S. et al. Phylogeographical structure in the subterranean Tuco-Tuco *Ctenomys Talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): Contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3453-3465, 2007.

MORRISON, D. A. et al. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 34, p. 501-514, 2004.

MOSALLANEJAD, B. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Wild Rats (*Rattus rattus*) in Ahvaz District, Southwestern Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Ahvaz, v. 5, p. 332-335, 2012.

MURADIAN, V. et al. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 98, p. 128-134, 2012.

NARDONI, S. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Myocastor coypus* in a protected Italian wetland. **Parasites and Vectors**, London, v. 4, p. 240-244, 2011.

NEWSON, R. M.; HOLMES, R. G. Some ectoparasites of the coypus (*Myocastor coypus*) in Eastern England. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 37, p. 471-481, 1968.

NOVISKI, P. T. **Tiny tuco-tuco (Ctenomys minutus)**. 2013. Disponível em: <<http://www.arkive.org/tiny-tuco-tuco/ctenomys-minutus/image-G101578.html>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

NUKERBAEVA, K. K.; SVANBAEV, S. K. Koksidii pushnykh zveri v Kazakhstane. Coccidia of fur-bearing mammals in Kazakhstan. **Vestnik Sel'skokhozyaistvennoi Nauki Kazakhstana**, v. 12, p. 50-54, 1973.

ODENING, K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, The Hague, v. 41, p. 209-233, 1998.

PAGLIA, A. P. et al. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals**. 2nd ed. Arlington, VA, USA: Conservation International, 2012. n. 6. 76 p.

PALACIOS, R. **Biología, zoología: guía de campo para la identificación de carnívoros cordilleranos**. Córdoba: el autor, 2007. 40 p.

PATTON, S.; RABINOVITZ, A. R. Parasites of wild felidae in Thailand: a coproscopical survey. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 30, p. 472-475, 1994.

PAVLÁSEK, I.; KOZAKIEWICZ, B. Coypus (*Myocastor coypus*) as a new host of *Crytosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Folia Parasitologica**, Praha, v. 38, p. 90-90, 1991.



- PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 38, p. 561-569, 2008.
- PEREIRA, J. A.; WALKERA, R. S.; NOVARO, A. J. Effects of livestock on the feeding and spatial ecology of Geoffroy's cat. **Journal of Arid Environments**, London, v. 76, p. 36-42, 2012.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, Vilnius Mokslas, v. 58, p. 45-58, 2012.
- PRAKAS, P. et al. Identification of *Sarcocystis columbae* in wood pigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. **Veterinarija ir Zootechnika**, Kaunas, v. 55, p. 33-39, 2011.
- RAGOZO, A. M. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 94, n.6, p.1259-1263, 2008.
- RAU, J. R.; JIMÉNEZ, J. E. Diet of Puma (*Puma concolor*, Carnivora: Felidae) in Coastal and Andean Ranges of Southern Chile. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 201-205, 2010.
- REIG, O. A. et al. An overview of evolution, systematics, population and speciation in *Ctenomys*. In: NEVO, E.; REIG, O. A.; LISS, A. R. **Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels**. New York, 1990, p. 71-96.
- REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. Londrina, Brasil: Edifurb, 2006. 439 p.
- REPERANT, L. A. et al. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. **Parasitology**, London, v. 136, p. 329-337, 2009.
- RINALDI, A. R. **Dieta de pequenos felinos silvestres (Carnivora, Felidae), em área antropizada de Mata Atlântica de interior, Alto Rio Paraná, Paraná, Brasil**. 2010. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- ROCHA-MENDES, F. et al. Feeding ecology of carnivores (Mammalia: Carnivora) in Atlantic Forest remnants, Southern Brazil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 21-30, 2010.
- ROSSIN, M. A.; MALIZIA, A. I. Relationship between helminth parasites and demographic attributes of a population of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 1268-1270, 2002.
- ROSSIN, M. A.; MALIZIA, A. I. Redescription of *Trichuris pampeana* (Nematoda: Trichuridae) from the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum* Thomas, 1898 (Rodentia: Octodontidae). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, p. 127-130, 2005.
- ROSSIN, A.; MALIZIA, A. I.; DENEGRI, G. M. The role of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) in the life cycle of *Taenia taeniaeformis* (Cestoda: Taeniidae) in urban environments. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, p. 27-33, 2004.

- ROSSIN, M. A.; TIMI, J. T.; MALIZIA, A. I. A new species of *Trichostrongylus* (Nematoda, Trichostrongyloidea) parasitizing the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae) from Mar de Cobo, Argentina. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 51, p. 286-289, 2006a.
- ROSSIN, M. A.; TIMI, J. T.; MALIZIA, A. I. New Pudicinae (Trichostrongylinea, Heligmosomoidea), *Pudica ctenomydis* n. sp. parasite of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 55, p. 83-87, 2006b.
- ROSSIN, M. A.; VARELA, G.; TIMI, J. T. *Strongyloides myopotami* in ctenomyid rodents: Transition from semi-aquatic to subterranean life cycle. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 54, p. 257-262, 2009.
- ROSSIN, M. A. et al. Causes of inter-individual variation in reproductive strategies of the parasitic nematode *Graphidioides subterraneus*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, p. 335-339, 2005.
- ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here?. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 439-440, 2005.
- SAADOUN, A.; CABRERA, M. C. A review of the nutritional content and technological parameters of indigenous sources of meat in South America. **Meat Science**, Barking, v. 80, p. 570-581, 2008.
- SALVADOR, C. H.; FERNANDEZ, F. A. S. Population dynamics and conservation status of the insular cavy *Cavia Intermedia* (Rodentia: Caviidae). **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 89, n. 3, p. 721-729, 2008.
- SCHARES, G. et al. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, Berlin, v. 87, p. 808-816, 2001.
- SCHARES, G. et al. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, p. 44-52, 2002.
- SCHARES, G. et al. Characterization of a repetitive DNA fragment in *Hammondia hammondi* and its utility for the specific differentiation of *H. hammondi* from *Toxoplasma gondii* by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 244-251, 2008.
- SCHARES, G. et al. *Hammondia*-like parasite from the European fox (*Vulpes vulpes*) forms biologically viable tissue cysts in cell culture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 33, p. 229-234, 2003.
- SCHRENZEL, M. D. et al. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, p. 635-647, 2005.
- SCHUSTER, R. K. et al. The parasite fauna of stray domestic cats (*Felis catus*) in Dubai, United Arab Emirates. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, p. 125-134, 2009.

SILVA, A. S. et al. Parasitismo por *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. e *Cystoisospora* sp. em nutria (*Myocastor coypus*) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Estudos de Biologia**, Porto Alegre, v. 29, p. 107-110, 2007.

SILVA, M. S. et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 156-159, 2009.

ŠLAPETA, J. P. et al. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, London, v. 163, p. 147-154, 2002.

SOARES, R. M. et al. Crab-eating (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 46-50, 2009.

SOARES, R. M. et al. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a hemingnested-PCR (hn PCR-AP 10) based on the *Hammondia heydorni* RAPD fragment AP 10. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 168-172, 2011.

SOGORB, S. F. et al. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 314-320, 1972.

SONE, K. et al. Fetal growth and development of the coypu (*Myocastor coypus*): Prenatal growth, tooth eruption, and cranial ossification. **Mammalian Biology**, Jena, v. 73, p. 350-357, 2007.

SOUCHARD, J. F. Coypu (*Myocastor coypus*). 2013. Disponível em: <<http://www.arkive.org/coypu/myocastor-coypus/image-G74525.html>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

SOUSA, K. S.; BAGER, A. Feeding habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, Jena, v. 73, p. 303-308, 2008.

SREEKUMAR, C. et al. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 107, p. 65-71, 2004.

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. **The International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 36, p. 841-848, 2006.

SURIANO, D. M.; NAVONE, G. T. Three new species of the genus *Trichuris* Roederer, 1761 (Nematoda: Trichuridae) from Cricetidae and Octodontidae rodents in Argentina. **Research and Review in Parasitology**, Madrid, v. 1, p. 39-46, 1994.

TADROS, W.; LAARMAN, J. J. *Sarcocystis* and related coccidian parasites: a brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their life cycles and a new proposal for their classification. **Acta Leidensia**, Leiden, v. 44, p. 1-107, 1976.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TAMMONE, M. N.; LACEY, E. A.; RELVA, M. A. Habitat use by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*): specialization, variation, and sociality. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 93, n. 6, p. 1409-1419, 2012.

TENTER, A. M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 25, p. 1311-1330, 1995.

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, London, v. 39, p. 69-139, 1997.

TENTER, A. M. et al. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, New York, v. 32, p. 595-616, 2002.

TEUTSCH, S. M. et al. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 300, p. 695-699, 1979.

THOMASSON, D. et al. Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. **Parasitology**, London, v. 138, p. 1117-1123, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIFFITT, M. J. Observations on the oocysts of coccidia found in the faeces of carnivores. **Protozoology**, London, v. 3, p. 65-74, 1927. Supplement to Journal of Helminthology.

TRUPPEL, J. H. et al. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 376-379, 2010b.

TRUPPEL, J. H. et al. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 141-146, 2010a.

VERZI, H. D.; OLIVARES, A. I.; MORGAN, C. C. The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, north western Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). **Mammalian Biology**, Jena, v. 75, p. 243-252, 2010.

WALKER, R. S. et al. Diets of three species of Andean carnivores in high-altitude deserts of Argentina. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 88, n. 2, p. 519-525, 2007.

WASMUTH, J. et al. The origins of apicomplexan sequence innovation. **Genome Research**, v. 19, p. 1202-1213, 2009.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3rd ed. Baltimore, D. C.: Johns Hopkins University Press, 2005. Disponível em: <<http://www.press.jhu.edu>>. Acesso em: 4 abr. 2013.

YAI, L. E. O. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 94, p. 766, 2008.

YAI, L. E. O. et al. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 332-337, 2009.

YINGGUANG, Z. et al. High Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Microtus fortis* by Semi-nested PCR from Jilin Province, Northeastern China. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, 2012. In Press. doi: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-3195.1>.



(conclusão)

|    |         |                                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----|---------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 49 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 50 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 51 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X | X | X |   | X | X |
| 52 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X | X | X |   | X | X |
| 53 | Mc      | Aeroporto Int. Salgado Filho, POA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 54 | Mc      | Aeroporto Int. Salgado Filho, POA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 55 | C spp.  | Dom Pedrito                       | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 56 | C spp.  | Maratá                            | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 57 | C spp.  | BR 290 Pelotas-Bagé               | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 58 | C spp.  | BR 116 Pelotas-Jaguarão           | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 59 | C spp.  | BR 116 Pelotas-Jaguarão           | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 60 | C spp.  | BR 116 Pelotas-Jaguarão           | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 61 | C spp.  | BR 290 Pelotas-Bagé               | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 62 | C spp.  | BR 293 Pelotas-Bagé               | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 63 | C spp.  | BR 116 Pelotas-Jaguarão           | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 64 | C spp.  | BR 116 Pelotas-Jaguarão           | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 65 | C spp.  | Dom Pedrito                       | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 66 | C spp.  | Dom Pedrito                       | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 67 | C spp.  | Minas de Leão                     | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 68 | Ct spp. | Arroio grande                     | X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 69 | Ct spp. | Tramandai, RS                     |   |   | X | X |   |   | X | X |   |
| 70 | Ct spp. | Pelotas, RS                       | X |   | X | X | X |   | X | X |   |
| 71 | Ct spp. | Minas do Leão, RS                 | X |   | X | X | X |   | X | X |   |
| 72 | Ct spp. | São Gabriel, RS                   | X |   | X | X | X |   | X | X |   |
| 73 | Ct spp. | Pelotas, RS                       | X |   | X | X | X |   | X | X |   |
| 74 | Ct spp. | Manoel Viana, RS                  | X |   | X | X | X |   | X | X |   |
| 75 | C spp.  | Ilha dos Marinheiros              | X | X | X | X |   | X | X | X | X |

**C spp:** *Cavia* spp.; **Ct spp:** *Ctenomys* spp.; **Mc:** *M. coypus*; **Me:** músculo esquelético de quadríceps femoral; **Lf:** linfonodo; **R:** rim; **F:** fígado; **B:** baço; **D:** diafragma; **P:** pulmão; **Co:** coração; **Li:** língua; **Ce:** cérebro.

**APÊNDICE B** - Distribuição de amostras positivas na *n*-PCR-ITS-1 para as subfamílias Sarcocystinae, Toxoplasmatinae e outros coccídios detectados em tecidos de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.

| Nº | Espécie                 | Procedência          | Sexo | Ano  | Tecido | Sarcocystinae | Toxoplasmatinae | Outros |
|----|-------------------------|----------------------|------|------|--------|---------------|-----------------|--------|
| 5  | <i>Ctenomys</i> spp     | SD                   | SD   | SD   | Me     | X             |                 |        |
| 8  | <i>Ctenomys</i> spp     | SD                   | SD   | SD   | Me     |               |                 | X      |
|    |                         |                      |      |      | Co     |               |                 | X      |
|    |                         |                      |      |      | Li     |               |                 | X      |
| 12 | <i>Ctenomys</i> spp     | SD                   | M    | SD   | Li     |               |                 | X      |
| 13 | <i>Myocastor coypus</i> | Porto Alegre         | M    | SD   | Me     | X             |                 |        |
| 16 | <i>Ctenomys</i> spp     | Manoel Viana         | SD   | 2010 | Me     |               |                 | X      |
| 29 | <i>Cavia</i> spp        | Sapiranga            | M    | 2001 | Me     | X             |                 |        |
| 36 | <i>Myocastor coypus</i> | Viamão               | M    | 2007 | Me     |               | X               |        |
|    |                         |                      |      |      | D      |               | X               |        |
| 42 | <i>Ctenomys</i> spp     | Taim                 | SD   | 2010 | Fi     |               | X               |        |
| 46 | <i>Myocastor coypus</i> | Viamão               | M    | 2007 | Me     | X             |                 |        |
| 48 | <i>Cavia</i> spp        | Ilha dos Marinheiros | M    | 2006 | Me     |               | X               |        |
| 49 | <i>Cavia</i> spp        | Ilha dos Marinheiros | F    | 2006 | Ce     |               | X               |        |
| 52 | <i>Cavia</i> spp        | Ilha dos Marinheiros | M    | 2006 | Ce     |               |                 | X      |
| 53 | <i>Myocastor coypus</i> | Porto Alegre         | M    | 2010 | Me     | X             |                 |        |
|    |                         |                      |      |      | Co     |               | X               |        |
| 54 | <i>Myocastor coypus</i> | Porto Alegre         | M    | 2010 | Me     |               |                 | X      |
| 57 | <i>Cavia</i> spp.       | Bagé                 | F    | 2008 | Me     |               | X               |        |
| 59 | <i>Cavia</i> spp.       | Jaguarão             | F    | 2008 | Me     |               |                 | X      |
| 60 | <i>Cavia</i> spp.       | Jaguarão             | M    | 2008 | Me     |               |                 | X      |
| 62 | <i>Cavia</i> spp.       | Bagé                 | SD   | 2008 | Me     |               |                 | X      |
| 63 | <i>Cavia</i> spp.       | Jaguarão             | F    | 2008 | Me     | X             |                 |        |
| 64 | <i>Cavia</i> spp.       | Jaguarão             | SD   | 2008 | Me     |               | X               | X      |
| 66 | <i>Cavia</i> spp.       | Dom Pedrito          | F    | 2008 | Me     |               |                 | X      |
| 68 | <i>Ctenomys</i> spp.    | Arroio Grande        | F    | 2005 | Me     |               | X               | X      |
| 82 | <i>Ctenomys</i> spp.    | Pelotas              | SD   | 2011 | Me     |               |                 | X      |
| 86 | <i>Ctenomys</i> spp.    | Manoel Viana         | SD   | 2010 | Me     |               |                 | X      |
|    |                         |                      |      |      | Fi     |               | X               |        |
|    |                         |                      |      |      | P      |               | X               |        |
|    |                         |                      |      |      | Co     |               | X               |        |

Nota: Abreviações: **Nº**: número; **SD**: sem dado; **M**: macho; **F**: fêmea; **Me**: musculatura esquelética de quadríceps femoral; **Co**: coração; **P**: pulmão; **Fi**: fígado; **Li**: músculo de língua; **D**: diafragma; **Ce**: cérebro.

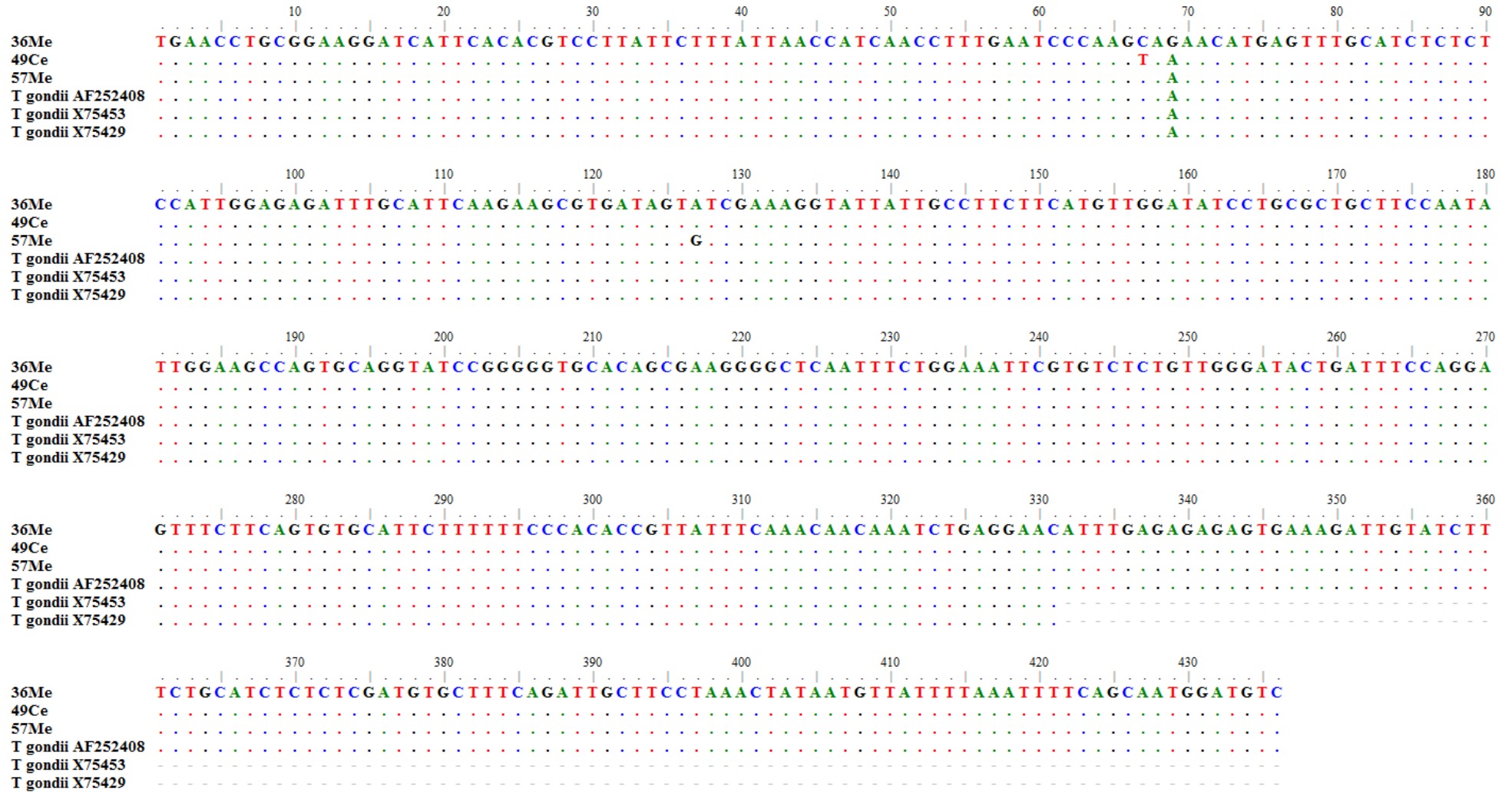


**APÊNDICE C** - Número de amostras teciduais examinadas (**E**), positivas (**P**) e porcentagem de positivas (%) para as subfamílias Toxoplasmatinae, Sarcocystidae e outros coccídios distribuídas por gênero de roedores silvestres do Rio Grande do Sul.

| Coccídio<br>Espécie     | Me        |           |             | Lf        |          |            | R         |          |            | F         |          |            | B         |          |            | D         |          |            | P         |          |            | Co        |          |            | Li        |          |            | Ce        |          |            |
|-------------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|-----------|----------|------------|
|                         | E         | P         | %           | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          | E         | P        | %          |
| <b>Toxoplasmatinae</b>  |           |           |             |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |
| <i>Cavia</i> spp.       | 29        | 2         | 6,9         | 6         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 11        | 0        | 0,0        | 5         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 14        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 1        | 8,3        |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 27        | 0         | 0,0         | 0         | 0        | 0,0        | 19        | 0        | 0,0        | 19        | 2        | 10,5       | 16        | 0        | 0,0        | 0         | 0        | 0,0        | 28        | 1        | 3,6        | 28        | 1        | 3,6        | 10        | 0        | 0,0        | 10        | 0        | 0,0        |
| <i>Myocastor coypus</i> | 13        | 1         | 7,7         | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 1        | 8,3        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 1        | 8,3        | 8         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        |
| <b>Subtotal</b>         | <b>69</b> | <b>3</b>  | <b>4,3</b>  | <b>14</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>40</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>43</b> | <b>2</b> | <b>4,6</b> | <b>33</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>20</b> | <b>1</b> | <b>5,0</b> | <b>53</b> | <b>1</b> | <b>1,9</b> | <b>54</b> | <b>2</b> | <b>3,7</b> | <b>30</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>30</b> | <b>1</b> | <b>3,3</b> |
| <b>Sarcocystinae</b>    |           |           |             |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |
| <i>Cavia</i> spp.       | 29        | 2         | 6,9         | 6         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 11        | 0        | 0,0        | 5         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 14        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 27        | 1         | 3,7         | 0         | 0        | 0,0        | 19        | 0        | 0,0        | 19        | 0        | 0,0        | 16        | 0        | 0,0        | 0         | 0        | 0,0        | 28        | 0        | 0,0        | 28        | 0        | 0,0        | 10        | 0        | 0,0        | 10        | 0        | 0,0        |
| <i>Myocartor coypus</i> | 13        | 3         | 23,1        | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        |
| <b>Subtotal</b>         | <b>69</b> | <b>6</b>  | <b>8,6</b>  | <b>14</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>40</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>43</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>33</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>20</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>53</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>54</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>30</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>30</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> |
| <b>Outros coccídios</b> |           |           |             |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |           |          |            |
| <i>Cavia</i> spp.       | 29        | 5         | 17,2        | 6         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 11        | 0        | 0,0        | 5         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 14        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 1        | 8,3        |
| <i>Ctenomys</i> spp.    | 27        | 5         | 18,5        | 0         | 0        | 0,0        | 19        | 0        | 0,0        | 19        | 0        | 0,0        | 16        | 0        | 0,0        | 0         | 0        | 0,0        | 28        | 0        | 0,0        | 28        | 1        | 3,6        | 10        | 2        | 20,0       | 10        | 0        | 0,0        |
| <i>Myocastor coypus</i> | 13        | 1         | 7,7         | 8         | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 13        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 1        | 8,3        | 12        | 0        | 0,0        | 12        | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        | 8         | 0        | 0,0        |
| <b>Subtotal</b>         | <b>69</b> | <b>11</b> | <b>15,7</b> | <b>14</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>40</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>43</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>33</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>20</b> | <b>1</b> | <b>5,0</b> | <b>53</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>54</b> | <b>1</b> | <b>1,8</b> | <b>30</b> | <b>2</b> | <b>6,7</b> | <b>30</b> | <b>1</b> | <b>3,3</b> |
| <b>Total</b>            | <b>69</b> | <b>20</b> | <b>29,0</b> | <b>14</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>40</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>43</b> | <b>2</b> | <b>4,7</b> | <b>33</b> | <b>0</b> | <b>0,0</b> | <b>20</b> | <b>1</b> | <b>5,0</b> | <b>53</b> | <b>1</b> | <b>1,9</b> | <b>54</b> | <b>3</b> | <b>5,6</b> | <b>30</b> | <b>2</b> | <b>6,7</b> | <b>30</b> | <b>2</b> | <b>6,7</b> |

**Me:** musculatura esquelética de quadríceps femoral; **Lf:** linfonodo; **R:** rim; **F:** fígado; **B:** baço; **D:** diafragma; **Co:** coração; **P:** pulmão; **Li:** língua; **Ce:** cérebro.

ANEXO A - Alinhamento de sequências ITS-1 para *Toxoplasma gondii* produzidas neste estudo e de referência.



ANEXO B - Alinhamento de sequências ITS-1 para *Hammondia triffittae* produzidas neste estudo e de referência.

