

ALESSANDRA LOUREIRO MORALES DOS SANTOS

**Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre:** análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular

São Paulo

2022

ALESSANDRA LOUREIRO MORALES DOS SANTOS

**Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre:** análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Patologia

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias

São Paulo

2022

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Alessandra Loureiro Morales dos

Título: **Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre:** análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

SANTOS, A.L.M. **Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre:** análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular. 2022. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada por um protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). O *T. gondii* apresenta distribuição ubíqua, e tem o potencial de infectar células de animais homeotérmicos, os quais, comumente permanecem cronicamente infectados e assintomáticos. No entanto, estudos centrados em primatas neotropicais (PNT) mantidos sob cuidados humanos em cativeiro apontam que estes animais, classicamente, cursam com um quadro agudo e fatal de toxoplasmose. No presente trabalho foram selecionadas amostras de PNTs disponíveis no arquivo do Instituto Adolfo Lutz (IAL), que constavam de diagnóstico prévio sugestivo ou confirmatório de toxoplasmose sistêmica. As amostras, provenientes de vários estados da federação, foram enviadas ao IAL devido ao programa de vigilância de febre amarela, uma vez que o IAL é referência macrorregional para diagnóstico desta enfermidade. Assim, 61 PNTs, recebidos no período entre janeiro de 2015 a junho de 2020, primordialmente de vida livre, das famílias Atelidae e Cebidae (gêneros *Brachyteles arachnoides*, *Alouatta* spp e *Callithrix* spp) foram estudados epidemiologicamente e as amostras foram submetidas às análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular. Na análise histopatológica, foram avaliados sistematicamente os seguintes órgãos e tecidos: fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo. A análise imuno-histoquímica teve como objetivo a confirmação da presença de antígeno, realizada principalmente em fígado e baço. A análise molecular, realizada a partir da extração de material genético principalmente de tecido hepático, englobou as técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real e de genotipagem por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Houve maior predomínio de animais da família Cebidae (61%) em relação à família Atelidae (36%). Os PNTs de vida livre majoritariamente foram encontrados em regiões antropizadas, englobando zona urbana ou rural (91%). Os resultados histopatológicos mais frequentes foram hepatite necrotizante multifocal aleatória (100%) majoritariamente mista (98%); esplenite necrotizante (96%) predominantemente aguda (85%); e pneumonia intersticial

necrotizante mista multifocal (95%), com congestão (93%), edema (93%) e/ou hemorragia alveolar (83%). A imuno-histoquímica foi positiva em 100% dos casos, enquanto que a PCR em tempo real foi positiva em 97% dos casos. A imuno-histoquímica foi graduada de acordo com a quantidade de formas parasitárias imunomarcadas, tanto em fígado quanto em baço, apresentando concordância estatisticamente significativa em tecido hepático em relação a quantidade de ciclos (Cq). A genotipagem apresentou tipificação de pelo menos 10/11 marcadores em 22 amostras, e permitiu a detecção de 21 potenciais novos genótipos, somada a identificação de um genótipo previamente indexado (ToxoDB #97) em um *Callithrix* spp. de vida livre, de zona urbana do município de São José do Rio Preto/SP; tal genótipo havia sido previamente descrito vinculado a ocorrência de toxoplasmose severa aguda fatal em humanos saudáveis residentes da região amazônica. Os resultados reforçam a divergência da susceptibilidade a toxoplasmose entre as famílias de PNTs e salientam a relevância do estudo da toxoplasmose em PNTs no contexto de saúde única.

Palavras-chave: Plátirinos. Patologia. Zoonoses. Protozoários. Saúde Única.

## ABSTRACT

SANTOS, A.L.M. **Retrospective study of toxoplasmosis in free-ranging neotropical primates:** histopathological, immunohistochemical and molecular analysis. 2022. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by an obligate intracellular protozoan, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). *T. gondii* has a ubiquitous distribution and has the potential to infect cells of homeothermic animals, which, commonly remain chronically infected and asymptomatic. However, studies focused on neotropical primates (NTPs) kept under human care in captivity indicate that these animals classically have an acute and fatal condition of toxoplasmosis. In the present study, samples of NTPs available in the archives of the Instituto Adolfo Lutz (IAL) were selected, which had a previous diagnosis suggestive or confirmatory of systemic toxoplasmosis. The samples, from different states of Brazil, were sent to the IAL due to the yellow fever surveillance program, since IAL is a macro-regional reference for the diagnosis of this disease. Thus, 61 NTPs, received in the period between January 2015 and June 2020, primarily about free-ranging NTPs from the Atelidae and Cebidae families (*Brachyteles arachnoides*, *Alouatta* spp and *Callithrix* spp genera) were epidemiologically studied, and the samples were submitted to histopathological, immunohistochemical, and molecular analyses. In the histopathological analysis, the following organs and tissues were systematically evaluated: liver, spleen, kidney, lung, heart, and brain. The immunohistochemical analysis aimed to confirm the presence of antigen, performed mainly in the liver and spleen. The molecular analysis, performed from the extraction of genetic material mainly from liver tissue, included the techniques of real-time polymerase chain reaction (PCR) and genotyping by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). There was a greater predominance of animals from the Cebidae family (61%) than the Atelidae family (36%). The free-ranging NTPs were mostly found in anthropized regions, encompassing urban or rural areas (91%). The most frequent histopathological findings were random multifocal necrotizing hepatitis (100%) mostly mixed (98%); necrotizing splenitis (96%) predominantly acute (85%); and multifocal mixed necrotizing interstitial pneumonia (95%), with congestion (93%), edema (93%) and/or alveolar hemorrhage (83%). Immunohistochemistry was positive in 100% of cases, while real-time PCR was positive in 97% of cases.

Immunohistochemistry was graded according to the number of immunostained parasites, both in the liver and spleen, showing statistically significant agreement in liver tissue to about the number of cycles (Cq). Genotyping showed typing of at least 10/11 markers in 22 samples, detecting 21 potential new genotypes, and a previously indexed genotype (ToxoDB #97) in a free-ranging *Callithrix* spp., from an urban area in the city of São José do Rio Preto/SP; such genotype had been previously described linked to the occurrence of severe acute fatal toxoplasmosis in healthy humans residing in the Amazon region. The results reinforce the divergence of susceptibility to toxoplasmosis among the families of NTPs and emphasize the relevance of the study of toxoplasmosis in NTPs in the context of One Health.

Keywords: Platyrrhini. Pathology. Zoonosis. Protozoan. One Health.