



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

**Toxoplasmose em primatas não humanos de vida
livre e cativo no Distrito Federal, Goiás, Mato
Grosso e Tocantins**

CAMILA FIRMINO DE ASSUNÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

**Toxoplasmose em primatas não humanos de vida
livre e cativo no Distrito Federal, Goiás, Mato
Grosso e Tocantins**

CAMILA FIRMINO DE ASSUNÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Orientador: Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro

PUBLICAÇÃO: 00/00/2020

BRASÍLIA

2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

**TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DE VIDA LIVRE E
CATIVEIRO NO DISTRITO FEDERAL, GOIÁS, MATO GROSSO E
TOCANTINS**

CAMILA FIRMINO DE ASSUNÇÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:

MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO (Doutor: PPGCA/UNB)

ORIENTADOR

LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO (Doutora: PPSA/UNB)

EXAMINADORA EXTERNA

GIANE REGINA PALUDO (Doutora: PPGCA/UNB)

EXAMINADORA INTERNA

Brasília, 17 de março de 2020.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ASSUNÇÃO, C.F. **Toxoplasmose em primatas não humanos de vida livre e cativoiro no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Tocantins.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Dissertação de Mestrado, 57 p., 2020.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa Dissertação de Mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

ASSUNÇÃO, C.F. Toxoplasmose em primatas não humanos de vida livre e cativoiro no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Tocantins.
Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Dissertação de Mestrado, 57 p., 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Primatas. 3. Imuno-histoquímica. 4. Hepatite necrotizante.

“Brilhe, sonhe, sorria. Vamos acender a noite. Nós brilhamos em nossos próprios caminhos”

Mikrokosmos, BTS

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão ao meu orientador Prof Márcio pela confiança, disponibilidade, paciência que me ensinaram que trabalhar duro gera resultados fortes.

À toda a equipe de pós-graduação do laboratório de patologia veterinária, em especial à Alexandra por sua paciência e dedicação exemplares, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível. À Tais ao Davi por seu auxílio nas etapas cruciais e à Fernanda pela organização e ajuda indispensáveis.

À Dra Sandra, por me ajudar nos momentos de crises e me mostrar um potencial que eu possuo e mereço aperfeiçoar, me auxiliando no meu crescimento pessoal e profissional.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, carinho e amor desmedidos que me ensinam todo dia a perseverar e batalhar pelo o que acredito. Você é o exemplo de resiliência em que me espelho.

Aos meus avós, por terem mais uma vez me acolhido nessa longa jornada e me apoiado em meus estudos. Vocês são preciosos para mim e espero tê-los comigo em novas vitórias.

À minha família, pela compreensão quanto à minha ausência e por torcerem por mim hoje e sempre. Eu estou longe, mas vocês sempre estão comigo.

Ao Lucas, por ter me acompanhado até onde foi possível e me ensinado a importância de seguir em frente mesmo quando as expectativas falham.

Aos meus amigos da Cobasi, em especial Marcos, Paulo, Reni e Mauricio por aturarem meus surtos e me apoiarem sempre que possível com muito carinho.

Aos meus amigos do Rio e CM, por sempre contarem comigo e me permitirem momentos especiais e inesquecíveis. São os presentes que a adolescência me deu e carrego sempre comigo, em especial à Kariny, Carol, Laura, Flávio e Bianca.

À equipe do NEPASC, por me ensinar cada vez mais como pessoas incríveis estão destinadas a realizar coisas incríveis e partilharem conhecimentos. Em especial, à Ana Paula, ao George, à Thamiris, ao Luiz e à Jéssica por compartilharem experiências tão

especiais. Agradecimento especial à Marcela, pela disposição e boa vontade em auxiliar os que necessitam.

Aos melhores amigos que alguém pode ter, os pugs, por terem acreditado em mim quando eu não acreditei, por me ouvirem, por me ensinarem que sem amor não se constrói nada que valha à pena e por me mostrarem que independente de tudo, o importante é estar com quem te faz feliz. Minha gratidão especial e enorme à Ana Paula, à Beatriz, à Ane, à Jéssica, à Amanda, à Flávia e ao Bryam por sempre estarem presentes no meu coração.

E a mim mesma, por acreditar na minha capacidade mesmo com a pouca experiência e por ter batalhado muito duro nessa jornada.

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Símbolos e Abreviações.....	vii
CAPÍTULO 1.....	8
1. Introdução.....	9
1.1. Objetivos Gerais.....	10
1.2. Objetivos Específicos.....	10
2. Revisão de Literatura.....	11
2.1. Primatas Neotropicais.....	11
2.2. Toxoplasmose em primatas.....	15
2.3. Gênero <i>Toxoplasma</i>	15
2.3.1. Ciclo do Parasita.....	16
2.3.2. Relação Parasita-Hospedeiro.....	19
2.4. Lesões Macroscópicas e Histopatológicas.....	19
2.4.1. Fígado.....	19
2.4.2. Baço.....	19
2.4.3. Pulmão.....	20
2.4.4. Lesões em demais órgãos.....	20
2.5. Vias de Infecção.....	20
2.6. Toxoplasmose em humanos e outros animais.....	20
2.7. Métodos Diagnósticos.....	21
3. Referências Bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 2.....	24
Resumo.....	30

Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Materiais e Métodos.....	34
3. Resultados.....	35
4. Discussão.....	37
5. Conclusão.....	40
Referências Bibliográficas.....	42
Anexo I	44
Anexo II	48

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii*. Este coccídeo possui a capacidade de infectar diversos hospedeiros endotérmicos, como humanos e primatas não humanos. A infecção por *Toxoplasma gondii* é branda e apresenta sinais clínicos inespecíficos em indivíduos imunocompetentes, no entanto, infecções em primatas do novo mundo apresentam caráter agudo com letalidade alta. O presente estudo trata da investigação de 38 casos de primatas do novo mundo de vida livre e de cativeiro com suspeita de toxoplasmose, provenientes do Distrito Federal e estados do Goiás, Tocantins e Mato Grosso. As amostras foram submetidas a exames histopatológicos e imuno-histoquímico com anti-*T.gondii* afim de possibilitar a visualização de taquizoítos e bradizoítos. Hepatite necrotizante, esplenite necrotizante e pneumonia intersticial foram os achados mais recorrentes nos casos examinados acompanhado de infiltrado inflamatório composto de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Não foi possível a determinação estatística de um órgão mais comprometido ou infectado pelos protozoários. Contudo, as análises qualitativas mostram danos maiores no fígado, porém visualização mais clara dos parasitas no baço. Os resultados comprovam uma alta susceptibilidade de primatas do novo mundo, sendo na região de estudo, o *Callithrix penicillata*, a espécie mais acometida.

Palavras chave: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Primatas. 3. Imuno-histoquímica. 4. Hepatite necrotizante.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by the mandatory intracellular protozoan, *Toxoplasma gondii*. This coccid has the ability to infect several endothermic hosts, such as humans and non-human primates. Infection by *Toxoplasma gondii* is mild and has nonspecific clinical signs in immunocompetent individuals, however, infections in primates of the new world have an acute character with high lethality. The present study deals with the investigation of 38 cases of wild new world primates, and captive ones suspected of toxoplasmosis, from the states of Distrito Federal, Goiás, Tocantins and Mato Grosso. The samples were submitted to histopathological and immunohistochemical exams with anti-*T.gondii* in order to allow the visualization of tachyzoites and bradyzoites. The lesions show a high degree of liver, spleen and lung damage in those individuals. Necrotizing hepatitis, necrotizing splenitis and interstitial pneumonia were the recurrent findings in the studied cases, along with inflammatory infiltrate consisting of neutrophils, macrophages and lymphocytes. It was not possible to determine statistically an organ more compromised or infected by protozoa, however, qualitative analysis showed greater damage to the liver and more severe infection in the spleen. The results prove the high susceptibility of new world primates, with *Callithrix penicillata* being the most affected species in the studied region.

Keywords: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Primates. 3. Immunohistochemistry. 4. Necrotizing hepatitis.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1. Esquema representativo da ultraestrutura encontrada por microscopia eletrônica do *T. gondii*. Fonte: BLACK, 2000..... 16

Figura 2. Ciclo de transmissão e hospedeiros intermediários e definitivos do protozoário *T.gondii*. Fonte: CDC, 2017..... 18

Capítulo 2:

Figura 1. Primata. Fígado. Áreas de necrose multifocal aleatórias. H&E [Bar= 250µm]..... 44

Figura 2. Primata. Fígado. Áreas de necrose multifocal, evidenciando macrófagos e neutrófilos íntegros e degenerados em meio aos cordões de hepatócitos. H&E [Bar= 50µm]..... 45

Figura 3. Primata. Pulmão. Cisto de *T. gondii* associado a espessamento de septos interalveolares e moderada inflamação intersticial linfoplasmocítica. H&E [Bar= 25 µm]..... 46

Figura 4. Primata. Fígado. Cisto de *T. gondii* marcado com anticorpo policlonal *anti-T. gondii*. Imunohistoquímica (IHQ). Bar: 25 µm..... 47

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

Tabela 1. Adaptação da tabela referente a Família, Gênero, Espécie e Subespécie de primatas do novo mundo. Fonte: SCHNEIDER, H. et al 2013..... 12

Capítulo 2.

Tabela 1. 35 casos de Toxoplasmose em PNH dos estados de GO, TO, MT e DF..... 48

Tabela 2. Lesões histopatológicas compatíveis com *Toxoplasma gondii*.em fígado, baço e pulmão..... 49

Tabela 3. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do fígado visando o diagnóstico da infecção por *T. gondii*..... 50

Tabela 4. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do baço visando o diagnóstico da infecção por *T. gondii*..... 50

Tabela 5. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do pulmão visando o diagnóstico da infecção por *T. gondii*..... 50

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACOES

CETAS – Centro de Triagem de Animais Silvestres

DIVAL – Secretaria de Vigilância Ambiental em Saúde

DF – Distrito Federal

Fig – Figura

GO – Goiás

HE – Hematoxilina-Eosina

IHQ – Imuno-histoquímica

Kg – Kilograma

LPV-UnB – Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília

M – Molar

MT – Mato Grosso

PA – Pureza Analítica

PBS – Solução Salina Tamponada de Fosfato

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

pH – Potencial Hidrogeniônico

PNM – Primatas do Novo Mundo

TO – Tocantins

VP – Vacúolo Parasitóforo

°C – Graus Celsius de Temperatura

µm – Micrometro

% - Porcentagem



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

BRASÍLIA

2020

1. Introdução:

A toxoplasmose é caracterizada como infecção pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, esse tipo de parasitismo é extremamente comum mundialmente, afetando diversas espécies de animais endotérmicos, incluindo humanos (DUBEY, 2004). O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, tendo como hospedeiro definitivo, os membros da família Felidae, sendo o gato doméstico muito importante para manutenção do ciclo urbano da toxoplasmose. Além disso, aves e diversos mamíferos participam do ciclo como hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 1998).

O *Toxoplasma gondii* pode ser transmitido através da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de felinos e pela ingestão de presas com cistos na musculatura. Além dessas formas, ainda pode ocorrer a transmissão por via congênita (DUBEY *et al.*, 1998).

Os primatas atuam no ciclo da toxoplasmose como hospedeiros intermediários. Existem diversos relatos de infecção por *T. gondii* mostrando susceptibilidade a lesões agudas e fatais em primatas do novo mundo, quando comparados a primatas do velho mundo (EPIPHANIO *et al.*, 2003; CEDILLO-PELÁEZ *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Porém, ainda permanece desconhecida a forma como esses animais se contaminam, visto que possuem hábitos arborícolas, o que dificulta o contato com o agente (EPIPHANIO *et al.*, 2003).

As infecções por *T. gondii* têm caráter sistêmico, causando, principalmente encefalites, pneumonia, hepatite e miocardite (EPIPHANIO *et al.*, 2003). Os sinais clínicos dependem dos órgãos mais afetados, porém costumam ser bastante inespecíficos. As lesões nos órgãos são normalmente visualizadas por meio de microscopia com coloração de hematoxilina-eosina (HE), porém a confirmação do agente é possível por meio de testes mais específicos, como a imuno-histoquímica (ZACHARY, 2013). Por se tratar de uma infecção sistêmica e devido à dificuldade de receber amostras suficientes e adequadas para processamento, o diagnóstico preciso post-mortem da toxoplasmose exige a avaliação histopatológica da maior quantidade de material biológico disponível, que seja compatível com padrões de lesão descritos anteriormente (ANDRADE *et al.*, 2007).

Os primatas exercem um papel fundamental como animais sentinelas de diversas zoonoses, podendo infecções agudas e fatais acarretarem riscos as espécies afetando a biodiversidade. O foco dessa revisão de literatura é esclarecer o ciclo da toxoplasmose relacionando com primatas do novo mundo.

1.1. Objetivos gerais

Investigar, a partir de técnicas histopatológicas e imuno-deteção, a ocorrência de infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos de vida livre e de cativeiro do Distrito Federal e estados do Goiás, Mato Grosso e Tocantins.

1.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar os casos suspeitos de toxoplasmose a partir de alterações histológicas compatíveis com infecção por *Toxoplasma gondii*.
- Determinar a ocorrência de formas infectantes, como taquizoítos e bradizoítos, por meio de técnicas como a coloração por Hematoxilina-eosina e estabelecer diagnóstico preciso através da imuno-marcação por imuno-histoquímica.
- Especificar o padrão de lesão e os órgãos mais afetados pelo parasita.
- Reconhecer possíveis fontes ambientais de infecção.

2. Revisão de Literatura

2.1. Primatas Neotropicais

Os primatas neotropicais são conhecidos como primatas do novo mundo (PNM) e pertencem à infraordem dos Platyrrhini, que diferencia-se da infraordem dos Catarrhini (primatas do velho mundo) pela distribuição geográfica, localizados nas regiões das Américas, nas características anatômicas pela presença de nariz achatado com narinas voltadas para as laterais, presença de 12 pré-molares e não possuem polegares opositores. Além disso, nos aspectos reprodutivos, os machos tendem a contribuir com o cuidado parental e as gestações são normalmente gemelares, porém, o nascimento de mais filhotes é comum em animais mantidos em cativeiro. O raio de distribuição de um grupo de PNM é consideravelmente menor quando comparado aos Catarrhini (VERONA & PISSINATI, 2014; MATTISON & VAUGHAN, 2017).

Os PNM são, em grande maioria, adaptados à vida arborícola, possuem menor porte, habilidade no uso das mãos e pés e, algumas espécies possuem cauda preênsil e grande movimentação dos membros anteriores, permitindo a locomoção por meio de braquiação (VERONA & PISSINATI, 2014). Os hábitos alimentares e certas características anatômicas variam de acordo com a família, o que causa dificuldades, devido à constante mudança na classificação taxonômica desses animais (SCHNEIDER & SAMPAIO, 2013). De acordo com Schneider *et al.* (2013), a classificação taxonômica proposta mais aceita atualmente corresponde à apresentada na tabela 1 simplificada.

A família Cebidae possui maior quantidade de gêneros dos PNM. São amplamente distribuídos no território brasileiro e apresentam variações quanto a características morfológicas e hábitos alimentares. Na presente revisão serão enfatizados os gêneros predominantes no estudo, como *Callithrix* sp., *Leontopithecus* sp., *Saimiri* sp. e *Aotus* sp.

Tabela 1. Adaptação da tabela referente a família, gênero, espécie e subespécie de primatas do novo mundo, baseado em Schneider *et al* (2013).

Família	Sub família	Gênero	
Cebidae	Callitrichinae	<i>Cebuella</i>	
		<i>Mico</i>	
		<i>Callithrix</i>	
		<i>Callimico</i>	
		<i>Saguinus</i>	
		<i>Leontopithecus</i>	
	Cebinae	<i>Saimiri</i>	
		<i>Cebus</i>	
	Aotinae	<i>Aotus</i>	
Pitheciidae	Pitheciinae	<i>Pithecia</i>	
		<i>Chiropotes</i>	
		<i>Cacajao</i>	
	Callicebinae	<i>Callicebus</i>	
Atelidae	Alouattinae	<i>Alouatta</i>	
		Atelinae	<i>Ateles</i>
			<i>Brachyteles</i>
		<i>Lagothrix</i>	

No gênero *Callithrix*, as espécies possuem porte pequeno (300 a 400 gramas), vivem em unidades familiares compostas de múltiplas gerações, com uma fêmea reprodutora, alguns machos, dois a quatro subadultos e juvenis (VERONA & PISSINATI, 2014; MATTISON & VAUGHAN, 2017). Possuem ornamentos de cabeça, principalmente tufo na região das orelhas, que variam de coloração de acordo com a espécie, sendo de coloração preta no *Callithrix penicillata* (COIMBRA-FILHO & MITTERMEIER, 1973).

Os calitriquídeos apresentam também garras em todos os dedos das mãos e dos pés e cauda longa, porém não-prênsil, além disso, possuem mandíbula e dentição diferenciada tornando-os especializados na perfuração de troncos, para obtenção de látex, exsudatos ou goma de árvores (VERONA & PISSINATI, 2014). A dieta desses animais é composta, nos períodos de seca, por frutos de *Inga* spp., exsudato de vegetais, ingestão de larvas e insetos adultos e ovos de aves (VILELA & FARIA, 2003; VILELA & DEL-CLARO, 2011). Nos períodos de chuva, a abundância de fontes de alimento torna mais

diversificada a dieta, sendo composta por folhagens, flores, insetos adultos e predominantemente frutos (VILELA & DEL-CLARO, 2011).

A fragmentação e perda de habitat, devido ao desmatamento e à urbanização, levam a mudanças nos hábitos alimentares desses animais (SANTOS *et al.*, 2014; ICMBIO, 2019). O *Callithrix penicillata* é encontrado com facilidade no bioma cerrado, predominante no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins e Minas Gerais (RÍMOLI *et al.*, 2015).

O gênero *Leontopithecus* possui as espécies mais raras de Platyrrhini e são incluídos na lista de animais ameaçados de extinção (ROSENBERGER, A.L & COIMBRA-FILHO, 1984; OLIVEIRA, 2012). A dinâmica social consiste de um casal dominante, porém todos os indivíduos do grupo ajudam no cuidado parental (BAKER *et al.*, 2002). Os espécimes desse gênero podem atingir cerca de 650 gramas, possuem longa cauda não preênsil, a coloração da pelagem varia de acordo com a espécie, de preto a dourado, o *Leontopithecus chrysomela*, por exemplo, é preto no dorso e apresenta pelos dourados da região da face (ROSENBERGER & COIMBRA-FILHO, 1984).

L. chrysomela também possui os incisivos superiores e inferiores mais largos quando comparados às demais espécies. Além disso, os espécimes do gênero possuem dedos alongados que facilitam a predação em locais de difícil acesso, como troncos e plantas (RYLANDS *et al.*, 1996). A dieta desses animais é composta por frutos, néctar e flores de uma grande diversidade de plantas, além disso consomem insetos e pequenos animais como rãs e lagartos, e em casos de escassez de alimento podem consumir fungos e exsudatos de árvores (GUIDORIZZI, 2008; CATENACCI *et al.*, 2016). Os *Leontopithecus* sp. são endêmicos de regiões de Mata Atlântica, sendo encontrados no sul da Bahia, São Paulo e Rio de Janeiro, porém diversos exemplares são mantidos em cativeiro para fins de conservação das espécies (OLIVEIRA, 2012).

O gênero *Saimiri* sofre alterações taxonômicas constantes a respeito do número de espécies e sub-espécies pertencentes a esse gênero, o que dificulta o estabelecimento de colônias (STEINBERG *et al.*, 2009). As diferenças de coloração não são suficientes para a determinação da espécie, sendo necessários testes genéticos para confirmação (NIEVES *et al.*, 2003). Porém, são estabelecidos dois grupos para o fenótipo sutis dos *Saimiri* sp., baseando-se na área despigmentada ao redor dos olhos, o grupo *S. sciureus* que apresenta um padrão de pelos brancos no formato de arco com ponta na região acima

dos olhos, e o grupo *S. boliviensis* que apresenta um padrão de pelos brancos no formato semicircular acima dos olhos (ABEE *et al.*, 2000). É comum o cruzamento interespecie desse gênero, o que pode acarretar dificuldade na conservação dessas espécies. O dimorfismo sexual é baseado no peso corporal de 914.58 gramas variando $\pm 13,78$ gramas em machos e 752.5 ± 74.6 gramas em fêmeas. Os caninos também são maiores e mais largos nos machos (ABEE *et al.*, 2000; STEINBERG *et al.*, 2009). A dieta desses animais é composta, basicamente, por brotos de leguminosas e predação de artrópodes, sofrendo variação na proporção em que ambos são ingeridos, de acordo com a estação de chuvas ou secas da região (LIMA, E.M & FERRARI, S.F., 2003). As espécies desse gênero se encontram nas regiões nordeste e leste da Floresta Amazônica, não ocorrendo naturalmente no Centro-Oeste brasileiro (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2015).

O gênero *Aotus* é composto pelos chamados macacos da noite, são os únicos PNM de hábitos noturnos. A classificação taxonômica dessas espécies também sofre alterações constantes, porém essas são divididas em dois fenótipos básicos, o grupo “pescoço vermelho” e o grupo “pescoço acinzentado”. Os animais desse gênero possuem cabeças arredondadas com órbitas grandes, dotados de capacidade de visão noturna, mas capazes de diferenciar cores (DEFLER & BUENO, 2007). Possuem cauda longa não preênsil, podem chegar a 1 Kg de peso corporal e não possuem dimorfismo sexual. Seus grupos são compostos por até 12 indivíduos e as gestações são anuais, gerando um filhote por ano (AURICCHIO, 1995). Sua dieta é composta por folhas, frutos, insetos, ovos e filhotes de aves e pequenos morcegos (GREENBERG, 1997). Esses animais estão distribuídos no curso de rios amazônicos, compreendendo Estados como Tocantins, Pará e Amazonas (VIDAL *et al.*, 2013).

O gênero *Lagothrix* foi o único da família Atelidae incluso no presente estudo. São considerados espécies de grande porte de PNM, de cerca de 6 a 9 Kg de peso corporal possuem longos braços que permitem a movimentação por braquiação (CANT, 2003). Além disso, possuem uma longa cauda preênsil, e as espécies se diferenciam com base na coloração e aparência. O dimorfismo sexual é sutil, baseando-se no maior peso corporal do macho em comparação à fêmea (ROSENBERG & STRIER, 1989). Sua dieta é composta, principalmente, por frutas maduras, sementes, brotos de plantas e flores. Os *Lagothrix* sp. podem consumir presas, porém correspondem a uma baixa porcentagem da dieta (0,1%) (PERES, 1994).

Os PNM são muito utilizados nas pesquisas envolvendo desde distúrbios de metabolismo a infecções por diversos parasitas. Algumas espécies são consideradas modelos experimentais, porém a infecção natural de algumas gera preocupação quanto à conservação da biodiversidade e impacto na saúde humana.

2.2. Toxoplasmose em primatas

Diversos estudos tratam da susceptibilidade de primatas do novo mundo a infecção por *T. gondii*, sendo caracterizada como uma doença multissistêmica grave, aguda e fatal. Neste trabalho serão abordados alguns estudos relevantes.

Epiphany et al. relatam a morte de trinta e dois primatas de cativeiro com suspeita de toxoplasmose. No estudo, foram realizadas avaliações *post-mortem*, por meio do processamento de amostras da maioria dos órgãos dos animais. Os cortes histológicos foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de *T.gondii*, posteriormente, a avaliação quantitativa das formas infectantes foi realizada por meio de microscopia eletrônica. Lesões foram descritas em diversos órgãos, sendo predominante hepatite necrotizante multifocal, pneumonia intersticial e esplenite necrótica. É levantada a hipótese de que o diagnóstico de toxoplasmose por meio de lesões macroscópicas em cebíneos enfrenta mais dificuldades que em calitriquídeos, devido a grande variação de alterações.

Cedillo-Pelaéz et al. relatam dois casos de toxoplasmose aguda fatal em *Saimiri sciureus* na cidade do México. Os fragmentos dos órgãos foram processados e submetidos a avaliação histopatológica por coloração de Hematoxilina-eosina e, posteriormente a imuno-histoquímica. Os achados foram edema pulmonar, pneumonia intersticial, hepatite e linfadenite necrotizante. As amostras também foram submetidas á análise por PCR afim de determinar a variante genética de *T. gondii* envolvida, porém as análises não foram precisas, devido ao mau estado de conservação das amostras.

Pardini et al. relatam dois caso de toxoplasmose fatal em *Saimiri boliviensis* do zoológico de Buenos Aires, Argentina. O *Toxoplasma gondii* também foi identificado por meio de imuno-histoquímica. Por meio de PCR, foi possível a identificação de um genótipo atípico de *T.gondii* envolvido na infecção destes casos.

A hipótese proposta para sensibilidade dos PNM para infecção por *T. gondii* é o padrão evolutivo arborícola, que impossibilitou o contato dos indivíduos com

esporozoítos e outras formas infectantes, dificultando o desenvolvimento de resposta imune efetiva. Com o crescimento antropológico, essas espécies enfrentam a perda de habitat natural e mudanças em seus hábitos alimentares, tornando o consumo de lixo e resíduos práticas rotineiras na forragem, sendo assim, mais susceptíveis a infecção (CARME *et al*, 2003; GOLDBERG *et al*, 2008; MBORA *et al*, 2009).

2.3.Gênero *Toxoplasma*

O *Toxoplasma* sp. é um protozoário, unicelular eucarionte pertencente ao reino Protista. O *Toxoplasma gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiia, Subordem Eimeriina Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* (LEVINE *et al.*, 1980). Apenas uma espécie é reconhecida, o *Toxoplasma gondii*, porém são identificados diversas variações genéticas que necessitam de mais estudos, pois podem apresentar diferentes potenciais patogênicos (DUBEY, 1998).

A ultraestrutura do *T. gondii* foi determinada por meio da microscopia eletrônica, os zoítos medem cerca de 5-8 x 1-2 µm e possuem um complexo de tripla membrana. Um complexo apical formado por dois anéis polares se destacam na porção anterior do parasita e um complexo semelhante, porém formado por apenas um anel se encontra na porção posterior (LEVINE *et al.*, 1980). As estruturas próximas ao processo apical são responsáveis pelo processo de penetração do parasita na célula hospedeira por meio da liberação de proteínas (BLACK, 2000). Na ponta anterior, também se encontra o conoide, uma ultraestrutura de composição desconhecida ligada a microtúbulos que formam uma rede com o corpo celular. Especula-se que a ativação desse complexo direciona as organelas do parasita para a célula hospedeira (BLACK & BOOTHROYD, 2000). O *Toxoplasma gondii* também apresenta uma organela chamada de apicoplasto, porém a função dessa ainda não é esclarecida (LIM & McFADDEN, 2010). A figura 1 representa um esquema do parasita *Toxoplasma gondii*.

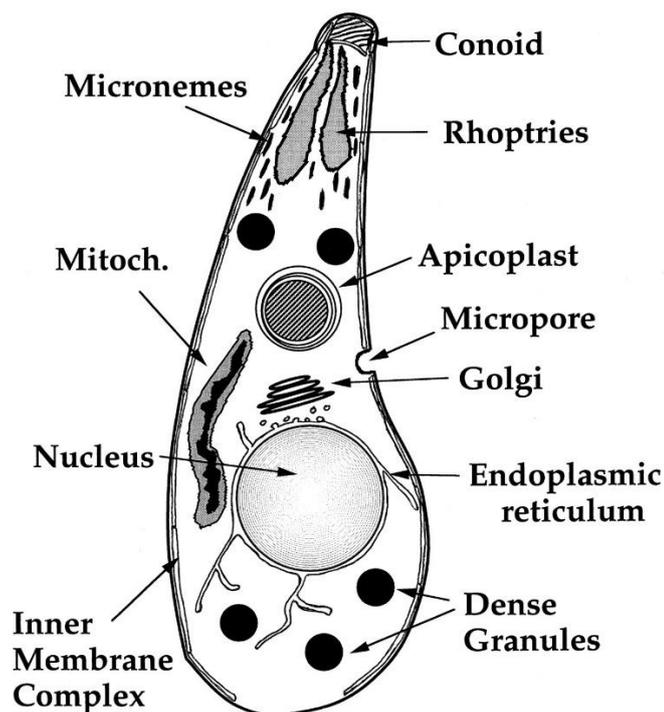


Fig. 1. Esquema representativo da ultraestrutura do *Toxoplasma gondii*. Fonte: Black, 2000

Os protozoários são organismos independentes, porém são formadores de colônia. A reprodução destes pode se dá por via sexual ou assexual, dependendo do hospedeiro infectado (LEVINE *et al*, 1980).

2.3.1. Ciclo do parasita

O *Toxoplasma gondii* é um coccídio intracelular obrigatório e possui três formas infectantes: taquizoítos (individuais ou em grupo), bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoíto (oocisto) (DUBEY, 2004). O taquizoíto é o estágio de desenvolvimento caracterizado pela rápida multiplicação em qualquer célula do hospedeiro intermediário e em células extraintestinais do hospedeiro definitivo (DUBEY *et al.*, 1998). Possuem formato afunilado e possuem cerca de 2-6 μm de comprimento. Os taquizoítos penetram as células do hospedeiro de maneira ativa e induzem à formação de um vacúolo parasitóforo (VP), protegendo-os dos mecanismos de defesa da célula (DUBEY, 2004). No interior do VP, os taquizoítos se replicam por divisões binárias e ocasionam o rompimento da célula hospedeira devido à pressão exercida pelos taquizoítos em crescimento (DUBEY *et al.*, 1998).

Infecções crônicas em organismos imunocompetentes apresentam aumento de respostas pelos anticorpos do hospedeiro, levando os taquizoítos a se modificarem para bradizoítos, que formam cistos intracelulares a partir do vacúolo parasitóforo. A multiplicação dos bradizoítos é lenta e permanecem na célula hospedeira por longos períodos em estado quiescente (FRENKEL, 1988; DUBEY, 2004). O tamanho dos cistos pode variar, desde estrutura recém-formada variando de 5µm de diâmetro e contendo dois bradizoítos, e cistos antigos com cerca de 70 µm de diâmetro contendo centenas de microorganismos. Os cistos podem se desenvolver em diversos órgãos viscerais, como pulmão, fígado, musculo cardíaco e esquelético e encéfalo (DUBEY, 1998). A parede dos cistos é fina e composta pela célula hospedeira e o próprio parasita, no entanto, os bradizoítos são resistentes a ação de enzimas proteolíticas (DUBEY, 2004).

Os animais pertencentes a família Felidae são hospedeiros definitivos do *T. gondii*, sendo os únicos em que ocorre reprodução sexuada do parasita. São infectados através da predação de animais ou ingestão de água contaminados. Normalmente, a forma infectante que ingerem são bradizoítos presentes em cistos na musculatura, porém podem se infectar com qualquer estágio de desenvolvimento do parasita, acarretando apenas em variação no período pré-patente (DUBEY, 1998).

Após a ingestão, a parede do cisto se rompe pela ação das enzimas proteolíticas presentes no estômago e intestino delgado liberando os bradizoítos que penetram na lâmina própria formando taquizoítos ou em células epiteliais do intestino delgado, desenvolvendo numerosas gerações assexuadas, que variam em cinco tipos morfológicos (DUBEY, 2004). Esses tipos de estágio são denominados esquizogônias e em tipos avançados como D, iniciam a diferenciação em merozoítas que posteriormente, formam gametas femininos e masculinos (DUBEY *et al.*, 1998).

Após a fecundação, a parede do oocisto começa a se formar. Oocistos maduros são liberados no lúmen intestinal após o rompimento da célula epitelial e podem permanecer no hospedeiro definitivo por meses. No entanto, os felinos não liberam oocistos indefinitivamente, ocorrendo apenas durante algumas semanas pós-infecção em indivíduos jovens ou imunocomprometidos (DUBEY, 2004).

Os oocistos são formados apenas nos hospedeiros definitivos e permanecem não-esporulados em fezes frescas, sendo necessárias temperatura e aeração adequadas para

esporulação, podendo ocorrer dentro de um a cinco dias (DUBEY *et al.*, 1998). Os oocistos esporulados possuem dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos.

Nos hospedeiros intermediários, os cistos ingeridos penetram em enterócitos e são carregados à lamina própria, onde se multiplicam em diversas células, causando edema, necrose e espessamento da mucosa caracterizando enterite severa (DUBEY, 2004). Devido à disseminação de esporozoítos por meio da linfa, a infecção pode atingir diferentes órgãos (ZACHARY, 2013). A figura 2 apresenta uma esquematização do ciclo do *T. gondii*.

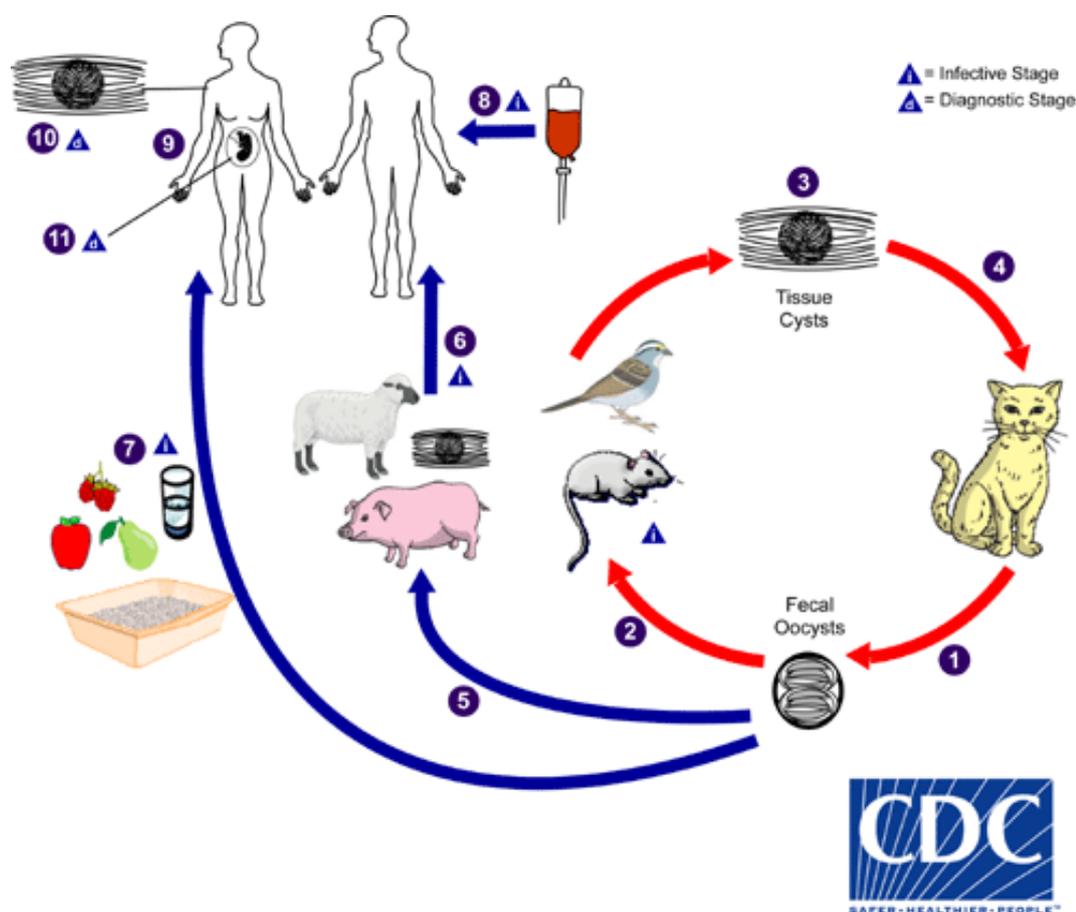


Fig. 2. Ciclo de transmissão e hospedeiros intermediários e definitivos do protozoário *T.gondii*. Fonte: CDC, 2017. 1) Hospedeiro definitivo; 2) Ingestão de oocistos liberados no ambiente; 3) Formação de cistos de bradizoítos na musculatura de hospedeiros intermediários; 4) Infecção do hospedeiro definitivo pela ingestão de cistos; 5) Infecção de animais de produção por oocistos presentes no ambiente; 6) Ingestão de carnes cruas; 7) Ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de felinos; 8) Transfusão sanguínea ou transplante de órgãos; 9) Transmissão congênita; 10) Formação de cistos e

diagnóstico por sorologia ou análise histopatológicas de tecidos; 11) Diagnóstico de infecção congênita por PCR.

2.3.2. Relação parasita-hospedeiro

As formas infectantes do *T. gondii* podem atingir uma variedade muito grande de células em mamíferos e as formas intracelulares dificilmente são susceptíveis a ação dos anticorpos. Os fatores celulares parecem estar mais envolvidos que os fatores humorais na destruição imunomediada de *T. gondii* (DUBEY, 2004).

Infecções crônicas e bem estabelecidas não são eliminadas por resposta imune, podendo cistos teciduais sobreviverem por anos no hospedeiro. Os cistos podem se romper liberando bradizoítos que, em indivíduos imunocompetentes são destruídos, porém em indivíduos com imunodepressão, pode resultar uma nova infecção (DUPONT, 2012).

A patogenicidade do *T. gondii* depende de diversos fatores, como susceptibilidade do hospedeiro, estágio de desenvolvimento e virulência do patógeno. Herbívoros tendem a se infectar por via oral através da ingestão de alimento contaminado com oocistos e carnívoros se infectam a partir de cistos presentes em suas presas. Os felídeos podem disseminar milhões de oocistos através da ingestão de pouquíssimos bradizoítos. Apesar de não eliminarem oocistos nas fezes durante toda a vida, sendo limitada à algumas semanas após a infecção, essas espécies tornam-se essenciais para manutenção e perpetuação do ciclo de vida do *T. gondii*, sendo este praticamente inexistente em ambientes desprovidos desses animais (DUBEY, J. 2004).

2.4. Lesões macroscópicas e histopatológicas

A infecção por *Toxoplasma gondii* pode afetar diversos órgãos em um mesmo hospedeiro, sendo caracterizada como uma infecção sistêmica. As lesões macro e microscópica estão caracterizadas a seguir.

2.4.1. Fígado

Macroscopicamente, é possível observar hepatomegalia e congestão (EPIPHANIO *et al.*, 2003). As lesões histopatológicas são, majoritariamente, hepatite necrotizante multifocal e inflamação, variando de moderada à severa e, em alguns casos, hemossiderose. O infiltrado inflamatório é composto, principalmente, por neutrófilos e macrófagos e, em menor número, por outros tipos celulares inflamatórios, como

linfócitos. É frequente a visualização de taquizoítos livres e bradizoítos em cistos em áreas adjacentes às lesões (EPIPHANIO *et al.*, 2003; CULLEN & BROWN, 2013; SANTOS *et al.*, 2018).

2.4.2. Baço

As alterações macroscópicas de baço são esplenomegalia e hiperplasia linfoide esplênica. A lesão microscópica de maior importância é a esplenite necrotizante aguda ou subaguda. É possível a visualização de taquizoítos livres e bradizoítos em cistos no interior de macrófagos (EPIPHANIO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2018).

2.4.3 Pulmão

As alterações macroscópicas de pulmão são congestão e edema pulmonar. Microscopicamente, é visualizado pneumonia intersticial multifocal, normalmente necrótica e, em alguns casos, podem ocorrer hemossiderose. Ocorre proliferação de pneumócitos tipo II e o infiltrado é composto de neutrófilos e macrófagos (EPIPHANIO *et al.*, 2003). Alguns estudos apontam a ocorrência de broncopneumonia fibrinohemorrágica aguda (SANTOS *et al.*, 2018). As formas infectantes (taquizoíto e bradizoíto) de *T.gondii* também são observadas (EPIPHANIO *et al.*, 2003).

2.4.4 Lesões em demais órgãos

Em alguns casos, pode-se observar miocardite crônica. No sistema nervoso, pode-se observar congestão cerebral, edema e hemorragia. Microscopicamente, encefalite, leptomeningoencefalite e desmielização de matéria branca são observadas. O infiltrado é composto por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (ZACHARY, 2013). Pode ocorrer linfadenite e linfadenite hemorrágica mesentérica. Achados como hemotórax, hidrotórax, hemo e hidroperitônio e hidropericárdio podem estar presentes (EPIPHANIO *et al.*, 2003).

2.5. Vias de infecção

A forma de oocisto do *T. gondii* é disseminada por felídeos domésticos e silvestres, causando um grande comprometimento ambiental (DUBEY, 2004). É estimado por meios moleculares que, em locais com grandes populações de gatos errantes, a contaminação ambiental por oocistos seja elevada, aumentando o número de casos de toxoplasmose (AFONSO *et al.*, 2008).

Os oocistos esporulados são relativamente resistentes a intempéries, sobrevivendo por meses ou até anos em condições adequadas, como solo úmido (DUBEY, 2004). Além da sobrevivência no solo, os oocistos podem sobreviver longos períodos em alimentos como frutas (KNIEL *et al.*, 2002). Essas formas infectantes podem ser disseminadas por meio de invertebrados, como moscas e baratas. Humanos podem se contaminar pelo contato físico sem higienização, com animais que carregam oocistos pelo contato direto com fezes de gatos. Porém, a forma mais comum de infecção em humanos se dá pelo consumo de cistos presente em musculatura, devido ao consumo de carnes cruas ou sem a apropriada cocção e consumo de embutidos mal preparados (DUBEY, 2004).

Os oocistos são amplamente disseminados mesmo que poucos gatos estejam ativamente liberando as formas infectantes, sendo suficiente para perpetuação do ciclo ambiental. Além disso, filhotes contaminados por via congênita e adultos reinfetados, podem expelir oocistos por meio das fezes, porém mesmo nesses animais, a eliminação de oocistos se dá em um período de poucas semanas, não sendo presente em toda vida do animal. A infecção e reinfecção dos felinos está ligada ao elevado nível de contaminação de suas presas, normalmente, aves e roedores (DUBEY, 2004). Para fins epidemiológicos, a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos é mais válida para avaliação da contaminação ambiental, visto que os animais positivos, provavelmente já disseminaram oocistos (DUBEY, 1972).

2.6. Toxoplasmose em humanos e outros animais

A toxoplasmose é descrita em diversas espécies, afetando principalmente neonatos e indivíduos imunocomprometidos. Falhas embriogênicas, reabsorções fetais, mortes fetais, mumificações e mortes neonatais são descritas nas infecções por *T. gondii* em ovelhas e cabras. Algumas espécies apresentam maior sensibilidade à infecção como é observado em marsupiais australianos, suínos domésticos e silvestres, coelhos, canários (*Serinus canarius*) e em PNM. Animais domésticos também estão susceptíveis a infecções fatais quando há coinfeção com vírus imunodepressores, mesmo gatos domésticos estão vulneráveis nesses casos ou quando são neonatos (DUBEY, 2004).

Em humanos, a toxoplasmose é uma das infecções parasitárias mais comuns e normalmente assintomática. Porém, infecções primárias durante gestações podem acarretar sérios comprometimentos ao feto, sendo as lesões e consequências ligadas ao estágio de desenvolvimento do mesmo. Infecções durante o primeiro trimestre de gestação estão ligadas a manifestações clínicas mais severas. Os quadros variam de

hidrocefalia, coriorretinite bilateral, perda parcial ou completa da visão, microcefalia, hepatomegalia, convulsões, calcificações cerebrais, anormalidades no fluido cérebro-espinhal e morte perinatal (McAULEY, 2014).

A infecção por *T. gondii* representa um risco para humanos imunocomprometidos por infecções virais, como HIV, ou por uso de drogas imunossupressoras, como pacientes submetidos a transplantes de órgãos ou portadores de doenças imunomediadas (SUKTHANA *et al.*, 2006). Visto que os cistos contendo bradizoítos podem sobreviver décadas em tecidos do hospedeiro, estudos recentes buscam a correlação desses parasitas em órgãos vitais, como sistema nervoso central, com disfunções severas, como esquizofrenia, epilepsia e mal de Alzheimer que comprometem a qualidade de vida de seus portadores (FLEGR, 2013).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pode apresentar um quadro clínico típico ligado à linfadenopatia, apresentando sinais de febre, fadiga, dores musculares, enxaquecas e malícia. Os sinais são autolimitantes e não tendem a comprometer em demasiado a saúde do indivíduo (McAULEY, 2014). A toxoplasmose também tem sido estudada com modelo de infecção de diversos membros da família Apicomplexa, podendo esclarecer mecanismos de ação e defesa de membros comuns, como o *Plasmodium*, agente chave da malária (BLADER & SAEIJ, 2009).

As medidas necessárias para evitar a infecção estão ligadas à boa higiene de alimentos, principalmente frutas e verduras, além do cozimento acima de 70°C de carnes ou congelamento superior a três dias a temperaturas de 0°C (DUBEY, 2004).

2.7. Métodos diagnósticos

O diagnóstico de *T. gondii in vivo* pode ser realizado através da detecção de imunoglobulinas em fluídos de animais suspeitos de infecção por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (FLECK, 1989; CDC, 2017). A genotipagem do *T. gondii* é uma ferramenta que auxilia nos dados epidemiológicos e controle da transmissão, sendo realizada por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento genético (LIU *et al.*, 2015).

O diagnóstico histológico é realizado pela visualização de taquizoítos ou cistos de bradizoítos em amostras de tecidos ou esfregações de fluídos, como cérebro-espinhal (MONTROYA, 2002). A primeira investigação é realizada por meio da coloração dos fragmentos de tecido pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) (EPIPHANIO *et al.*, 2003). Esse método é amplamente utilizado para análise de alterações morfológicas em

células, visto que a hematoxilina cora material composto por ácidos nucleicos e a eosina cora proteínas inespecíficas, possibilitando a visualização do estado estrutural da célula na microscopia óptica (FISCHER *et al.*, 2008). No entanto, a visualização de taquizoítos é raramente possível de forma clara com uso de colorações convencionais. Mesmo com a visualização de bradizoítos em cistos, a confirmação de *T.gondii* somente é possível através de testes mais específicos, visto que outros parasitas pertencentes à família Sarcocystidae, como *Neospora*, *Hammondia*, e *Isospora* formam estruturas semelhantes nos tecidos (ZACHARY, 2013).

A imuno-histoquímica é a técnica de eleição para confirmação precisa do diagnóstico de toxoplasmose. A técnica consiste na exposição de antígenos presentes nas amostras de tecidos e posterior ligação com anticorpo de *T. gondii*. Após esse processo, a reação é corada por cromógeno. Para facilitar a visualização, a amostra é contra corada com Hematoxilina-eosina, tornando visível as estruturas do tecido. Caso essa reação seja positiva pela marcação das formas infectantes, o diagnóstico de infecção por *T. gondii* é confirmado (ZACHARY, 2013; KIM *et al.*, 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, C.R. Squirrel monkey (*Saimiri spp.*) research and resources. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, 2000.

AFONSO, E.; LEMOINE, M.; POULLE, M. L.; RAVAT, M. C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. **International Journal for Parasitology**, vol. 38, n. 8, p. 1017-1023, 2008.

ANDRADE, M.C.R.; COELHO, J.M.C.O.; AMENDOEIRA, M.R.R.; VICENTE, R.T.; CARDOSO, C.V.P.; FERREIRA, P.C.B.; MARCHEVSKY, R.S. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. **Ciência Rural**, vol. 37, n. 6, 2007.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: terra brasiliis, 1995.

BAKER, A.J.; BALES, K.; DIETZ, J.M. Mating system and group dynamics in lion tamarins. In: D.G. KLEIMAN; A.B. RYLANDS. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**, p. 188-212, 2002.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLADER, I.J.; SAEJI, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, vol. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

CANT, J.G.H.; YOULATOS, D.; ROSE, M.D. Suspensory locomotion of *Lagothrix lagothricha* and *Ateles belzebuth* in Yasuní National Park, Ecuador. **Journal of Human Evolution**, vol. 44, p. 685-699, 2003.

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

CATENACCI, L.S.; PESSOA, M.S.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; VLEESCHOUWER, K.M.D. Diet and feeding behavior of *Leontopithecus chrysomela* (Callitrichidae) in degraded areas of the atlantic forest of South Bahia, Brazil. **International Journal of Primatology**, 2016

CDC. Centers for diseases control and prevention. **Toxoplasmosis**. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2017.

CEDILLO-PELÁEZ, C.; RICO-TORRES, C.P.; SALAS-GARRIDO, C.G.; CORREA, D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. **Veterinary Parasitology**, vol. 180, p. 368-371, 2011.

COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. New data on taxonomy of the Brazilian marmosets of the genus *Callithrix* Erxleben, 1777. **Folia primatology**, vol. 20, p. 241-264, 1973.

CULLEN, J.M.; BROWN, D.L. Sistema hepatobiliar e pâncreas exócrino. . In: ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. **Bases da patologia em veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 8, p. 436, 2013.

DEFLER, T.R.; BUENO, M.L. Aotus diversity and the species problem. **Primate Conservation**, vol. 22, p. 55-70, 2007.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, vol. 126, p 57-72, 2004.

DUBEY, J. P; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D.A.; HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Special Issue on Immunoparasitology**, vol. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, L.; CATÃO-DIAS, J.L. Pathology of Toxoplasmosis in captive new world primates. **Journal of Comparative Pathology**, vol. 129, p. 196-204, 2003.

FISCHER, A.H.; JACOBSON, K.A.; ROSE, J.; ZELLER, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH Protocol**, 2008.

FLECK, D.G. Annotation: Diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 42, n. 2, p. 191-193, 1989.

FLEGR, J. How and why toxoplasma makes us crazy. **Trends in parasitology**, 2013

FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, vol. 4, n. 10, 1988.

GOLDBERG, T. L.; GILLESPIE, T.R.; RWEGO, I. B.; ESTOFF, E. L.; CHAPMAN, C. A. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. **Emerging infectious diseases**, vol. 14, n. 9, 2008.

GREENBERG, J. **Nocturnality in the owl monkey**, *Aotus* sp. 1997.

GUIDORIZZI, C.E. **Ecologia e comportamento do Mico-Leão-da-Cara-Dourada, *Leontopithecus chrysomela* (Kuhl, 1820) (Primates, Callitrichidae), em um fragmento de floresta semidecidual em Itororó, Bahia, Brasil**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em zoologia) – Zoologia aplicada- Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2008.

SILVA-JÚNIOR, J.S.; ALFARO, J.W.L.; VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; CARVALHO, A.S. Avaliação do Risco de Extinção de *Saimiri sciureus* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. 2015.

KIM, S.H.; SHIN, Y.K.; LEE, K.M.; LEE, J.S.; YUN, J.H.; LEE, S.M. An improved protocolo of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, vol. 51, n. 1, p. 129-132, 2003.

KNIEL, K.E.; LINDSAY, D.S.; SUMNER, S.S.; HACKNEY, C.R.; PIERSON, M.D.; DUBEY, J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. **Journal of Parasitology**, vol. 88, p. 790– 793, 2002.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J. HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Parasitology**, vol. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LIM, L.; McFADDEN, G.I. The Evolution, metabolism and functions of the apicoplast. **Philosophical Transactions London Biological Science**, vol. 365, n. 1541, p. 749-763, 2010.

LIMA, E.M.; FERRARI, S.F. Diet of free-ranging group of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Eastern Brazilian Amazonia. **Folia Primatologica**, vol. 74, p. 150-158, 2003.

LIU, Q. WANG, Z.D.; HUANG, S.Y.; ZHU, X.Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, vol. 8, 2015.

MATTISON, J.A.; VAUGHAN, K.L. An overview of nonhuman primates in aging research. **Experimental Gerontology**, vol. 94, p. 41-45, 2017.

MBORA, D. N.; McPEEK, M. A. Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. **Journal of Animal Ecology**, vol. 78, n. 1, p. 210-218, 2009.

McAULEY, J.B. Congenital toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Diseases Society**, vol. 3, n. 1, p. 530-535, 2014.

MONTOYA, J.G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 185, p. s73-s82, 2002.

NIEVES, M.; STEINBERG, E. R.; ASCUNCE, M. S., OKLANDER, L. I.; MUDRY, M. D. Proyecto Primates: Caracterización Genética de Primates en cautiverio. **Zoology of Latin America**, vol. 5, p. 3 –6, 2003.

OLIVEIRA, L. C.; Avaliação do Risco de Extinção de *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) no Brasil. **Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. 2012.

PARDINI, L.; DELLARUPE, A.; BACIGALUPE, D.; QUIROGA, M.A.; MORÉ, G.; RAMBEAUD, M.; BASSO, W.; UNZAGA, J.M.; SCHARES, G.; VENTURINI, M.C. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Parasitology International**, vol. 61, p. 587-590, 2015.

PERES, C.A. Diet and feeding ecology of gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha cana*) in central amazonia: comparisons with other atelines. **International Journal of Primatology**, vol. 15, n 3, 1994.

RÍMOLI, J.; PEREIRA, D. G.; VALLE, R. R. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) no Brasil. **Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. 2015.

ROSENBERGER, A.L.; COIMBRA-FILHO, A.F. Morphology, taxonomic status and affinities of the Lion Tamarins, *Leontopithecus* (Callitrichinae, Cebidae). **Folia Primatology**, vol. 42, p. 149-179, 1984.

ROSENBERG, A. L.; STRIER, K. B. Adaptive radiation of the ateline primates. **Z Hum. Evol** vol. 18, p. 717-750, 1989.

RYLANDS, A.B.; DA FONSECA, G.A.B.; LEITE, Y.L.R.; MITTERMEIER, R.A. Primates of the Atlantic forest: Origin, distribution, endemism, and communities. In: NORCONK, M.A. **Adaptative radiation of the neotropical primates**. New York: Plenum Press. p. 21-51, 1996.

SANTOS, M.N.; DUARTE, M.H.L.; YOUNG, R.J. Behavioural and ecological aspects of black tufted-ear marmosets, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) (Primates: Callitrichidae) in a semiurban environment. **Revista de Etologia**, vol. 13, n. 1, p. 37-46, 2014.

SANTOS, S.V.; PENA, H.F.J.; TALEBI, M.G.; TEIXEIRA, R.H.F.; KANAMURA, C.T.; DIAZ-DELGADO, J.; GENNARI, S.M.; CATÃO-DIAS, J.L. Fatal toxoplasmosis in Southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical and molecular characterization. **Journal of Medical Primatology**, vol. 47, p. 124-127, 2018.

SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. The systematics and Evolution of new world primates: A review. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2013.

STEINBERG, E.R.; NIEVES, M.; ASCUNCE, M.S.; PALERMO, A.M.; MUDRY, M.D. Morphological and genetic characterization of *Saimiri boliviensis*. **International Journal of Primatology**, vol. 30, p. 29-41, 2009.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, vol. 22, p. 137-142, 2006.

VERONA, C.E.; PISSINATI, A. Primates – Primatas do novo mundo (sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e miqui). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. Ed. São Paulo: Roca, cap. 34, p. 807-810, 2014.

VIDAL, M.D; ROSSATO, R.S.; AZEVEDO, R.B.; SILVA JR, J.S.; FIALHO, M.S. Extensão da distribuição geográfica de *Aotus vociferans* (Primates, Aotidae). **Mastozoologia Neotropical**, vol. 20, n. 1, p. 179-182, 2013.

VILELA, S.L.; FARIA, D.S. Seasonality of the activity pattern of *Callithrix penicillata* (Primates, Callitrichidae) in the cerrado (scrub savana vegetation). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 64, n. 2, p. 363-370, 2004.

VILELA, A.A.; DEL-CLARO, K. Feeding behavior of the Black-Tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) (Primata, Callitrichidae) in a tropical cerrado savana. **Sociobiology**, vol. 58, n. 2, 2011.

ZACHARY, J.F. Sistema nervoso. In: ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. **Bases da patologia em veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 14, p. 812-813, 2013.



CAPÍTULO 2

Toxoplasmose em primatas não humanos da região no Distrito Federal, Goiás Tocantins e Mato Grosso – Brasil

BRASÍLIA

2020

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii*. Este coccídeo possui a capacidade de infectar diversos hospedeiros endotérmicos, como humanos e primatas não humanos. A infecção por *Toxoplasma gondii* é branda e apresenta sinais clínicos inespecíficos em indivíduos imunocompetentes, no entanto, infecções em primatas do novo mundo apresentam caráter agudo com letalidade alta. O presente estudo trata da investigação de 38 casos de primatas do novo mundo de vida livre e de cativeiro, suspeitos de toxoplasmose, provenientes do Distrito Federal, Goiás, Tocantins e Mato Grosso. As amostras foram submetidas a exames histopatológicos e imuno-histoquímico com anti-*T.gondii* afim de possibilitar a visualização de taquizoítos e bradizoítos. As lesões mostram um elevado grau de comprometimento no fígado, baço e pulmão desses indivíduos. Hepatite necrotizante, esplenite necrotizante e pneumonia intersticial foram os achados mais recorrentes nos casos examinados acompanhados de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Não foi possível a determinação estatística de um órgão mais comprometido ou infectado pelos protozoários. Contudo, as análises qualitativas mostram danos maiores no fígado, porém visualização mais clara dos parasitas no baço. Os resultados comprovam uma alta susceptibilidade de primatas do novo mundo, sendo na região de estudo, o *Callithrix penicillata*, a espécie mais acometida.

Palavras chave: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Primatas. 3. Imuno-histoquímica. 4. Hepatite necrotizante.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by the mandatory intracellular protozoan, *Toxoplasma gondii*. This coccid has the ability to infect several endothermic hosts, such as humans and non-human primates. Infection by *Toxoplasma gondii* is mild and has nonspecific clinical signs in immunocompetent individuals, however, infections in primates of the new world have an acute character with high lethality. The present study deals with the investigation of 38 cases of wild new world primates, and captive ones suspected of toxoplasmosis, from the states of Distrito Federal, Goiás, Tocantins and Mato Grosso. The samples were submitted to histopathological and immunohistochemical exams with anti-*T.gondii* in order to allow the visualization of tachyzoites and bradyzoites. The lesions show a high degree of liver, spleen and lung damage in those individuals. Necrotizing hepatitis, necrotizing splenitis and interstitial pneumonia were the recurrent findings in the studied cases, along with inflammatory infiltrate consisting of neutrophils, macrophages and lymphocytes. It was not possible to determine statistically an organ more compromised or infected by protozoa, however, qualitative analysis showed greater damage to the liver and more severe infection in the spleen. The results prove the high susceptibility of new world primates, with *Callithrix penicillata* being the most affected species in the studied region.

Keywords: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Primates. 3. Immunohistochemistry. 4. Necrotizing hepatitis.

1. Introdução

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, um coccídeo intracelular de alto potencial zoonótico, com distribuição mundial, que infecta primatas (DUBEY, 2004). Seus hospedeiros definitivos são pertencentes à família Felidae, sendo o gato doméstico de grande importância para manutenção do agente no ambiente, em regiões urbanas (DUBEY, 2002).

Por se tratar de uma doença endêmica em diversas regiões do Brasil e do mundo, a toxoplasmose torna-se importante, principalmente, devido ao seu ciclo em populações silvestres que são amplamente atingidas, o que pode acarretar riscos à biodiversidade (EPIPHANIO *et al.*, 2003). Infecções por *T. gondii* são bem documentadas em primatas do novo mundo, apresentando alto grau de mortalidade nessas espécies, porém ainda não é estabelecida a causa dessa susceptibilidade e as vias de infecção (SANTO *et al.*, 2018).

Os primatas do novo mundo, como o *Callithrix penicilata* estão cada vez mais inseridos em meios urbanos e obtendo grande sucesso em sua adaptação. Seus hábitos alimentares incluem presas animais, frutas e restos de alimentos, o que pode vir a ser a via de entrada para o protozoário (ZAGO *et al.*, 2013).

O *T. gondii* apresenta tropismo pelo epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, onde se instala e se replica. Sendo assim, o agente é disseminado por meio das fezes na forma de oocistos esporulados. As formas mais comuns de contaminação são oriundas da ingestão de alimentos e água contaminados, ou por meio do consumo de animais anteriormente infectados, contendo cistos na musculatura. Já no hospedeiro intermediário, o protozoário adota a via extraintestinal, instalando-se no fígado, baço, pulmões e encéfalo. As lesões hepáticas normalmente têm caráter agudo e necrose acentuada, sendo estabelecida como *causa mortis* nos primatas afetados (EPIPHANIO *et al.*, 2003; DUBEY, 2004).

No presente trabalho foram avaliados 38 casos de primatas de vida livre enviados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília, advindos do Distrito Federal (DF), Goiás (GO), Mato Grosso (MT) e Tocantins (TO), dos anos de 2012 a 2019 submetidos a análises e suspeitos de toxoplasmose. Os objetivos do trabalho foram a caracterização das lesões nos casos e o estabelecimento do órgão mais viável para detecção do agente, visto que o diagnóstico preciso de toxoplasmose ainda enfrenta dificuldades de processamento.

2. Materiais e métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo do período de Janeiro de 2012 a Dezembro de 2019, totalizando 38 casos de primatas não humanos, de vida livre e de cativeiro, enviados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV-UnB). O levantamento dos casos foi realizado a partir da revisão de arquivos de necropsia e informações sobre espécie, localização, epidemiologia e alterações anatomopatológicas. O critério adotado para seleção dos casos a serem testados foi a presença de lesão compatível com hepatite necrotizante multifocal aleatória e visualização de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*, definidas através de achados histopatológicos. Essa lesão foi a definida para estabelecer os suspeitos, devido à sua gravidade em casos de toxoplasmose em primatas, sendo a possível *causa mortis* a perda da função hepática.

Os animais, provenientes de diversas regiões do Distrito Federal, Goiás, Tocantins e Mato Grosso, eram entregues ao LPV-UnB por meio da Secretaria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL-zoonoses) e Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) para realização de exames *post mortem*. Os fragmentos de órgãos coletados foram fixados em formaldeído 10%, embebidos em parafina, seccionados de 3-6 μm e corados com método de hematoxilina-eosina (HE) de rotina (MALUENDA et al, 2009), posteriormente analisadas por microscopia de luz.

As lâminas coradas por HE foram examinadas ao microscópio óptico comum, com o intuito de visualizar os cistos ou taquizoítos do parasita, associados à áreas de necrose aleatória e hepatite, esplenite ou pneumonia. Todos casos foram submetidos ao teste de imuno-histoquímica. As alterações histopatológicas observadas no fígado, pulmão e baço foram identificadas em todos os casos confirmados, e a intensidade, presença dos cistos e taquizoítos, e o infiltrado inflamatório, foram classificados de forma quantitativa, pelo parâmetro de cruzes, em discreta (+), moderada (++) e acentuada (+++), posterior a avaliação de diversas áreas do fragmento.

Os casos foram submetidos à imuno-histoquímica (IHQ) para confirmação do diagnóstico de *T. gondii*. O protocolo laboratorial foi desenvolvido pelo LPV-UnB. Foram realizados cortes histológicos de fígado, baço e pulmão com 4 μm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente pela técnica de

silanização (3 cubas com tampa: 1. acetona PA, 2. solução APTS (Sigma A3648) a 4% em acetona 3. acetona PA). Foi feita a desparafinização em xilol seguida da hidratação em solução aquosa de álcool etílico e lavagem com água. Os cortes histológicos foram colocados em solução tampão de citrato (ácido cítrico a 0.01M, pH 6) e submetidos à temperatura de 121°C em pressão elevada por 3 minutos para a recuperação antigênica. Após descanso de 10 minutos, realizou-se o bloqueio primário da peroxidase endógena com água oxigenada a 3%, por cinco minutos.

Posterior a cada etapa, foram realizadas cinco lavagens com PBS em pH 7,2 [10x]. O tecido foi incubado por quinze minutos em soro equino, com diluição de 1:9 em PBS. Realizada a lavagem em solução salina tamponada, incubou-se o anticorpo primário da toxoplasmose na titulação de 1:16000 com diluição em PBS por 12 horas a 4°C em câmara fria. A lavagem das lâminas em solução salina tamponada foi realizada novamente e foram adicionados os reagentes ImmunoDetector Bio SB Biotinylated Link. Passados 10 minutos, realizou-se lavagem com PBS e, posteriormente, a adição do Bio SB ImmunoDetector HRP Label por 10 minutos. A última lavagem foi realizada com água destilada. O controle positivo foi realizado em todos os testes imuno-histoquímicos, a partir de tecido nervoso infectado por *T.gondii*. A reação foi revelada com 3,3'-Diaminobenzidine (DAB-Bio SB Buffer Substrate) por cinco minutos e contrastada com hematoxilina-eosina (HE).

Além dos testes laboratoriais, foram realizadas visitas aos locais onde os PNM de vida livre foram encontrados, afim de determinar uma possível forma de infecção. Foram registradas fotografias das propriedades e entrevistas com residentes sobre a presença e frequência de aparição dos PNM.

3. Resultados

No período de janeiro de 2012 à dezembro de 2019, foram realizados 1037 (100%) exames anatomopatológicos em primatas não humanos, constatando 97/1037 (9,35%) casos de doença infecciosa parasitária. Dentre eles, 38/97 (39,17%) foram suspeitos de infecção por toxoplasmose. Os 38 casos ocorridos estão apresentados conforme **Tabela 1**:

As lesões macroscópicas foram observadas por meio das necropsias das carcaças enviadas ao LPV-UnB. Não foi possível analisar 13 casos, visto que foram encaminhados apenas fragmentos de órgãos, não constando o relatório de necropsia. Macroscopicamente os achados foram hepatomegalia (3/22; 13,63%), esplenomegalia (1/22; 4,54%), congestão pulmonar (2/22; 9,09%), congestão encefálica (1/22; 4,54%), congestão mesentérica (2/22; 9,09%) e linfadenomegalia (1/22; 4,54%). Não sendo observadas alterações dignas de nota nos demais órgãos.

O diagnóstico de toxoplasmose foi realizado, primeiramente, através das alterações anatomopatológicas com a visualização de áreas de necrose aleatória no fígado e necrose de centros germinativos no baço, com ou sem a visualização de estruturas piriformes a ovaladas, basofílicas sugestivas de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ou cistos de bradizoítos. Além dessas alterações, associou-se aos dados epidemiológicos coletados de alguns casos com mortes simultâneas de primatas no mesmo local. Para todos os casos suspeitos, realizou-se o exame de imuno-histoquímica (IHQ), no baço, fígado e pulmão para confirmação do diagnóstico.

Nos 35 casos analisados, as alterações necróticas no fígado e baço e a pneumonia intersticial em alguns animais, foram os achados microscópicos mais relevantes e estão detalhados na **Tabela 2**. Hepatite necrotizante multifocal aleatória foi evidenciada em 35/35 (100%) dos casos avaliados (Figura 1 e 2), com variação de intensidade da lesão de discreta (26/35; 74,28%), moderada (9/35; 25,71%) e acentuada (1/35; 2,85%), acompanhada de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

Pneumonia intersticial multifocal acometeu 13/35 (37,14%) dos casos, com grau de intensidade da lesão variando de discreto (9/13; 69,23%) a moderado (4/13; 30,74%), presença de infiltrado histiocítico e neutrofílico discreto (Fig. 3). Edema pulmonar foi constatado em 6/35 (17,14%) dos casos e congestão pulmonar em 9/35 (25,71%).

Esplenite necrotizante multifocal foi visualizada em 18/35 (51,42%) dos casos, variando de discreta (16/18; 88,9%) a moderada (2/18; 11,2%), com infiltrado histiocítico e neutrofílico discreto a moderado. Hiperplasia de polpa branca foi evidenciada em 4/35 (11,42%) dos casos.

Outras lesões histopatológicas como, congestão em meninge discreta e multifocal (1/35; 2,85%), miocardite linfo-plasmocítica e histiocítica moderada (4/35; 11,42%), congestão renal moderada (4/35; 11,42%), nefrite linfocítica discreta intersticial multifocal (2/35; 5,71%) e enterite linfo-histiocítica hemorrágica difusa moderada (1/35;

2,85%) foram observadas. Porém, não foram realizados testes de IHQ nesses fragmentos devido à escassez de amostras viáveis para o diagnóstico preciso.

Não foi possível a visualização de bradizoítos em cistos ou de taquizoítos, em alguns casos, pela microscopia com coloração em HE. No entanto, a realização da imunohistoquímica com marcação de anticorpo anti-*T. gondii* (Fig. 4) evidenciou estruturas compatíveis com os mesmos, sendo os cistos de bradizoítos mais visíveis a contagem, conforme **tabelas 3, 4 e 5**.

As formas parasitárias, independente se fossem taquizoítos ou cistos de bradizoítos, foram visualizadas adjacentes às áreas de lesão necrótica em cortes histológicos, porém em alguns casos raros, foram visualizadas estruturas compatíveis com *T. gondii* em áreas livres de lesões. Foram visualizados taquizoítos marcados pelo método de IHQ em 12 casos no pulmão e em 11 casos em baço sem que houvesse lesões significativas nos mesmos órgãos.

A investigação ambiental realizada constatou que os locais onde haviam mais de uma morte de PNH de vida livre pertenciam a regiões peri-urbanas com presença de gatos domésticos em diferentes idades com acesso livre a toda propriedade. Relatos apontam a convivência de PNH com os animais domésticos e consumo de alimentos em solo, principalmente resíduos orgânicos como folhagens, frutos e proteína animal descartados. Não foi relatado os locais nas propriedades onde os primatas poderiam ingerir água.

4. Discussão

A toxoplasmose é uma doença parasitária intracelular zoonótica, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, distribuída mundialmente, gerando infecções sistêmicas com alto grau de letalidade em PNM. A causa de tal susceptibilidade não foi determinada, porém é possível, dado seus hábitos arbóreos que dificultam o contato com o agente, que esses animais não estivessem aptos a desenvolver uma resposta imune de maneira eficiente no decorrer de sua evolução (INNES, 1997). No entanto, a perda de habitat por meio de desmatamento e crescimento urbano acentuado, e a manutenção em cativeiro de espécies propiciam vias de infecção (CARME et al. 2009).

Diversos estudos relatam toxoplasmose fatal em PNM de cativeiro (EPIPHANIO et al., 2003; CEDILLO-PELÁEZ et al, 2011; NISHIMURA et al, 2019). Apesar das fontes de infecções não serem totalmente esclarecidas, é provável que os animais se contaminem por meio da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos, visto

que é comum a presença de gatos domésticos errantes em zoológicos (NISHIMURA *et al*, 2019). Os relatos de casos envolvendo animais de vida livre são raros, porém evidenciam fontes de infecção semelhantes às de cativeiro, além da predação de animais sinantrópicos infectados, como ratos (CASAGRANDE *et al*, 2013; SANTOS *et al*, 2018).

Os gatos domésticos são, possivelmente, a principal fonte de contaminação ambiental, visto que a alta densidade populacional está ligada ao maior risco de exposição a esporozoítos de *Toxoplasma gondii* (AFONSO *et al*, 2008; GAO *et al*, 2016). Os primatas de cativeiro podem ser mais propensos a infecção devido ao fornecimento de alimentos inadequados e a limitação de acesso a áreas não contaminadas. No entanto, casos envolvendo animais de vida livre podem não ser documentados devido a sub notificação, a dificuldade de obtenção de amostras viáveis e a falha para diagnósticos precisos.

No presente estudo, a identificação da localização e caracterização do ambiente dos casos de toxoplasmose demonstra ocorrência em áreas rurais, peri-urbanas e urbanas, consequência da fragmentação e perda de habitat devido a desmatamento e urbanização no Distrito Federal – Brasil (SANTOS *et al*, 2014). Impactos dos fatores ambientais podem diminuir a diversidade biológica gerando desequilíbrio ecológico, criando condições favoráveis para propagação de parasitas e acometimento de espécies susceptíveis em determinados biomas.

O Distrito Federal possui o cerrado como bioma exclusivo e a ocorrência de *Callithrix penicillata* é abundante (MIRANDA *et al*, 2001), sendo justificado a maior prevalência dessa espécie no presente estudo. O grande volume de amostras analisadas é possível, devido ao envio de material para o Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV-UnB), reconhecido como referência no diagnóstico de enfermidades que acometem primatas da região, particularmente voltado para doenças infecciosas, como febre amarela, toxoplasmose e herpesvirose, participando ativamente na vigilância epidemiológica de doenças em animais domésticos e em fauna silvestre.

Os primatas e amostras foram encaminhados ao LPV-UnB para exames *post-mortem*, portanto, não foi possível estabelecer os sinais clínicos presentes nos casos. Os achados macroscópicos mais prevalentes foram, hepatomegalia, esplenomegalia e congestão pulmonar condizem com resultados encontrados por Epiphanyo *et al* (2003) presença de

linfadenite mesentérica em PNM. Santos et al (2018) relatam casos com presença de hemoperitônio, petéquias e equimoses em pulmões e rins e lipidose hepática em PNM.

Diversos outros estudos apresentam lesões semelhantes as encontradas (DUBEY, 2004; CEDILLO-PELÁEZ *et al*, 2011; CASAGRANDE *et al*, 2013) evidenciando que a toxoplasmose pode causar danos irreversíveis em diversos órgãos. A baixa prevalência de lesões macroscópicas pode indicar a natureza aguda da infecção nas espécies afetadas, onde o grau de acometimento é tão rápido que manifestações macroscópicas não ocorrem em tempo hábil.

Os achados anatomopatológicos encontrados evidenciam elevado grau de acometimento de fígado, pulmão e baço, caracterizados pela presença de hepatite necrotizante multifocal em 100% dos casos, esplenite necrotizante multifocal em 51,42% dos casos e pneumonia intersticial multifocal em 37,14% dos casos. Os infiltrados inflamatórios eram formados, predominantemente por células presentes em fases agudas de infecção, como neutrófilos e macrófagos, estando presentes em lesões discretas, moderadas e acentuadas.

A visualização de taquizoítos livres e cistos foram predominantes em casos com lesões moderadas e acentuadas. As lesões pulmonares foram caracterizadas como discretas e diversos casos não possuíam lesões dignas de nota. Estes achados são compatíveis com os apresentados em estudos prévios com PNM (EPIPHANIO, S. *et al*, 2003; CEDILLO-PELÁEZ *et al*, 2011; CASAGRANDE *et al*, 2013; SANTOS, S. *et al*, 2018), nos quais é relatado a presença de hepatite multifocal aleatória, pneumonia intersticial e esplenite. No entanto, outras lesões como hemossiderose pulmonar e hepática, glomerulonefrites, encefalites, broncopneumonias e linfadenites são relatadas pelos mesmos autores, porém não foram evidenciadas no presente estudo. Nishimura et al. 2019, relata que todos animais do estudo apresentaram pneumonia intersticial, o que não é constatado nas avaliações realizadas, isso pode ser devido a predisposição ligada às espécies, visto que neste estudo foram abordados *Saimiri* sp..

A divergência de prevalência das lesões nos diferentes estudos pode estar ligada à susceptibilidade do hospedeiro, visto que as infecções por toxoplasmose em calitriquídeos possuem caráter mais agudo que infecções em cebídeos (EPIPHANIO, S. *et al*, 2003). Outra causa para diferença de resposta à infecção, pode estar ligada à forma infectante de *T. gondii* (NISHIMURA *et al*, 2019), cuja determinação não foi possível no presente trabalho.

Maluenda, et al (2009) consideram como diagnóstico primário para toxoplasmose, o exame histopatológico, no qual é possível a visualização de estruturas piriformes a ovaladas, basofílicas que sugerem taquizoítos de *Toxoplasma gondii* livres ou no interior de macrófagos. A confirmação de que tais estruturas são formas infectantes de *T. gondii* é determinada através de testes de imuno-histoquímica (IHQ). Neste estudo, os casos foram submetidos à IHQ, avaliando fígado, pulmão e baço para confirmação do diagnóstico de *T. gondii*, em virtude de apresentarem lesões compatíveis com a doença e maior acometimento que os demais órgãos.

A confirmação de 35 casos dentre 38 suspeitos reforça a realização da IHQ para estabelecer um diagnóstico fidedigno para toxoplasmose. Foram observadas formas infectantes nos três órgãos-alvos, demonstrando maior visualização clara de parasitas no baço, tanto pela visualização com coloração em HE de cistos (12/35) e taquizoítos (20/35), quanto pela marcação com IHQ de cistos (18/35) e taquizoítos (29/35). Além de apresentar mais casos com formas infectantes, o baço também apresentou maior número de parasitas quando comparado aos demais órgãos. No pulmão, há maior predominância de taquizoítos marcados na IHQ, sendo visualizados em casos que não possuem lesões histopatológicas dignas de nota, porém, na avaliação por HE são observados poucos casos com formas infectantes, independente do estágio. No fígado, são visualizados cistos e taquizoítos, sendo mais prevalentes os taquizoítos marcados pela IHQ.

Santos et al (2018) relatam uma forte reação IHQ de cistos e taquizoítos de *T. gondii* em focos inflamatórios, independente do órgão. Pardini et al, 2015 relatam a presença de taquizoítos identificados por IHQ no fígado, baço, miocárdio e sistema nervoso central. Não foram identificados formas infectantes no encéfalo de nenhum caso do presente estudo. A presença de taquizoítos em órgãos sem lesão aparente reforçam a hipótese de uma susceptibilidade alta a infecções agudas e fatais em PNM. A visualização de formas infectantes no baço pode indicar um tropismo pelo órgão em calitriquídeos, visto que essa foi a espécie mais presente no estudo. No entanto, o acometimento grave do fígado pelas lesões e a presença de formas infectantes visualizadas em HE e IHQ indicam que a perda da função hepática pode ser a causa da morte desses animais.

A toxoplasmose é amplamente relatada e diversos estudos apresentam o caráter agudo e letal da infecção em PNM, porém não é comprovado como esses animais se contaminam e a razão para sua alta susceptibilidade a nível molecular. Além disso, não é determinada a prevalência de toxoplasma nas regiões apresentadas nesse estudo, sendo necessário maiores esclarecimentos dessas questões.

5. Conclusão.

O presente estudo comprova a ocorrência de infecções por *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos nas regiões abordadas, por meio de avaliações histopatológicas das lesões e visualização de formas parasitárias com o auxílio de técnicas de coloração HE e imuno-marcação por anti-*T.gondii*. O caráter crítico das lesões hepáticas comprova a susceptibilidade de PNH a infecção, em especial a espécie *Callithrix penicillata*, abundante no cerrado, bioma predominante da região. Não foi possível a padronização de um órgão exclusivo para o diagnóstico de toxoplasmose, porém por análises qualitativas, a visualização de formas parasitárias foi mais clara no baço, mesmo que as lesões acentuadas predominassem no fígado. No intuito de estabelecer um diagnóstico confiável, a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica de fígado e baço de *Callithrix penicillata* suspeitos de infecção por *T. gondii* pode ser realizada.

6. Referências Bibliográficas

AFONSO, E.; LEMOINE, M.; POULLE, M. L.; RAVAT, M. C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. **International Journal for Parasitology**, vol. 38, n. 8, p. 1017-1023, 2008.

CASAGRANDE, R.A.; SILVA, T.C.E.; PESCADOR, C.A.; BORELLI, V.; SOUZA JR, J.C.; SOUZA, E.R.; TRAVERSO, S.D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 33, n. 1, p. 94-98, 2013.

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

CEDILLO-PELÁEZ, C.; RICO-TORRES, C.P.; SALAS-GARRIDO, C.G.; CORREA, D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. **Veterinary Parasitology**, vol. 180, p. 368-371, 2011.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, vol. 126, p 57-72, 2004.

DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **Journal of Parasitology**, vol. 88, p. 713–717, 2002.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, L.; CATÃO-DIAS, J.L. Pathology of Toxoplasmosis in captive new world primates. **Journal of Comparative Pathology**, vol. 129, p. 196-204, 2003.

GAO, X.; WANG, H.; WANG, H.; QIN, H.; XIAO, J. Land use and soil contamination with *Toxoplasma gondii* oocysts in urban areas. **Science of the Total Environment**, vol. 568, p. 1086-1091, 2016.

INNES, E. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 20, p. 131–138, 1997.

MALUENDA, A.C.H.; CASAGRANDE, R.A., NEMER, V.C., KANAMURA, C.T.; TEIXEIRA, R.H.F.; MATUSHIMA, E.R. Infecção aguda fatal por *Toxoplasma gondii* em macaco barrigudo (*Lagothrix lagotricha*). **Clinical Veterinary**, vol. 81, p. 100-104, 2009.

MIRANDA, G.H.B.; FARIA, D.S. Ecological aspects of black-pincelled marmoset (*Callithrix penicillata*) in the cerradão and dense cerrado of the brazilian central plateau. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 61, n. 3, 2001.

NISHIMURA, M.; GOYAMA, T.; TOMIKAWA, S.; FERREIG, R.M.; EL-ALFY, E.S.N.E.; NAGAMUNE, K., KOBAYASHI, Y., NISHIKAWA, Y. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**, vol. 68, p. 79-86, 2019.

PARDINI, L.; DELLARUPE, A.; BACIGALUPE, D.; QUIROGA, M.A.; MORÉ, G.; RAMBEAUD, M.; BASSO, W.; UNZAGA, J.M.; SCHARES, G.; VENTURINI, M.C. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Parasitology International**, vol. 61, p. 587-590, 2015.

SANTOS, M.N.; DUARTE, M.H.L.; YOUNG, R.J. Behavioural and ecological aspects of black tufted-ear marmosets, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) (Primates: Callitrichidae) in a semiurban environment. **Revista de Etologia**, vol. 13, n. 1, p. 37-46, 2014.

SANTOS, S.V.; PENA, H.F.J.; TALEBI, M.G.; TEIXEIRA, R.H.F.; KANAMURA, C.T.; DIAZ-DELGADO, J.; GENNARI, S.M.; CATÃO-DIAS, J.L. Fatal toxoplasmosis in Southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical and molecular characterization. **Journal of Medical Primatology**, vol. 47, p. 124-127, 2018.

ZAGO, L.; MIRANDA, J.M.D.; NETO, C.D.; SANTOS, C.V.; PASSOS, F.C. Dieta de *Callithrix penicillata* (E. Geoffroy, 1812) (Primates, Callitrichidae) introduzidos na ilha de Santa Catarina. **Biotemas**, vol.26, n. 2, p. 227-235, 2013.

ANEXO I

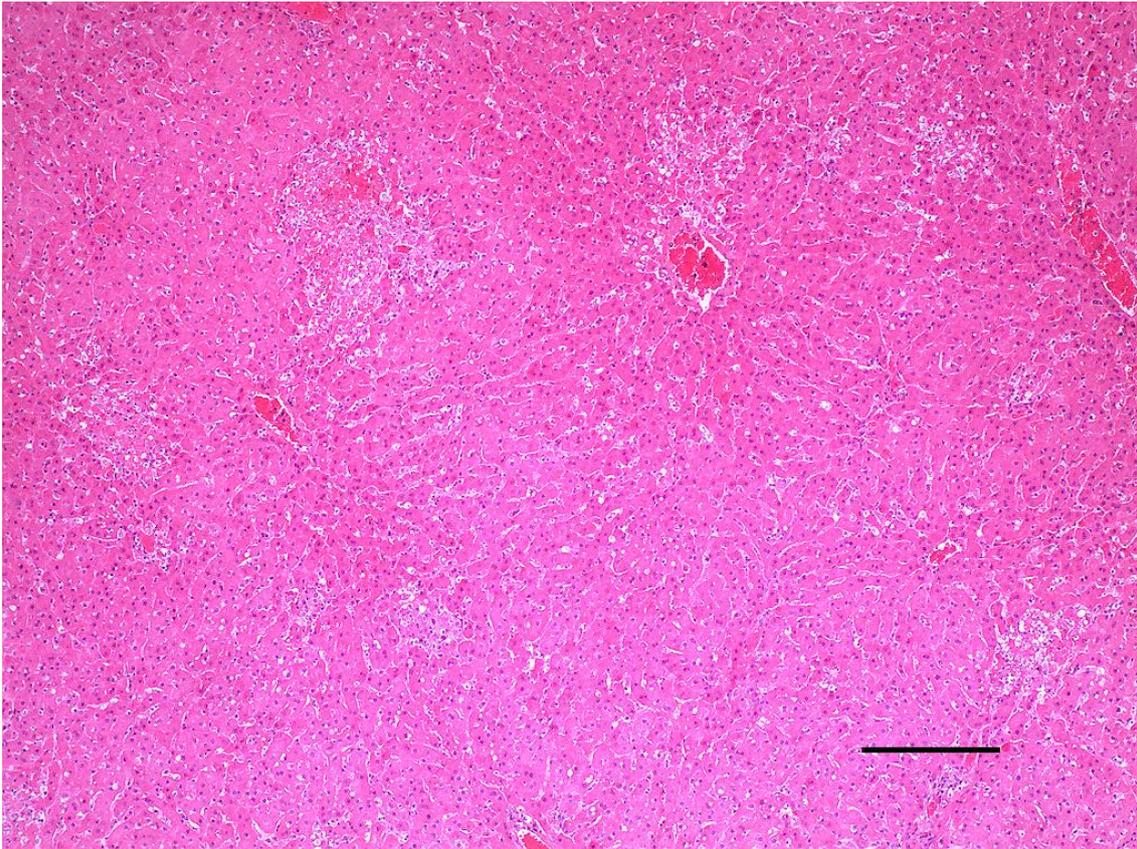


Figura 1. *Callithrix penicillata*. Fígado. Áreas de necrose multifocal aleatórias. H&E [Aumento 100x; Bar= 250 μ m].

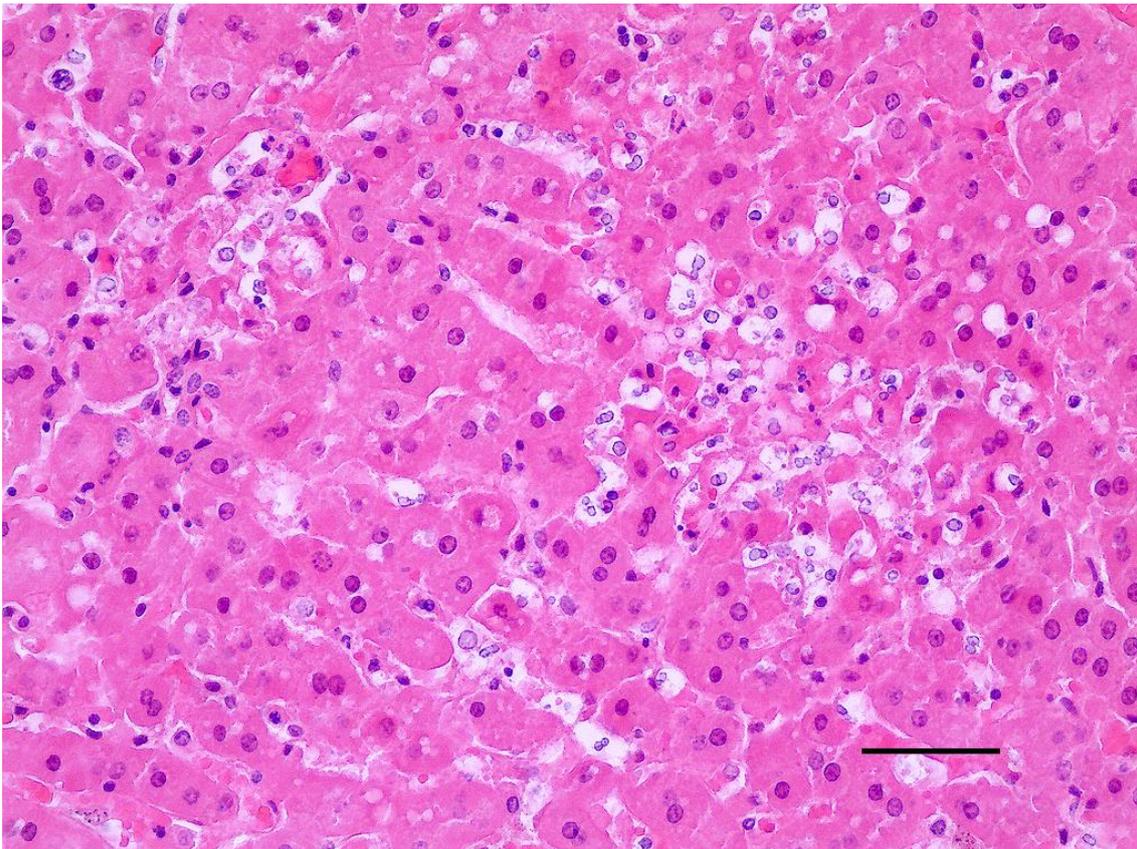


Figura 2. *Callithrix penicillata*. Fígado. Áreas de necrose multifocal, evidenciando macrófagos e neutrófilos íntegros e degenerados em meio aos cordões de hepatócitos. H&E [Aumento 200x; Bar= 50µm].

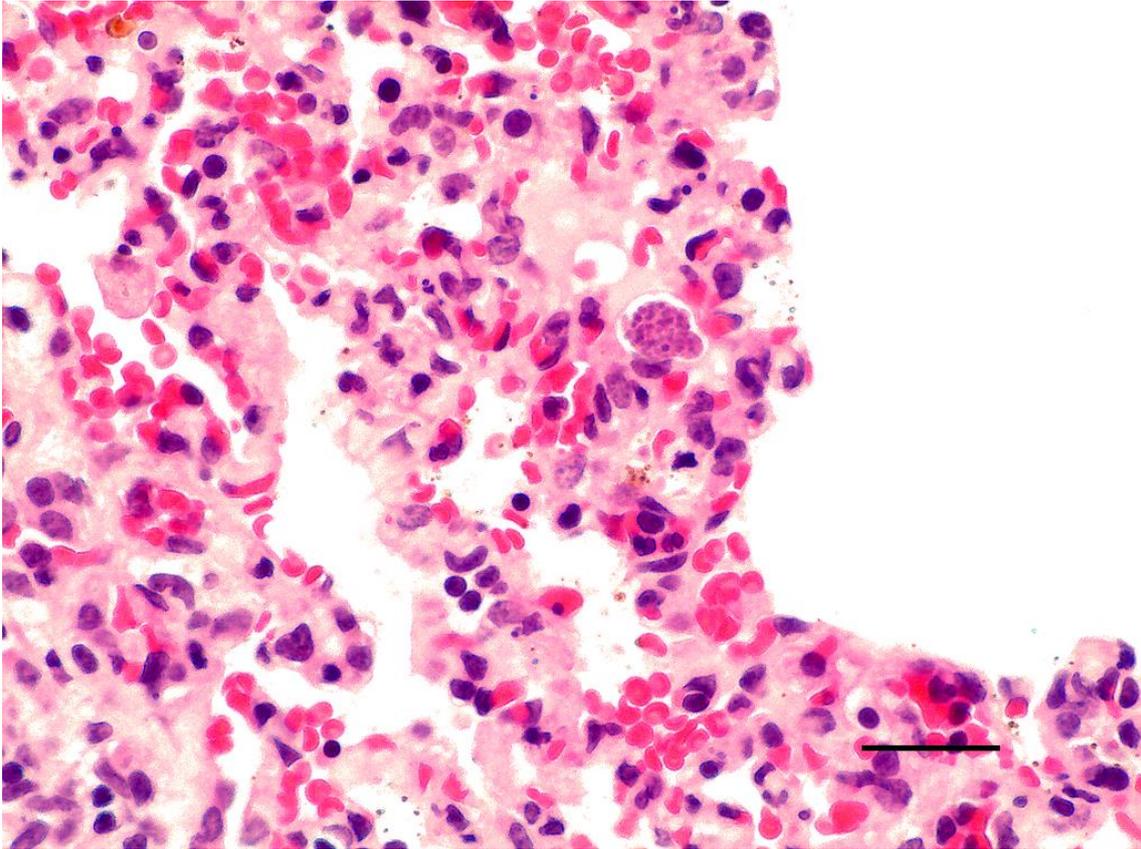


Figura 3. *Callithrix penicillata*. Pulmão. Cisto de *T. gondii* associado a espessamento de septos interalveolares e moderada inflamação intersticial linfoplasmocítica. H&E [Aumento 400x; Bar= 25 μ m].

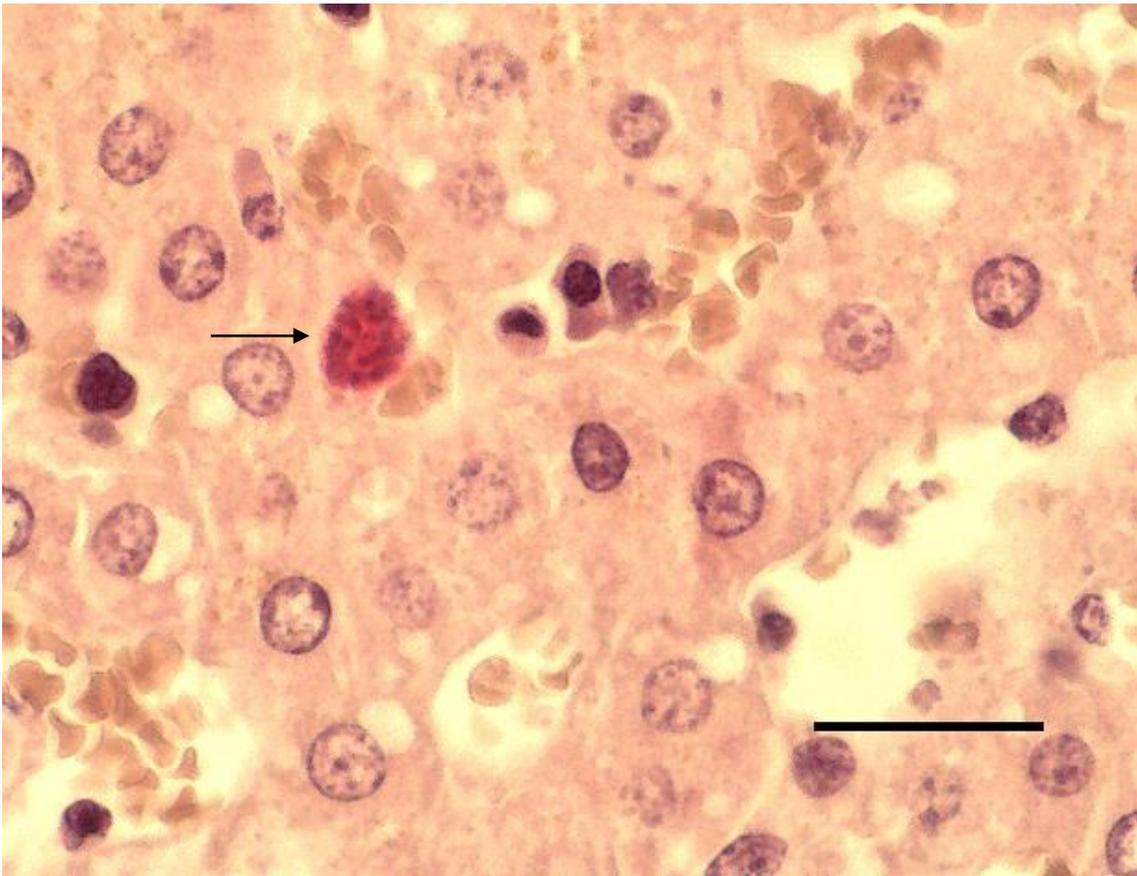


Figura 4. *Callithrix penicillata*. Fígado. Cisto de *T. gondii* (seta) marcado com anticorpo policlonal *anti-T. gondii*. Imunohistoquímica (IHQ). [Aumento 400x; Bar: 25 μm]

ANEXO II

Tabela 1. Casos de Toxoplasmose em primatas do novo mundo do DF e dos estados de GO, TO, MT.

Animal	Espécie	Local
1	<i>Saimiri boliviensis (cativeiro)</i>	Zoo-DF
2	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Vicente Pires- DF
3	<i>Leontopithecus chrysomela (cativeiro)</i>	Zoo-DF
4	<i>Leontopithecus chrysomela (cativeiro)</i>	Zoo-DF
5	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brasília- DF
6	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	SIA-DF
7	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brasília-DF
8	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brasília-DF
9	<i>Lagothrix lagotricha (cativeiro)</i>	Zoo-DF
10	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Alto Bonfim-GO
11	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Trindade-GO
12	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Luziânia- GO
13	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Planaltina-DF
14	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Planaltina-DF
15	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Planaltina-DF
16	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Lago Sul-DF
17	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Planaltina-DF
18	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Goiânia-GO
19	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brazlândia-DF
20	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brazlândia-DF
21	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brazlândia-DF
22	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Brazlândia-DF
23	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Porto Nacional-TO
24	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Porto Nacional-TO
25	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Porto Nacional-TO
26	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Goiânia-GO
27	<i>Aotus azarae (livre)</i>	Cuiabá-MT
28	<i>Callithrix penicillata (livre)</i>	Park way-DF

29	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Park way-DF
30	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Palmas-TO
31	<i>Aotus azarae</i> (livre)	Cuiabá-MT
32	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Trindade-GO
33	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Trindade-GO
34	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Ceilândia-DF
35	<i>Callithrix penicillata</i> (livre)	Ceilândia-DF

Tabela 2. Lesões histopatológicas compatíveis com *Toxoplasma gondii* em fígado, baço e pulmão de primatas do novo mundo.

Nome científico	N	Hepatite	Esplenite	Pneumonia
<i>A. azarae</i>	2	2 (100%)	1 (50%)	0
<i>C. penicillata</i>	29	29 (100%)	14 (48,27%)	11 (37,93%)
<i>L. lagotricha</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	0
<i>L. chrysomela</i>	2	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)
<i>S. boliviensis</i>	1	1 (100%)	1 (50%)	1 (50%)

Tabela 3. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do fígado visando o diagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas do novo mundo.

Espécie	N	Sexo			Cistos HE	Cistos IHQ	Taquizoítos HE	Taquizoítos IHQ
		M	F	NI				
<i>A. azarae</i>	2	1	0	1	2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)
<i>C. penicillata</i>	29	12	16	1	15 (51,72%)	20 (68,96%)	18 (62%)	21 (72,41%)
<i>L. lagotricha</i>	1	1	0	0	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>L. chrysomela</i>	2	1	1	0	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
<i>S. boliviensis</i>	1	0	1	0	0	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)

Tabela 4. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do baço visando o diagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas do novo mundo.

Espécie	Sexo				Cistos HE	Cistos IHQ	Taquizoítos HE	Taquizoítos IHQ
	N	M	F	NI				
<i>A. azarae</i>	2	1	0	1	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)
<i>C. penicillata</i>	29	12	16	1	9 (31%)	15 (51,72%)	16 (55,17%)	25 (86,2%)
<i>L. lagotricha</i>	1	1	0	0	0	1 (100%)	1 (100%)	0
<i>L. chrysomela</i>	2	1	1	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	2 (100%)
<i>S. boliviensis</i>	1	0	1	0	1 (100%)	0	0	0

Tabela 5. Detecção de cistos e taquizoítos com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e exame imuno-histoquímico (IHQ) do pulmão visando o diagnóstico da infecção por *T. gondii*.

Espécie	N	Sexo			Cistos HE	Cistos IHQ	Taquizoítos HE	Taquizoítos IHQ
		M	F	NI				
<i>A. azarae</i>	2	1	0	1	0	0	0	0
<i>C. penicillata</i>	9	12	16	1	2 (6,89%)	9 (31%)	5 (17,24%)	22 (75,86%)
<i>L. lagotricha</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>L. chrysomela</i>	2	1	1	0	0	0	1 (50%)	0
<i>S. boliviensis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0

