

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**JESSÉ HENRIQUE TRUPPEL**

AVALIAÇÃO DO PARASITISMO EM CAPIVARAS  
(*Hydrochaeris hydrochaeris*) E SUA ATUAÇÃO COMO  
HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* E  
*Toxoplasma gondii*.

**CURITIBA-PR**

**2009**



**JESSÉ HENRIQUE TRUPPEL**

**AVALIAÇÃO DO PARASITISMO EM CAPIVARAS  
(*Hydrochaeris hydrochaeris*) E SUA ATUAÇÃO COMO  
HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* E  
*Toxoplasma gondii*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Parasitologia, Departamento de Patologia Básica e Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Fabiano Montiani Ferreira

**CURITIBA-PR**

**2009**

## **DEDICO ESTE TRABALHO:**

Aos meus pais, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional.

Aos mestres que souberam ensinar e guiar a direção correta para que esse crescimento seja possível e que continue indeterminadamente. Àqueles que nos inspiram e fazem sempre querer continuar e melhorar.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Acir Henrique Truppel e Zenilda Truppel, e meus irmãos Thiago C. Truppel e Eduardo J. Truppel, pela família, amor e compreensão nos momentos difíceis. Por estarem sempre presentes, mesmo quando ausentes.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol por ser mestre no sentido literal que a denominação confere. Um exemplo de amor à profissão, que conduz seus alunos e a ciência com excelência, garra, força, motivação, inspiração e muito conhecimento. Agradeço pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Fabiano Montiani-Ferreira que também se faz excepcional na arte de ser mestre. Agradeço pela orientação, pela amizade, pelo exemplo a ser seguido. Poucos são brilhantes e inspiradores, esse é um diferencial que não vou deixar de seguir.

Ao Professor Luis Felipe Caron pela orientação, apoio, incentivo e amizade. Agradeço pelo exemplo e por todo o ensinamento adquirido.

Ao Professor Rogério Ribas Lange pelos ensinamentos, amor à profissão, pelo exemplo de profissional e pessoa, pelos aconselhamentos, incentivo e amizade.

Ao Professor Dr. Ricardo Vilani pela amizade, exemplo e auxílio imprescindível nesse trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Márcia Arzua e à Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina Castellano Margarido por todo auxílio prestado no decorrer desse estudo, pela amizade e incentivo.

Ao pessoal do Zoológico da cidade de Curitiba, Estado do Paraná e à médica veterinária Oneida Lacerda pelo auxílio imprescindível para a realização dessa pesquisa.

Ao Professor Dr. Marcelo Labruna pela gentil concessão de DNA de *Rickettsia* sp utilizado como controle positivo no diagnóstico molecular de riquetsias em capivaras.

Ao Professor Dr. Walter Antônio Pereira Boeger e à bióloga Luciana Patella De Azambuja por possibilitarem o seqüenciamento das amostras de ITS1.

À Professora Dra. Solange Gennari e à Dra. Lúcia Oishi Yai, por viabilizar e tornar possível a aquisição do conjugado anti-capivara utilizado na reação de imunofluorescência indireta.

Aos alunos de iniciação científica Renata Souza Hyczy, Fernanda Alcântara e Aline Macedo pela amizade e auxílio em muitas etapas desse trabalho.

Ao corpo docente do curso de Pós-graduação do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Professora Dr.<sup>a</sup> Edilene Alcântara de Castro pelos ensinamentos, incentivo e auxílio.

À Juliana Tracz e Luciane Hennig, técnicas de nível superior do Laboratório de Parasitologia Molecular, do Departamento de Patologia Básica pela amizade, ensinamentos, auxílios e compreensão.

Aos pós-graduandos do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná: Nelson Luis M. Fernandes, Silvia C. Osaki, Ellen de Souza Marquez, Guilherme Garcia pelos auxílios e incentivos oferecidos no decorrer desse trabalho.

Às pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

À Universidade Federal do Paraná por acolher grandes mestres e pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE QUADROS .....	xviii
LISTA DE SIGLAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xx
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xx
INTRODUÇÃO .....	01
Resumo .....	02
Abstract .....	03
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	04
REFERÊNCIAS .....	08
CAPÍTULO I: O HOSPEDEIRO - CAPIVARA <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (LINNAEUS, 1766) .....	10
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
1.1. HISTÓRIA E CLASSIFICAÇÃO DE <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766 .....	11
1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE .....	12
1.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	14
2. ASPECTOS LEGAIS .....	15
3. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	15
REFERÊNCIAS .....	17
ANEXO .....	19



<b>CAPÍTULO II: PREVALÊNCIA DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CAPIVARAS (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ .....</b>	<b>22</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>23</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>24</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
2.1. COLETA DE FEZES .....	27
2.2. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS .....	27
2.2.1. Técnica de Sedimentação espontânea .....	27
2.2.2. Técnica de Flutuação em solução saturada de cloreto de sódio .....	28
2.2.3. Técnica de Centrífugo-Flutuação em Sulfato de Zinco .....	28
2.2.4. Técnica de Tamização .....	28
2.3. NECROPSIA .....	28
2.3.1. Exame direto .....	29
2.3.2. Termohidrotropismo .....	29
2.4. FIXAÇÃO E COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE CARMIM CLORÍDRICO REGRESSIVO .....	29
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

<b>CAPÍTULO III: A CAPIVARA (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766)</b>	
<b>COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE</b>	
<b><i>Neospora caninum</i> DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER &amp;</b>	
<b>UGGLA, 1988 .....</b>	<b>47</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>48</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>52</b>
2.1. HISTÓRIA E CLASSIFICAÇÃO DE <i>Neospora caninum</i> .....	52
2.2. MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE <i>N. caninum</i> .....	54
2.2.1. Taquizoítos .....	54
2.2.2. Cistos teciduais e bradizoítos .....	56
2.2.3. Oocistos .....	56
2.3. TRANSMISSÃO .....	57
2.3.1. Transmissão de <i>N. caninum</i> nos hospedeiros definitivos .....	59
2.3.2. Transmissão de <i>N. caninum</i> nos hospedeiros intermediários .....	61
2.3.2.1. Transmissão vertical (congênita) .....	61
2.3.2.2. Transmissão horizontal (pós-natal) .....	62
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
3.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	62
3.2. CONTENÇÃO QUÍMICA E LABORATÓRIO DE CAMPO .....	62
3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS CAPIVARAS .....	64
3.4. COLETA DAS AMOSTRAS .....	64
3.4.1. Sangue .....	64
3.4.2. Fígado .....	64
3.4.3. Necropsia .....	65
3.5. ANÁLISE MOLECULAR .....	66
3.5.1. Extração de DNA .....	66
3.5.1.1. Técnica de extração de DNA por esferas magnéticas.....	66
3.5.1.2. Técnica de extração de DNA pela membrana de sílica.....	67

3.5.1.3. Técnica de extração de DNA pelo fenol-clorofórmio .....	67
3.5.1.4. Análise do DNA extraído .....	69
3.5.2. Reação em cadeia da polimerase .....	69
3.5.2.1. Região Nc5 .....	70
3.5.2.2. Região ITS1 .....	71
3.5.2.3. Identificação dos produtos da PCR .....	72
3.5.3. Seqüenciamento de região ITS1 DE <i>Neospora caninum</i> .....	72
3.5.3.1. Purificação .....	72
3.5.3.2. Quantificação .....	73
3.5.3.3. Reação de seqüenciamento .....	73
3.5.3.4. Precipitação e seqüenciamento .....	73
3.5.3.5. Análise das seqüências de ITS1 .....	74
<b>4. RESULTADOS</b> .....	74
4.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	74
4.2. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE ITS1 .....	79
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>ANEXOS</b> .....	97
ANEXO 1 - PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de tecidos pelo “ChargeSwitch® gDNA Mini-Tissue Kit” .....	98
ANEXO 2 - PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de sangue pelo “illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit” .....	100
ANEXO 3 - PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de tecido pelo método de fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook e Russel (2001) .....	101
ANEXO 4 - <b>Tabela 3</b> - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA de <i>Neospora caninum</i> em reações com os pares de iniciadores Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np4 .....	103
ANEXO 5 - <b>Tabela 4</b> - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA da região ITS1 de <i>Neospora caninum</i> .....	103
ANEXO 6 - PROTOCOLO: Técnica da reação de seqüenciamento de ITS1 .....	104

<b>CAPÍTULO IV: A CAPIVARA (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766)</b>	
<b>    COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE</b>	
<b>        <i>Toxoplasma gondii</i> NICOLLE e MANCEAUX, 1908 .....</b>	<b>106</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>107</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>108</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>113</b>
2.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	113
2.2. AMOSTRAGEM .....	113
2.2.1. Contenção química .....	113
2.2.2. Coleta das amostras .....	113
2.3. ANÁLISE SOROLÓGICA .....	113
2.4. ANÁLISE MOLECULAR .....	115
2.4.1. Extração do DNA .....	115
2.4.2. Reação em cadeia da polimerase .....	115
2.4.2.1. Gene B1 .....	115
2.4.2.2. Região ITS1 .....	116
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>117</b>
3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	117
3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	119
3.3. CO-INFECÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> EM	
CAPIVARAS .....	123
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>125</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>128</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>135</b>
<b>Tabela 4 - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para</b>	
<b>amplificação de fragmento do gene B1 do DNA de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>136</b>

<b>CAPÍTULO V: ANÁLISE DA CONDIÇÃO SANITÁRIA DAS CAPIVARAS</b>	
<b>(<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766) DO PARQUE</b>	
<b>TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ .....</b>	<b>137</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>138</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>139</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>140</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>141</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	141
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	141
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>142</b>
3.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	142
3.2. AMOSTRAGEM .....	142
3.2.1. Contenção química .....	142
3.2.2. Coleta das amostras .....	142
3.2.2.1. Pele e sangue periférico .....	142
3.3. ANÁLISE SOROLÓGICA .....	143
3.4. ANÁLISE MOLECULAR .....	143
3.4.1. Extração do DNA .....	143
3.4.2. Reação em cadeia da polimerase .....	144
3.5. GOTA-ESPESSA, MICRO-HEMATÓCRITO E DISTENSÃO DELGADA DE SANGUE PERIFÉRICO .....	148
3.6. CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	149
3.7. CULTIVO <i>IN VIVO</i> .....	149
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
4.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	149
4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	149
4.3. GOTA-ESPESSA, MICRO-HEMATÓCRITO E DISTENSÃO DELGADA DE SANGUE PERIFÉRICO .....	150
4.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	150
4.5. CULTIVO <i>IN VIVO</i> .....	150

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	150
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	153
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	154
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	155
<b>GLOSSÁRIO</b> .....	157
<b>ANEXO</b> .....	163

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I O HOSPEDEIRO - CAPIVARA *Hydrochaeris hydrochaeris* (LINNAEUS, 1766)

- Figura 1:** Dois espécimes de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) localizados próximos ao lago e em área de vegetação, no parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Note as orelhas curtas, olhos e narina situados na porção superior da cabeça e o acentuado dimorfismo sexual de macho (esquerda) e fêmea (direita). Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008 ..... 14
- Figura 2:** Mapa de distribuição geográfica da capivara. Fonte: Wikipédia, 2009 ..... 15
- Figura 3:** Vista aérea da área de estudo, Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Presença de mata, áreas para pastagem, lagos, ilhas e proximidade a áreas urbanizadas. Fonte: Wikipédia, 2009 ..... 16

### CAPÍTULO II PREVALÊNCIA DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ

- Figura 1:** Perfil parasitário e prevalência de infecção por parasitos gastrintestinais em capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná ..... 31
- Figura 2:** Representação de alguns ovos e oocistos encontrados nas fezes das capivaras analisadas. (A) *Trichuris* spp; (B) ovo de estrogilídeo; (C), (D) e (E) ovo de *Strongyloides chapini*. Observe a delgada membrana e a larva no interior do ovo; (F) Oocistos de Sarcocystidae não esporulados encontrados nas fezes de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná .. 32
- Figura 3:** Exemplar de *Fasciola hepatica* encontrado nas vias biliares extra-hepáticas de capivara submetida à necropsia. Coloração: Carmin clorídrico regressivo ..... 33

**CAPÍTULO III A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988**

- Figura 1:** Formas parasitárias de *N. caninum*. (A) Nessa imagem podem ser observados diferentes taquizoítos (coloração de Giemsa). A forma e tamanho dos taquizoítos variam conforme o estágio de divisão e corte histológico: a- taquizoíto alongado; b- antes da divisão; c- três taquizoítos em divisão e comparados em tamanho com uma hemácea (seta); (B) secção histológica de um cisto contendo no seu interior os bradizoítos identificados pela seta aberta (coloração de hematoxilina e eosina). Entre as setas fechadas a espessura da parede do cisto; (C) oocisto não esporulado (escala 10 µm); (D) oocisto esporulado contendo dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos (escala 10 µm). Fonte: adaptado de Dubey *et al.* (2007) ..... 58
- Figura 2:** Esquematisação do método de captura e deslocamento das capivaras avaliadas nesse estudo. (A) Uso de zarabatana para disparo de dardo anestésico objetivando a contenção química de capivaras contidas em brete após ceva; (B) Capivara atingida pelo dardo após indução anestésica; (C) Deslocamento da capivara contida quimicamente; (D) Início do trabalho de identificação e biométrico e deslocamento do animal ao laboratório de campo. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008 ..... 63
- Figura 3:** Método de coleta de fragmento de parênquima hepático (A) e sangue (B) de capivara. (A) Obtenção da imagem do fígado com transdutor 7,5 MHz, inserção da agulha de biópsia em direção ao órgão para realização da biópsia hepática; (B) Coleta de sangue da veia femoral de capivara contida quimicamente. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008..... 65
- Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np7 e Np4. Os fragmentos amplificados indicam a presença de DNA de *N. caninum* em capivaras ..... 75
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np21 e Np6. Os fragmentos amplificados indicam a presença de DNA de *N. caninum* em capivaras ..... 76
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np21 e Np4 ..... 77
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de *N. caninum* utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5 ..... 79



<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>A CAPIVARA (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE <i>Toxoplasma gondii</i> NICOLLE e MANCEAUX, 1908</b>	
<b>Figura 1:</b>	Potencial de transmissão de <i>T. gondii</i> ao homem pelo consumo de carnes de animais de produção e caça. Adaptado de Tenter <i>et al.</i> (2000) .....	112
<b>Figura 2:</b>	Percentual de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, PR, reagentes na detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> pela técnica de imunofluorescência indireta e titulação correspondente .....	118
<b>Figura 3:</b>	Percentual de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, PR, reagentes na detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> pela técnica de imunofluorescência indireta de acordo com o sexo (titulação $\geq 1:16$ ).....	118
<b>Figura 4:</b>	Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de <i>N. caninum</i> (A) e de <i>T. gondii</i> (B) utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5 .....	120
<b>Figura 5:</b>	Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação de fragmento do gene B1 de <i>T. gondii</i> .....	121
<b>Figura 6:</b>	Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de <i>T. gondii</i> utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5 .....	122
<b>Figura 7:</b>	Prevalência de infecção de <i>T. gondii</i> (imunofluorescência indireta e PCR de gene B1 e ITS1), de <i>N. caninum</i> (PCR de região Nc5 e ITS1) e da co-infecção por <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> em capivaras, Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. No eixo das ordenadas número total de animais pesquisados .....	123
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>ANÁLISE DA CONDIÇÃO SANITÁRIA DAS CAPIVARAS (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> LINNAEUS, 1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ</b>	
<b>Figura 1:</b>	Demonstração do método de coleta da pele da orelha (A) e do sangue periférico (B) em capivara contida quimicamente. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008 .....	143

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO II: PREVALÊNCIA DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ**

- Tabela 1:** Prevalência de infecção por parasitos gastrintestinais encontrados nas capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná para cada técnica de exame diagnóstico utilizada ..... 33

### **CAPÍTULO III: A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988**

- Tabela 1:** Características dos iniciadores utilizados na detecção da região Nc5 de *Neospora caninum* no sangue, fígado, coração, baço e linfonodos de capivaras ..... 70

- Tabela 2:** Relação de tecidos e total de capivaras positivas para as duas seqüências alvo do DNA de *N. caninum* utilizados nessa pesquisa (Nc5 e ITS1). Prevalência de infecção considerando cada um dos testes, ambos os testes ou os dois testes associados..... 78

- Tabela 3:** Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA de *Neospora caninum* em reações com os pares de iniciadores NP21/NP6, NP21/NP4 e NP7/NP4. .... 103

- Tabela 4:** Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA da região ITS 1 de *Neospora caninum* ..... 103

**CAPÍTULO IV: A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Toxoplasma gondii* NICOLLE e MANCEAUX, 1908**

<b>Tabela 1:</b> Características dos iniciadores utilizados na detecção do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> no sangue, fígado, coração, baço e linfonodos de capivaras .....	116
<b>Tabela 2:</b> Relação de tecidos e total de capivaras positivas para as duas seqüências alvo do DNA de <i>T. gondii</i> utilizados nessa pesquisa (gene B1 e ITS1). Prevalência de infecção considerando cada um dos testes, ambos os testes ou os dois testes associados.....	120
<b>Tabela 3:</b> Resultados da pesquisa sorológica (IFI) e molecular (PCR) de <i>T. gondii</i> e de <i>N. caninum</i> nas capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Prevalência de infecção para cada umas das técnicas utilizadas e resultados da co-infecção <i>T. gondii</i> / <i>N. caninum</i> .....	124
<b>Tabela 4:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do gene B1 do DNA de <i>T. gondii</i> .....	136

**CAPÍTULO V ANÁLISE DA CONDIÇÃO SANITÁRIA DAS CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ**

<b>Tabela 1:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de <i>T. cruzi</i> (Kirchhoff <i>et al.</i> , 1996) .....	144
<b>Tabela 2:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de <i>T. rangeli</i> (Vargas <i>et al.</i> , 2000) .....	145
<b>Tabela 3:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de <i>L. amazonensis</i> (Mimori <i>et al.</i> , 1998) .....	146
<b>Tabela 4:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de <i>L. braziliensis</i> (Mimori <i>et al.</i> , 1998) .....	147
<b>Tabela 5:</b> Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do gene <i>gltA</i> de <i>Rickettsia</i> spp. (Labruna <i>et al.</i> , 2004) .....	148

## LISTA DE QUADROS

### **CAPÍTULO I: O HOSPEDEIRO - CAPIVARA *Hydrochaeris hydrochaeris* (LINNAEUS, 1766)**

**Quadro 1:** Classificação taxonômica da espécie *Hydrochaeris hydrochaeris*, segundo Carleton (1984) ..... 12

### **CAPÍTULO III: A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988**

**Quadro 1:** Classificação taxonômica da espécie *N. caninum* e *N. hughesi*. 54

## LISTA DE SIGLAS

BHI	- "Brain Heart Infusion"
BLAST	- "Basic Local Alignment Search Tool"
CA	- Califórnia
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	- Desoxinucleotídeos trifosfatos
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	- "European Food Safety Authority"
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
gDNA	- Ácido desoxirribonucléico genômico
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFI	- Imunofluorescência indireta
ITS1	- "Internal Transcribed Spacer"
NaCl	- Cloreto de sódio
NCBI	- "National Center for Biotechnology Information"
NNN	- "McNeal, Novy, Nicolle"
PBS	- Tampão salina fosfato
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEG	- Polietilenoglicol
RNA	- Ácido ribonucléico
Sanepar	- Companhia de Saneamento do Paraná
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UK	- "United Kingdom"
USA	- "United States of America"
UV	- Ultravioleta

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	- Adenina
C	- Citosina
F	- fêmea
IgG	- Imunoglobulina G
G	- Guanina
M	- macho
pb	- pares de base
qsp	- quantidade suficiente para
T	- Timina

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- grau centígrado
°GL	- grau Gay-Lussac
Hz	- Hertz
Kg	- quilograma
mg	- miligrama
MHz	- megaHertz
mM	- milimolar
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
µm	- micrômetro
µL	- microlitro
V	- Volt

# INTRODUÇÃO

## Resumo

O crescimento da população de capivaras é favorecido por ações do homem sobre o meio ambiente. Existe no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná condições que favorecem o aumento exponencial da população desses animais. Esse fato, aliado à proximidade com animais domésticos e o homem, pode possibilitar a transmissão de patógenos que utilizam a capivara como reservatório ou hospedeiro. Com o objetivo de determinar os riscos que esses roedores representam para a saúde pública, foi investigado no presente estudo a sua condição sanitária. Para tanto, vinte e seis capivaras foram capturadas e avaliadas para infecção por esporozoários, tripanossomatídeos e riquetsias. Paralelamente, foram coletadas amostras de fezes (n=53) e três animais foram necropsiados para avaliação da fauna parasitária gastrointestinal. As amostras investigadas na pesquisa de esporozoários, tripanossomatídeos e riquetsias foram: sangue total, soro, fígado, baço, coração e linfonodos. O diagnóstico de esporozoários foi realizado pelas técnicas de imunofluorescência (IFI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento de DNA; de tripanossomatídeos pelas técnicas de IFI, PCR, cultivo *in vivo*, *in vitro*, microhematócrito, esfregaço por distensão delgada e gota espessa; e de riquetsias pela técnica de PCR. A fauna parasitária gastrointestinal foi avaliada por exames coproparasitológicos e pela análise direta em necropsia. Foi verificado que as capivaras do parque Tingüi apresentam infecção pelos parasitos: *Protozophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, estrongilídeos, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp, *Eimeria* spp, *Fasciola hepatica*, *Monoecocetus* spp, ascarídeos e sarcocistídeos, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Foram obtidos resultados negativos para a infecção por *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Desses, os parasitos que podem eventualmente infectar o homem são *F. hepatica* e *T. gondii* e aqueles que podem infectar animais domésticos são *F. hepatica*, *N. caninum* e *T. gondii*. Esses resultados demonstram que as capivaras do Parque Tingüi representam um risco mínimo para a saúde do homem e outros animais que habitam a área e que possuem contato próximo com esses roedores. Contudo, estudos de monitoramento são necessários para prevenir futuros surtos de zoonoses.

**PALAVRAS-CHAVE:** tripanossomatídeos, esporozoários, riquetsias, parasitos gastrointestinais, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), epidemiologia, zoonose.



### Abstract

The growth of the capybaras' population is favored by the action of the man on the environment. It exists in the Tingüi Park, city of Curitiba, Paraná State conditions that favor the increase of the population of these animals. This fact, ally to the proximity with domestic animals and the man, can make possible the transmission of parasites that use the capybara as a reservoir or host. To determine the risks that these rodents represent for the public health, its sanitary condition was investigated. Twenty and six capybaras were captured and evaluated for infection by sporozoan, trypanosomatids and rickettsial pathogens. Also, the gastrointestinal parasitic fauna were analysed by four different coproparasitologic techniques and necropsy. The samples analysed to diagnose the infection by sporozoan, trypanosomatids and rickettsiae were: blood, serum, liver, spleen, heart and lymph nodes. The diagnose of sporozoa was assessed using the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and polimerase chain reaction (PCR); trypanosomatids by IFAT, PCR, *in vivo* and *in vitro* culture, microhematocrit centrifuge technique, blood smear; and rickettsial pathogens by PCR. The capybaras evaluated in the present study were infected by: *Strongyloides chapini*, Strongyloidea, *Protozoophaga obesa*, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp., Ascaroidea, *Fasciola hepatica*, *Monoecocestus* spp., *Eimeria* spp., Sarcocystidae, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. And resulted negative for the infection by *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. Of these, the parasites that can eventually infect the man are *F. hepatica* and *T. gondii* and those that can infect domestic animals are *F. hepatica*, *N. caninum* and *T. gondii*. These results demonstrate that capybaras of the Tingüi Park represents a minimum risk for the health of the man and other animals that inhabit the area. However, future studies are necessary to prevent zoonosis outbreaks.

**Keywords:** trypanosomatids, sporozoan, rickettsial, gastrointestinal parasites capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), epidemiology, zoonosis.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Ainda são imensuráveis e indeterminados todos os impactos que resultam das ações do homem ao meio ambiente. À medida que esse intervém de forma explorativa e descontrolada sobre a natureza e ecossistemas, ocorrem modificações no ambiente, que muitas vezes podem fugir ao seu controle e, até mesmo, de seu conhecimento. Foi assim que, agindo explorativamente e de maneira despreocupada, o homem modificou ambientes e determinou alterações no ciclo biológico de muitos parasitos, resultando na expansão de doenças como: malária, leishmaniose, riquetsioses, doença de Chagas, febre amarela, entre outras.

O homem tem modificado o ambiente das capivaras, trazendo para perto de si esse mamífero que é o maior roedor do mundo. Esse evento ocorre por uma diversidade de fatores que, em geral, acabam determinando o desequilíbrio populacional da espécie. Tais fatores são, principalmente, a expansão da atividade agropecuária, o interesse econômico do mercado de produção de carnes e outros produtos de origem animal, o aumento da caça furtiva e desenfreada, a expansão das cidades e as medidas de conservação não planejadas ao longo prazo (Ferraz, 2001; Pinto, 2003).

Um dos principais fatores que contribui para o aumento exponencial das populações de capivaras resulta da destruição de áreas florestais para fins agropecuários. A substituição da mata nativa por áreas de culturas e pastagens propicia o ambiente ideal para o crescimento da população de capivaras, que são beneficiadas pela redução drástica de predadores naturais e pela maior disponibilidade de alimento. Aliado à alteração desses fatores básicos do ecossistema, estão presentes características intrínsecas da espécie que favorecem seu rápido crescimento, como o alto potencial reprodutivo, a resistência a doenças e a grande plasticidade alimentar e aproveitamento dos alimentos (Moreira e Macdonald, 1997; Vargas, 2005).

A aproximação da capivara ao ambiente doméstico também ocorre devido à tendência da incorporação de novas espécies animais na exploração pecuária. Esse evento representa mais uma alternativa no incremento da produção de carne e de outros produtos de origem animal (Ojasti, 1991). Muitas dessas espécies são oriundas da fauna selvagem, o que determina a adoção de cuidados especiais de manejo, já que além de medidas de conservação,

necessárias para evitar a extinção da espécie, também se faz necessário o conhecimento de aspectos biológicos básicos para que o sistema de produção seja eficiente e viável. Quando as adaptações necessárias para o sistema produtivo não são atendidas, conseqüências indesejáveis como a expansão populacional descontrolada, ou riscos à conservação da espécie e inviabilidade do sistema de produção também podem ocorrer (Nishida, 1995).

A capivara é uma espécie que apresenta características muito interessantes na adaptação aos sistemas de produção extensivo e semi-extensivo. São animais altamente prolíficos, resistentes a doenças, apresentam boa taxa de conversão alimentar e bom índice de aproveitamento de produtos como carne, couro e óleo. A carne da capivara apresenta excelentes propriedades nutricionais e possui paladar bastante apreciável, o que desperta grande interesse comercial, tanto no mercado nacional quanto no internacional, principalmente nas Américas do Sul e Central (Ojasti, 1991; Jiménez, 1995).

Contudo, para ser economicamente viável e representar uma maneira de exploração de fauna, sustentável e responsável, a espécie precisa ser mais estudada e conhecida. As parasitoses em capivaras ainda necessitam de maior estudo e conhecimento. Esse esclarecimento permitirá a redução das perdas econômicas causadas por parasitos e também irá possibilitar a adoção de medidas de prevenção em relação às zoonoses. Tanto aquelas causadas pelo convívio mais próximo da espécie, que pode ser reservatório de vários patógenos, quanto àquelas causadas pelo consumo de seus produtos.

Outra possibilidade, em que pode ocorrer a modificação do ambiente das capivaras, resulta das medidas de conservação e manejo que são adotadas para proteção da espécie. Essas medidas nem sempre são planejadas ao médio e longo prazo, e podem resultar em conseqüências indesejáveis, relacionadas, principalmente, ao controle populacional da espécie e à possibilidade de transmissão de patógenos ao homem e animais domésticos que habitam um ambiente em comum.

Sabe-se que os roedores em geral são reservatórios de muitos patógenos que causam doenças no homem e outros animais, como: leptospirose, peste negra, hantavirose, leishmaniose, doença de Chagas, entre outras. A capivara também é conhecidamente um reservatório de riquetsias, entre elas *Rickettsia rickettsii* que causa a febre maculosa, de *Leptospira interrogans*, que pode

infectar o homem e os animais domésticos e de produção, e de *Trypanosoma evansi* que causa o “mal-das-cadeiras” principalmente em eqüídeos (Muñoz e Chávez, 2001; Labruna *et al.*, 2002; Vasconcelos, 2002).

Contudo, ainda não se sabe, por exemplo, se o consumo da carne de capivara pode representar mais uma fonte de infecção por *Toxoplasma gondii*. Ou mesmo se esses animais são reservatórios de *Leishmania* spp. ou de outras espécies de *Trypanosoma*. Também não é conhecido se possuem parasitos intestinais que podem eventualmente infectar o homem e outros animais, como *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

É preciso encontrar um ponto de equilíbrio entre a conservação, exploração e manejo da espécie, pois o crescente aumento da população de capivaras e a aproximação do contato desse animal selvagem com o homem podem resultar na introdução de zoonoses. O que direta ou indiretamente complica as medidas de conservação da espécie. Assim, faz-se necessário o embasamento científico e esclarecimento à opinião pública sobre o uso sustentável da fauna selvagem, suas necessidades e conseqüências para que medidas e decisões coerentes possam ser assumidas.

O estudo, aqui apresentado, foi motivado principalmente pela preocupação em determinar as conseqüências que a intervenção do homem, no ambiente natural das capivaras, poderá resultar para a qualidade de vida desses animais, para o homem e outros animais.

Para tanto, pretende-se definir a condição sanitária das capivaras localizadas no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná, caracterizando seu potencial como reservatório e hospedeiro de alguns parasitos e bactérias.

Esses animais representam um modelo ideal para o estudo proposto, pois há uma superpopulação de capivaras no parque, sendo estimada uma população atual de cerca de 200 a 250 animais. Esse parque apresenta uma extensa área de mata e floresta e está localizado próximo à região central da cidade. Aliado ao controle populacional será também necessário pesquisar a possibilidade das capivaras da região atuarem como reservatórios de patógenos que representam problemas à saúde do homem e dos animais que convivem na área de estudo.

Também é importante ser investigada a fauna parasitária do aparelho digestório das capivaras, por duas razões principais: a) conhecer os parasitos que utilizam esse roedor como hospedeiro definitivo (interesse parasitológico); b) determinar se desses parasitos algum poderia ser responsável pela ocorrência de doenças no homem, como: *Fasciola hepatica*, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp (interesse para a saúde pública).

Considerando-se os fatores apresentados e a escassez de informações sobre a parasitologia em capivaras no Paraná e no Brasil, os objetivos desse estudo foram:

- Investigar a ocorrência e prevalência de parasitos gastrintestinais em capivaras do Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná;
- Investigar a ocorrência de infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em capivaras;
- Investigar a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* e *T. rangeli*, e verificar, a presença desses tripanosomatídeos em capivaras;
- Verificar a ocorrência de infecção por *Rickettsia* spp. nas capivaras residentes no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná;

Para melhor compreensão o trabalho será dividido em cinco capítulos. No primeiro será abordada a espécie animal, o segundo a fauna parasitária, o terceiro e o quarto sobre a infecção de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em capivaras respectivamente. No quinto capítulo será apresentada uma discussão geral sobre os dados obtidos nesse estudo, incluindo os resultados da pesquisa de *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. e *Rickettsia* spp.

## REFERÊNCIAS

FERRAZ, R.H.S. Estudo macro e microscópico da placenta de termo de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). São Paulo, 2001. 75f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

JIMENÉZ, I.G. El capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Estado actual de su producción. **Estudio FAO Produc. y Sanidad Anim.**, Roma, n. 122, p. 6; 7; 48, 1995.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet Parasitol.**, v.105, n. 1, p. 65-77, 2002.

MOREIRA, J.R.; MACDONALD, D.W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R.E. **Manejo e conservação da vida silvestre no Brasil**. Brasília, D.F.: CNPq / Belém, PA - Sociedade Civil Mamirauá, p.186-213, 1997.

MUÑOZ, K.; CHÁVEZ, A. *Trypanosoma evansi* isolated from capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, n. 7., p. 945-946, 2001.

NISHIDA, S.M. Biologia e manejo da capivara. Botucatu. Relatório FAO, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, 1995.

OJASTI, J. Human exploitation of capybara. In: Robinson, J.G.; Redford, K.H. (Ed.). Neotropical wildlife use and conservation. **Chicago: The University of Chicago Press**, p. 236-254, 1991.

PINTO, G.R.M. Contagem de fezes como índice de abundância de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Piracicaba, 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.

VARGAS, F.C. Estudo comparativo de duas populações de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no município de Pirassununga, SP. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

VASCONCELOS, S.A. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Int. Leptosp. Soc. Barbados**, p. 62, 2002.

**CAPÍTULO I:**  
**O HOSPEDEIRO - CAPIVARA**  
***Hydrochaeris hydrochaeris* (LINNAEUS, 1766)**



## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. HISTÓRIA E CLASSIFICAÇÃO DE *Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766

A palavra capivara que, na língua portuguesa, designa a espécie descrita por Linnaeus, 1766, deriva do idioma Guarani “*Kapijva*”, e significa “mestre dos gramados”. Do Tupi-Guarani também há a denominação “*caapi-guara*” ou “*caapi-goara*”, que respectivamente significam “comedor de capim” e “morador dos capinzais” (Vargas, 2005; Montiani-Ferreira *et al.*, 2008). Tais denominações estão diretamente relacionadas ao hábito alimentar do animal, que é herbívoro e relativamente seletivo ao tipo de forragem presente em seu ambiente.

Há várias outras designações populares à espécie, que variam muito conforme a região. Na América Latina em geral pode ser mesmo reconhecida como capivara ou “capibara”. Sendo que na Argentina e Paraguai também é denominada “capiguara” e “carpincho”. No Peru o animal é popularmente conhecido como “ronsoco” ou “samanai”. Na Venezuela “chigüiro”, no Panamá “poncho”, na Guiana Francesa “cochon d’Eau” ou “cabiari” e na Colômbia a maior variedade de denominações, onde pode ser conhecido como “Sancho”, “ponche”, “cabiari”, “pataseca”, “bocaeburro”, “dia-baj”, além do reconhecido “capibara”. Na língua inglesa a espécie é conhecida como “capybara”. Porém, vêm do alemão e do holandês as denominações historicamente mais interessantes, já que ambas significam literalmente “porco d’água, respectivamente: “wasserschwein” e “waterzuyn” (Jiménez, 1995; Ferraz, 2001).

Essas últimas designações referem o engano cometido por Linnaeus que, em 1766, no momento de sua descrição, acreditava que a espécie se tratava de um tipo de porco. Assim, a primeira nomenclatura científica aceita para a capivara foi *Sushydrochaeris* (EMBRAPA, 1986). Também já recebeu a designação *Hydrochoerus* para a denominação de gênero, a qual atualmente não é mais aceita (Moreira e Macdonald, 1997; Vargas, 2005).

A classificação taxonômica atual para a espécie, segundo Carleton (1984), é apresentada no Quadro 1.

CLASSIFICAÇÃO	TÁXON
REINO	Animalia
FILO	Chordata
CLASSE	Mammalia
ORDEM	Rodentia
SUBORDEM	Hystricognatha
INFRA-ORDEM	Caviomorpha
SUPERFAMÍLIA	Cavioidea
FAMÍLIA	Hydrochaeridae
SUBFAMÍLIA	Hydrochaerinae
GÊNERO	<i>Hydrochaeris</i>
ESPÉCIE	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>

**Quadro 1** - Classificação taxonômica da espécie *Hydrochaeris hydrochaeris*, segundo Carleton (1984).

## 1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE

A capivara é a maior espécie de roedor viva conhecida. São animais herbívoros, de hábitos semi-aquáticos, crepusculares e gregários, e a sua distribuição geográfica é limitada à presença de corpos d'água. Apresentam alto potencial reprodutivo, o número de filhotes concebidos por gestação varia de dois a cinco (Lavorenti, 1989), e possuem um período de gestação de 147 a 156 dias, sendo a média de 150 dias (Barbella, 1987; Ferraz, 2001).

Dentre as características morfológicas mais marcantes destacam-se a cauda vestigial, os membros curtos com dígitos unidos por membranas, sendo quatro dígitos no membro torácico e três no membro pélvico, olhos e narinas situadas na face superior da cabeça. Essas últimas características são adaptações para a vida aquática (Nishida, 1995). Um animal adulto atinge de 120 a 150 cm de comprimento, 50 a 65 cm de altura, com alguns indivíduos chegando até 90 kg de peso (Alho, 1986; Jiménez, 1995; Moreira e Macdonald, 1997).

As orelhas são pequenas, arredondadas, bastante móveis e com poucos pêlos. É o único roedor que apresenta glândulas sudoríparas em sua pele, porém essas são pouco desenvolvidas e muito esparsas, o que reforça a necessidade de água e áreas sombreadas para a regulação da temperatura corporal (Pinto, 2003).

Apresentam dimorfismo sexual, sendo o macho reconhecido pela presença de uma glândula supranasal bastante proeminente, a qual utiliza para demarcar seu território (Figura 1).

São animais monogástricos, mas que compensam sua capacidade digestiva em relação aos ruminantes, pela excelente trituração das forragens e pelo processo de fermentação que ocorre no ceco. Esse órgão, além de ser anatomicamente bem desenvolvido, apresenta populações de microrganismos que vivem em associação de mutualismo, digerindo os carboidratos estruturais da dieta da capivara com grande eficiência (Mendes, 1999).

Além da excelente trituração e fermentação do alimento, também se discute a possibilidade da coprofagia ou cecotrofia estarem envolvidos no processo de digestão. Na coprofagia o animal teria de ingerir as fezes depositadas no chão logo após a defecação (Moreira e Macdonald 1997). Na cecotrofia o animal teria de ingerir o cecotrofe, produto da fermentação resultante da digestão microbiana no ceco, diretamente da região anal, pelo próprio animal que o produziu (Mendes, 1999). Tais hipóteses podem explicar a boa digestibilidade do aparelho digestório da capivara e a sua conseqüente capacidade de transformar uma dieta rica em carboidratos estruturais em energia. Tais características podem interferir negativamente ou positivamente no ciclo biológico de alguns parasitos como discutiremos adiante.



**Figura 1** - Dois espécimes de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) localizados próximos ao lago e em área de vegetação, no parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Note as orelhas curtas, olhos e narina situados na porção superior da cabeça e o acentuado dimorfismo sexual de macho (esquerda) e fêmea (direita). Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008.

### 1.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A capivara é um animal que apresenta distribuição nas regiões de clima tropical e subtropical nas Américas Central e Sul, em áreas alagadiças próximas a rios e lagos. Mais precisamente, a espécie pode ser encontrada da região sul ao canal do Panamá ao norte da Argentina. Está amplamente distribuída por toda a América do Sul, indo até ao leste dos Andes. Essa distribuição inclui parte da Venezuela, Colômbia, Bolívia, Peru e Argentina, e a totalidade de países como as Guianas, Brasil, Uruguai e Paraguai (Figura 2). No Brasil a espécie só não ocorre na região de semi-árido no nordeste (Ojasti, 1991; Moreira e Macdonald, 1997).



**Figura 2** - Distribuição geográfica da capivara (Woods e Kilpatrick, 2005).

## **2. ASPECTOS LEGAIS**

A utilização da fauna selvagem no Brasil é regida pela Lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967, que proíbe a utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha desses animais. Permite a caça somente se peculiaridades regionais forem justificadas.

O projeto de pesquisa que possibilitou o estudo aqui apresentado foi aprovado e licenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Nº: 12459-1. Com data da emissão em 24/09/2007 e prazo de validade em 23/09/2008. O número de registro no IBAMA: 2068763 (Anexo).

## **3. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

Os animais avaliados nesse estudo estavam situados no Parque Tingüi localizado na cidade de Curitiba, Estado do Paraná. O nome do parque é uma homenagem aos índios Tingüis que habitavam a região na época da colonização portuguesa. Na entrada do parque está situada uma estátua representando o cacique Tindiqüera, da tribo Tingüi.

O parque está situado a 25°25' de latitude sul e 49°16' de longitude oeste. Consta de uma área total de 380.000m<sup>2</sup>, da qual grande parte é constituída de

áreas florestadas e de mata nativa. Apresenta uma ampla bacia hidrográfica, sendo o parque localizado às margens do rio Barigüi e contando da presença de ilhas artificiais e lagos (Figura 3).

Esse ambiente proporciona à população de capivaras excelente condições de alimento, água e abrigo, e praticamente impossibilita o controle por predadores. Esse modelo de estruturação favorece o crescimento exponencial e descontrolado da população. A grande proximidade das capivaras representa preocupação quanto à possibilidade de ocorrência de organismos patogênicos que possam infectar o homem e animais domésticos que habitam a mesma região.



**Figura 3** - Vista aérea da área de estudo, Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Presença de mata, áreas para pastagem, lagos, ilhas e proximidade a áreas urbanizadas. Fonte: <http://www.curitiba-parana.net/parques/tingui.htm> (Foto: C. Ruggi), 2009.

## REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. **Brasília, DF: EMBRAPA-DDT**, 48p. (EMBRAPA-DPP), 1986.

BARBELLA, S.L. Consideraciones generales sobre la gestación del chiguire (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Acta Cient. Venezol.**, Caracas, v. 38, p. 84-89, 1987.

CARLETON, M.D. Orders and families of recent mammals of the world. **New York: J. Knox Jones Jr.**, cap. 9, p. 255-265, 1984.

EMBRAPA. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. Departamento de Difusão de Tecnologia, Brasília, DF, 1986

FERRAZ, R.H.S. Estudo macro e microscópico da placenta de termo de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). São Paulo, 2001. 75f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

JIMENÉZ, I.G. El capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Estado actual de su producción. **Estudio FAO Produc. y Sanidad Anim.**, Roma, n. 122, p. 6; 7; 48, 1995.

LAVORENTI, A. Domestication and potential for genetic improvement of capybara. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, n. 3, p. 137-144, 1989.

MOREIRA, J.R.; MACDONALD, D.W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R.E. **Manejo e conservação da vida silvestre no Brasil**. Brasília, D.F.: CNPq / Belém, PA - Sociedade Civil Mamirauá, p.186-213, 1997.

MENDES, A. Determinação da ocorrência de cecotrofia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris* L. 1766). Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

MONTIANI-FERREIRA, F.; TRUPPEL, J.H.; TRAMONTIN, M.H.; VILANI, R.G.; LANGE, R.R.; The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. **Vet. Ophthalmol.**, v.11, n. 6, p. 386-394, 2008.

NISHIDA, S.M. Biologia e manejo da capivara. Botucatu. Relatório FAO, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, 1995.

OJASTI, J. Human exploitation of capybara. In: Robinson, J.G.; Redford, K.H. (Ed.). Neotropical wildlife use and conservation. **Chicago: The University of Chicago Press**, p. 236-254, 1991.

PINTO, G.R.M. Contagem de fezes como índice de abundância de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Piracicaba, 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.

VARGAS, F.C. Estudo comparativo de duas populações de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no município de Pirassununga. São Paulo, 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

WOODS, C. A.; KILPATRICK, C. W. *Infraorder Hystricognathi*. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, v. 2, p. 1538-1600, 2005.



# **ANEXO**



Ministério do Meio Ambiente - MMA

**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número: 12459-1</b>	<b>Data da Emissão: 24/09/2007 14:44</b>	<b>Data de Validade: 23/09/2008</b>
------------------------	--	-------------------------------------

## Dados do titular

Registro no Ibama: 2068763	Nome: Rogério Ribas Lange	CPF: 359.459.669-91
Título do Projeto: CENSO POPULACIONAL E DIAGNÓSTICO DO IMPACTO SANITÁRIO DE CAPIVARAS ( <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> ) NO PARQUE MUNICIPAL TINGÜI, CURITIBA-PR		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ		CNPJ: 75.095.679/0001-49

## Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.

## Outras ressalvas

1	Essa autorização permite somente a captura e manutenção das capivaras residentes no Parque Tingüi - Curitiba/PR, para análises de material biológico e posterior soltura dos mesmos no local de origem, não autorizando o abate e coleta dos exemplares.
---	--

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	MÁRCIA ARZUA	Coleta e transporte de ectoparasitos	360.359.809-10	21218090 II-PR-PR	Brasileira
2	Oneida Lacerda	Captura, coleta e transporte de animais e amostra biológica	839.046.629-53	3476925-7 II-PR	Brasileira
3	Lucyenne Giselle Popp Brasil Queiroz	Captura, coleta e transporte de animais e amostra biológica	320.774.839-20	14644199 I.I.PR-PR	Brasileira
4	Marcelo Bonat	Captura, coleta e transporte de animais e amostra biológica	516.439.609-20	37491314 II-PR	Brasileira
5	bianca chaim mattos	Coleta e transporte de animais e amostras biológicas	035.589.489-04	6125343-2 sesp-PR	Brasileira
6	Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani	Captura, coleta, transporte de animais e amostras biológicas	017.696.829-61	6322180-5 SSP-PR	
7	Manoel Lucas Javorouski	Captura, coleta e transporte de animais e amostra biológica	610.469.739-91	3686979-8 SSP-PR	Brasileira
8	Tereza Cristina Castellano Margarido	Captura, coleta e transporte de animais	608.520.628-34	56235850 -AC	

## Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (*Qtde: 30)

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

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

**Código de autenticação: 29442754**



**CAPÍTULO II:**  
**PREVALÊNCIA DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM**  
**CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS,**  
**1766) DO PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ**

## Resumo

A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) é o maior roedor vivo conhecido e apresenta ampla distribuição na América do Sul. Adquire cada vez mais importância devido, principalmente, ao potencial econômico que apresenta nos sistemas de exploração de produtos de origem animal, e pelo descontrolado crescimento de sua população em várias regiões do Brasil. Nesse cenário, é importante conhecer os parasitos que infectam esse animal, não só pelo conhecimento parasitológico, mas também para definir métodos de controle de doenças parasitárias, e prevenir a população quanto à possibilidade de ocorrência de zoonoses. Para tanto, tivemos como objetivo no presente estudo diagnosticar a fauna parasitária que infecta o trato digestório das capivaras residentes no Parque Tingüi, Curitiba, Estado do Paraná. Ao todo, foram coletadas 53 amostras de fezes, que foram analisadas pelos métodos de sedimentação espontânea, flutuação em solução hipersaturada de cloreto de sódio, flutuação em sulfato de zinco e tamização. Também foi realizada investigação de parasitos gastrintestinais pelo exame de necropsia em três capivaras. Os parasitos gastrintestinais encontrados, seja no exame de fezes ou necropsia, foram: *Strongyloides chapini* (56,6%), strongilídeos (49,1%), *Protozophaga obesa* (18,9%), *Capillaria hydrochoeri* (20,8%), *Trichuris* sp. (11,3%), ascarídeos (9,4%), *Fasciola hepatica* (9,4%), *Monoecocestus* spp. (13,2%), *Eimeria* spp. (45,3%), e sarcocistídeos (17%). Foram obtidos dados negativos para infecção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Do total de animais avaliados, 49 estavam parasitados, o que representa 92,4%. Tais resultados demonstram uma elevada e ampla infecção das capivaras, sendo que os animais positivos encontravam-se parasitados por uma até sete diferentes espécies de parasitos. Também foi observado que as capivaras não apresentavam sinais clínicos de infecção. Esse dado reforça as características que fazem desse roedor um excelente animal para o sistema de produção no manejo sustentável da fauna selvagem: são resistentes a doenças e possuem elevado potencial zootécnico. Os herbívoros, de forma geral, podem ser mantenedores e disseminadores da contaminação ambiental por ovos de *F. hepatica*. A presença de animais parasitados, mesmo que em baixa prevalência, é indicativo que o ciclo biológico do trematódeo está ocorrendo e por essa razão é necessário a continuidade de ações em educação de saúde, principalmente para os grupos de risco para a fasciolose.

**Palavras chave:** Helmintos, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), parasitos gastrintestinais, roedores, *Fasciola hepatica*, epidemiologia.

### Abstract

The capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) is the world's largest extant rodent and is present from south Panama, in Central America, into northern Argentina, being thoroughly distributed in South America. It acquires each time more importance in the national scene, mainly to the economic potential that represents in the exploration of its meat, and for the uncontrolled growth of its population in some regions of Brazil. In this scenario it is important to know the parasites that infect this animal, not only for the parasitological knowledge, but also to define methods of control of parasitic illnesses, and to prevent the population about zoonosis. In this way, the main objective of the present study was to diagnose the gastrointestinal parasitic fauna of capybaras living in the Park Tingüi, Curitiba, Parana State. Fifty and three fecal samples of these animals were collected, and analyzed by four different coproparasitologic techniques, which utilize the flotation and sedimentation principles. Additionally, during the period of this study, the Animal Pathology Service at UFPR received three adult dead capybaras. At necropsy, the gastrointestinal parasites were collected and analyzed. The parasites found in capybara's gastrointestinal tract were: *Strongyloides chapini* (56,6%), Strongyloidea (49,1%), *Protozoophaga obesa* (18,9%), *Capillaria hydrochoeri* (20,8%), *Trichuris* sp. (11,3%), Ascaroidea (9,4%), *Fasciola hepatica* (9,4%), *Monoecocestus* spp. (13,2%), *Eimeria* spp. (45,3%) and Sarcocystidae (17%). Of the 53 animals evaluated, 49 were infected, what represents 92.4% of the total. Our results show a high prevalence of parasitic infection and demonstrate that the capybara can be a potential reservoir of *Fasciola hepatica* in Curitiba, Parana State.

**Keywords:** Helminths, capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), gastrointestinal parasites, rodents, *Fasciola hepatica*, epidemiology.

## 1. INTRODUÇÃO

A capivara encontra-se amplamente distribuída por todo território brasileiro, não sendo encontrada apenas na região de semi-árido no nordeste (Alho, 1986; Ojasti, 1991; Moreira e Macdonald, 1997).

Trata-se de um animal selvagem em crescente processo de domesticação e em importância econômica, já que possui elevado potencial zootécnico. Proporciona obtenção de produtos de qualidade como: carne, couro e óleo (Silva Neto, 1995). Apresenta cada vez mais destaque no cenário da sustentabilidade de fauna selvagem, pois apresenta alta prolificidade, ótima conversão alimentar e boa adaptação aos sistemas de criação (Pinheiro *et al.*, 2007). Apesar da crescente importância da capivara no cenário nacional e latino-americano, ainda há muito a conhecer sobre a sua biologia, comportamento e, principalmente, parasitismo (Sinkoc *et al.*, 1998a; Vieira *et al.*, 2006).

Os parasitos gastrintestinais da capivara ainda não são completamente conhecidos, assim como há muito a se definir sobre seus aspectos patogênicos e biológicos. Mas é certo que, como em toda relação de parasitismo, acabam por acarretar danos ao hospedeiro, determinando, conseqüentemente, perdas econômicas ao sistema produtivo. Levantamentos realizados por alguns autores sobre a fauna parasitária do trato digestório revelam ampla infecção por nematódeos, trematódeos, cestódeos e protozoários (Arantes *et al.*, 1985; Bonuti *et al.*, 2002; Sinkoc *et al.*, 2004; Reginatto *et al.*, 2008).

Rego (1961) descreveu os cestódeos *Monoecocestus macrobursatum*, *M. hagmanni* e *M. hydrochoeri*, que apresentavam distribuição ampla nos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso e São Paulo. No mesmo ano, Yamaguti (1961) identificou os nematódeos *Strongyloides chapini*, *Capillaria hydrochoeri* e *Protozoophaga obesa* parasitando o trato digestório de capivaras no Brasil. Em pesquisa realizada no Estado do Mato Grosso, Arantes (1983) descreveu a infecção por *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus axei*, *Cooperia punctata* e *C. pectinata*, *Hydrochoerisnema anomalobursata* e *Vianella hydrochoeri*.

Em catalogação dos helmintos parasitos de capivaras já descritos no Brasil, Arantes *et al.* (1985) relacionaram as seguintes espécies: *Trichostrongylus axei*, *C. punctata*, *C. pectinata*, *Haemonchus* sp., *Vianella hydrochoeri*, *Hydrochoerisnema anomalobursata*, *Capillaria hydrochoeri*, *Protozoophaga obesa*, *Strongyloides* sp., *Hippocrepis hippocrepis*, *Nudacotyle*

*valdevaginat*us, *Nudacotyle tertius*, *Neocotyle neocotyle*, *Taxorchis schistocotyle*, *Monoecocestus hagmani*, *M. hydrochoeri* e *M. macrobursatum*.

Em estudo conduzido no Estado do Mato Grosso do Sul, Nascimento *et al.* (1991) relataram a ocorrência dos helmintos *P. obesa*, *H. anomalobursata*, *V. hydrochoeri*, *T. schistocotyle*, *C. hydrochoeri*, *T. axei*, *H. hippocrepis* e *S. chapini*.

Relatos do parasitismo em capivaras criadas em cativeiros no Estado do Rio de Janeiro foram conduzidos por Mattos Junior e Sanavria (1993), que identificaram infecção por *H. anomalobursata*, *Habronema* sp. e *M. hydrochoeri*. Sinkoc (1997) relatou a ocorrência dos helmintos *M. hydrochoeri*, *T. schistocotyle*, *H. hippocrepis*, *Strongyloides* sp., *Trichuris* spp., *C. hydrochoeri*, *V. hydrochoeri*, *H. anomalobursata* e *P. obesa* em capivaras de área de exploração pecuária no Rio Grande do Sul. Em pesquisa num frigorífico para abate de capivaras, Sinkoc *et al.* (2004) identificaram os seguintes helmintos: *C. hydrochoeri*, *V. hydrochoeri*, *P. obesa*, *Strongyloides* sp., *Habronema* sp., *M. nudacotyle*, *Monoecocestus hydrochoeri*, *M. hagmani*, *T. schistocotyle* e *Hydrochoerisnema cabrali*.

Em capivaras de vida livre, Costa e Catto (1994), no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, relataram a ocorrência de *T. axei*, *V. hydrochoeri*, *S. chapini*, *C. hydrochoeri*, *P. obesa*, *T. schistocotyle*, *H. hippocrepis*, *N. tertius*, *M. hagmani* e *M. hydrochoeri*. Sinkoc *et al.* (1995) identificaram o parasitismo por *Capillaria hydrochoeri*, *V. hydrochoeri*, *P. obesa*, *M. hydrochoeri* e *Monoecocestus* sp.

Em investigação de protozoários parasitos gastrintestinais Reginatto *et al.* (2008) verificaram a ocorrência de cistos *Giardia* sp., oocistos de *Cryptosporidium* sp. e *Eimeria* sp., em capivaras criadas em cativeiro na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Na Argentina, María e Antonio (2004) encontram as espécies *Eimeria trinidadensis* e *E. ichiloensis* parasitando capivaras de vida livre. Santarém (2006) relatou a presença de *Fasciola hepatica*, Trichostrongylidae, *Eimeria* spp. e *Strongyloides* sp. em uma capivara no Estado de São Paulo. Gurgel, Sartori e Araújo (2007) demonstraram prevalência de 52,4% de parasitismo por *Eimeria* spp. em capivaras no Rio Grande do Sul.



Avaliando o levantamento dos dados referentes ao parasitismo gastrointestinal em capivaras, verificamos que há poucos registros da fauna parasitária desses animais no Estado do Paraná (Rocco e Luz, 2002; El-Kouba *et al.*, 2008). Portanto, os objetivos desse trabalho foram: realizar o diagnóstico das espécies de helmintos e protozoários parasitos do trato digestório de capivaras residentes no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná, para determinar a prevalência de infecção nesses animais e determinar se são hospedeiros de parasitos que podem vir a infectar o homem.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. COLETA DE FEZES**

As amostras de fezes foram coletadas logo após a defecação dos animais. Os montículos de fezes de cada capivara foram coletados na área próxima à lagoa, onde permanece a maior concentração de animais. Cada montículo de fezes foi considerado uma unidade, proveniente de um único indivíduo.

Ao todo foram coletadas 53 amostras de fezes. As amostras foram identificadas e armazenadas em frascos de plástico limpos à temperatura de 6-8°C, e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular, UFPR, onde foram processadas e examinadas em até 48 horas.

### **2.2. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS**

#### **2.2.1. Técnica de Sedimentação espontânea**

A técnica de sedimentação espontânea é um exame utilizado principalmente para a detecção de ovos e larvas de helmintos. É um teste qualitativo que visa especialmente o diagnóstico de ovos que são mais pesados e, que, conseqüentemente, apresentam taxa de sedimentação mais rápida (Hoffmann, Pons e Janer, 1934). Apresenta maior sensibilidade no diagnóstico de ovos de trematódeos, ascarídeos e de espirurídeos.

### 2.2.2. Técnica de Flutuação em solução saturada de cloreto de sódio

A técnica de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio visa identificação de cistos e oocistos de protozoários e de ovos de helmintos que apresentam menor densidade específica (Willis e Mollay, 1921).

### 2.2.3. Técnica de Centrífugo-Flutuação em Sulfato de Zinco

A técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco tem por objetivo promover a concentração de formas parasitárias mais leves numa solução final com menos sujidades. Características que aumentam a sensibilidade do diagnóstico (Faust *et al.*, 1939). É utilizada principalmente na procura de cistos e oocistos de protozoários. A técnica pode também ser diagnóstica para ovos de helmintos mais leves ou mesmo ovos de ascarídeos, quando a infecção por esses parasitos for intensa.

### 2.2.4. Técnica de Tamização

Essa técnica tem por objetivo o diagnóstico de formas parasitárias mais pesadas e, portanto, com maior taxa de sedimentação. Apresenta maior sensibilidade no achado de trematódeos e cestódeos principalmente, pois proporciona uma maior concentração da amostra em um sedimento com menos sujidades.

## 2.3. NECROPSIA

Durante o trabalho de campo três capivaras tiveram óbito devido a complicações de manejo. Esses animais foram encaminhados à necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR. Foi realizada inspeção dos parasitos gastrintestinais de cada animal pelo exame direto e pela técnica de termohidrotropismo.

### 2.3.1. Exame direto

Cada capivara foi avaliada quanto à presença de parasitos intraluminais nos seguintes órgãos: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon, reto, fígado e vias biliares, pâncreas e ductos pancreáticos. Também foi pesquisada a cavidade abdominal, rins, bexiga, pulmões e coração. Antes da procura por nematódeos e cestódeos cada órgão foi identificado e devidamente separado.

Os parasitos encontrados foram coletados e armazenados em solução de cloreto de sódio 0,9% ou em solução de formalina 10%. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular, Departamento de Patologia Básica, UFPR. A identificação dos parasitos foi realizada com base na sua localização e características morfológicas.

### 2.3.2. Termohidrotropismo

Aqueles segmentos de órgãos que apresentavam parasitos intramurais foram submetidos à técnica de termohidrotropismo. Esse procedimento promove a saída do parasito da mucosa em que se encontra fixado para a água de imersão aquecida a 37°C. Os parasitos coletados foram armazenados em solução de formalina 10% e identificados com base em sua localização e características morfológicas.

## 2.4. FIXAÇÃO E COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE CARMIM CLORÍDRICO REGRESSIVO

Os trematódeos coletados na necropsia foram fixados em solução de formol acético e colocados entre lâminas de vidro para compressão dorso-ventral. Após 24 horas foram corados pela técnica de Carmin clorídrico regressivo. Nessa técnica o parasito é corado em excesso pelo corante Carmin clorídrico não diluído. O excesso de corante é, posteriormente, removido com diferenciador álcool clorídrico 70°GL a 0,5%.

Resumidamente, os trematódeos após fixação e compressão foram imersos em álcool 50°GL durante 5 minutos e posteriormente em álcool 70°GL durante 5 minutos. Então, foram imersos no corante Carmin até intensa penetração. A seguir, é procedida a diferenciação em álcool 70°GL a 0,5% de ácido clorídrico. Os parasitos são imersos para remover o excesso de corante.

São lavados rapidamente em álcool 70°GL e posteriormente imersos em álcool 80°GL por 5 minutos e em álcool 90°GL também por 5 minutos. São então colocados em Creosoto de Faya para clarificação por no mínimo 24 horas. Na próxima etapa foram rapidamente lavados em xilol e então montados entre lâmina e lamínula com Bálsamo do Canadá.

### 3. RESULTADOS

Os parasitos gastrintestinais encontrados foram: *Protozoophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, estrombilídeos, ascarídeos, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp, *Fasciola hepatica*, *Monoecocestus* spp, *Eimeria* spp e sarcocistídeos. Dos 53 animais avaliados, 49 estavam parasitados, o que representa 92,4% do total.

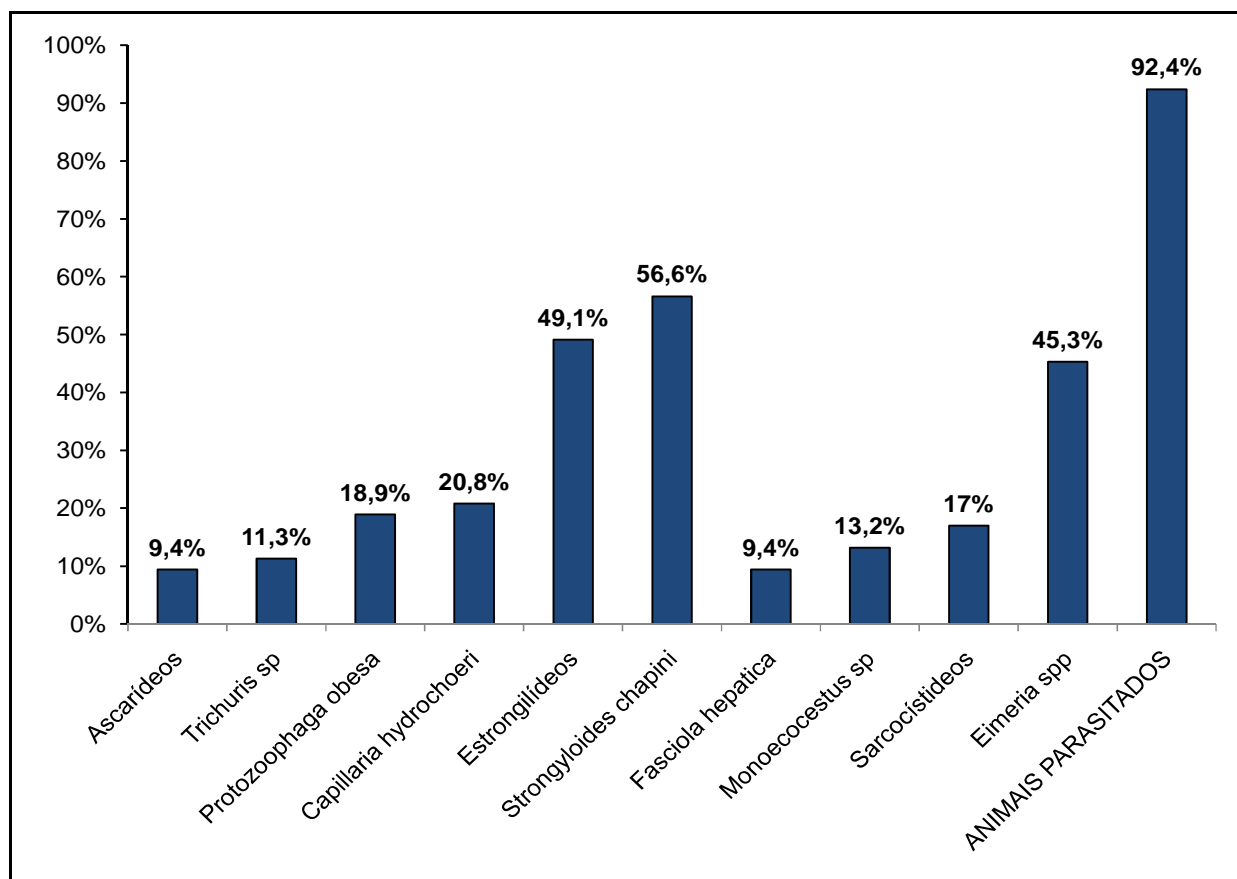
Em geral, foram os parasitos do filo Nematoda aqueles que infectaram o maior número de animais. O nematódeo *Strongyloides chapini* foi o parasito com maior taxa de prevalência: 56,6% (30/53). Os outros nematódeos verificados foram: *Protozoophaga obesa*, diagnosticado em 18,9% das amostras (10/53), estrombilídeos, em 49,1% (26/53), *Capillaria hydrochoeri*, com uma prevalência de infecção de 20,8% (11/53), *Trichuris* sp, verificado em 11,3% das amostras (6/53) e ascarídeos, com a prevalência de 9,4% (5/53).

Assim, foi verificado parasitando as capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, nematódeos pertencentes a cinco superfamílias. Sendo elas: Oxyuroidea (*Protozoophaga obesa*), Rhabdiasoidea (*Strongyloides chapini*), Strongyloidea (ovos de Trichostrongylidae), Trichuroidea (*Capillaria hydrochoeri* e *Trichuris* sp) e Ascaroidea (ovos de Ascarididae em geral).

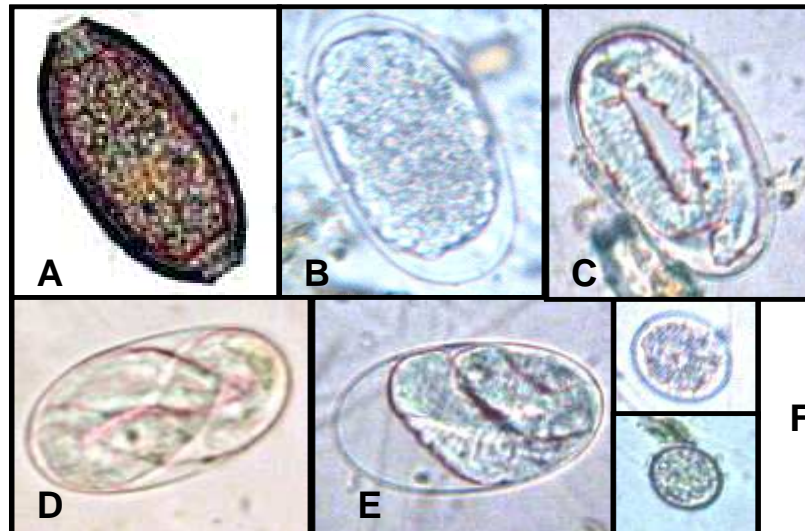
Quanto ao filo Platyhelminthes foi identificada infecção apenas por *Fasciola hepatica* e *Monoecocestus* spp. O trematódeo *F. hepatica* foi encontrado em 5 capivaras (9,4%) e o cestódeo *Monoecocestus* spp esteve presente em 7 dos animais avaliados (13,2%).

Também foi diagnosticada a presença de protozoários parasitos. Assim, oocistos de *Eimeria* spp foram encontrados em quase metade das capivaras amostradas (24/53), o que representa um percentual de infecção de 45,3%. Oocistos de protozoários pertencentes à família Sarcocystidae foram identificados em 9 animais, uma prevalência de 17%.

Os resultados referentes aos parasitos presentes no trato gastrintestinal de capivaras, amostradas nesse estudo, estão resumidos nas Figuras de 1 a 3. O resultado representa o diagnóstico das quatro técnicas coproparasitológicas e da necropsia.



**Figura 1** - Perfil parasitário e prevalência de infecção por parasitos gastrintestinais em capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná, determinados por técnicas coproparasitológicas e de necropsia, 2008.

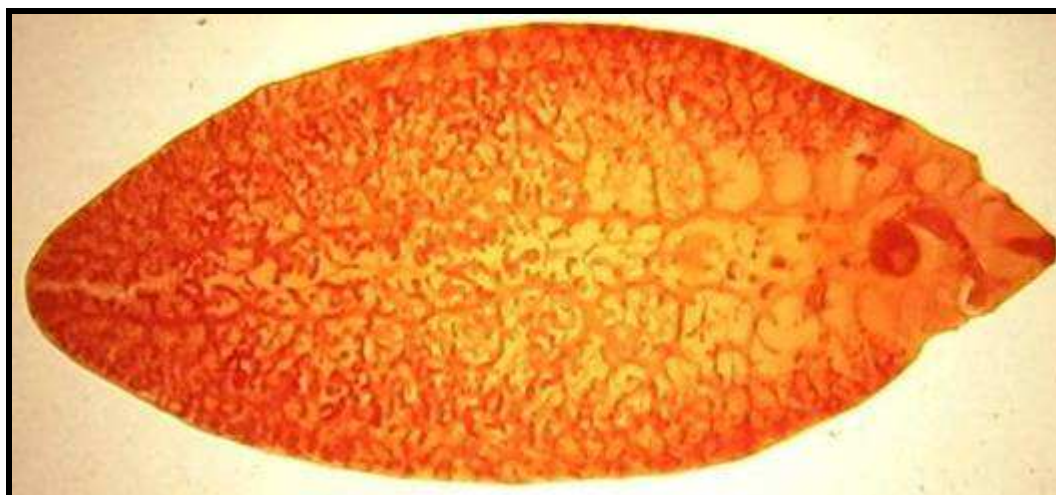


**Figura 2** - Representação de alguns ovos e oocistos encontrados nas fezes das capivaras analisadas. (A) *Capillaria hydrochoeri*; (B) ovo de estrongilídeo; (C), (D) e (E) ovo de *Strongyloides chapini*. Observe a delgada membrana e a larva no interior do ovo; (F) Oocistos de Sarcocystidae não esporulados encontrados nas fezes de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná, 2008.

Na Tabela 1 é dada a prevalência de infecção para cada parasito conforme a técnica de diagnóstico empregada. Houve variações de positividade já que cada exame apresenta sensibilidade diferenciada conforme o tipo de forma parasitária a ser diagnosticada.

**Tabela 1** - Prevalência de infecção por parasitos gastrintestinais encontrados nas capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná, 2008, para cada técnica de exame diagnóstico utilizada.

PARASITO	Sedimentação espontânea		Flutuação em solução saturada de NaCl		Centrifugo-Flutuação em Sulfato de Zinco		Tamização		Necropsia	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
<i>P. obesa</i>	4/53	7,5%	3/53	5,7%	0/53	-	0/53	-	3/3	100%
<i>S. chapini</i>	8/53	15,1%	24/53	45,3%	0/53	-	0/53	-	0/3	-
Estrongilídeos	2/53	3,8%	23/53	43,4%	0/53	-	4/53	7,5%	0/3	-
<i>C. hydrochoeri</i>	0/53	-	9/53	17%	0/53	-	2/53	3,8%	2/3	66,6%
<i>Trichuris</i> sp	1/53	1,9%	5/53	9,4%	0/53	-	0/53	-	0/3	-
<i>Eimeria</i> spp	2/53	3,8%	15/53	28,3%	7/53	13,2%	7/53	13,2%	0/3	-
<i>F. hepatica</i>	2/53	3,8%	0/53	-	0/53	-	1/53	1,9%	2/3	66,6%
<i>Monoecocestus</i>	5/53	9,4%	1/53	1,9%	0/53	-	2/53	3,8%	0/3	-
Ascarídeos	5/53	9,4%	1/53	1,9%	0/53	-	0/53	-	0/3	-
Sarcocístídeos	0/53	-	3/53	5,7%	8/53	15,1%	1/53	1,9%	0/3	-



**Figura 3** - Exemplar de *Fasciola hepatica* encontrado nas vias biliares extra-hepáticas de capivara submetida à necropsia, Parque Tingüi, Curitiba, Paraná, 2008. Coloração: Carmin clorídrico regressivo.

#### 4. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram avaliadas 53 amostras de fezes de capivaras, e analisado o trato digestório de três animais que foram necropsiados. Ao nosso conhecimento esse foi o maior levantamento sobre parasitos gastrintestinais de capivaras realizado no Estado do Paraná. Essa pesquisa vem complementar e adicionar o conhecimento sobre o parasitismo em capivaras, que ainda tem muito a evoluir.

Foram identificados parasitos pertencentes aos Filos Nematoda e Platyhelminthes e ao Reino Protista. Ao todo 49 animais estavam parasitados, o que representou 92,4% da população estudada. Tais resultados demonstram uma ampla infecção das capivaras por uma grande variedade de parasitos. Sendo que os animais positivos encontravam-se parasitados por um até sete diferentes espécies de parasitos.

Apesar dessa maciça carga parasitária foi observado que as capivaras não apresentavam sinais clínicos aparentes de infecção, apresentando bom escore corporal e boa faixa de peso. Esse dado reforça as características que fazem desse roedor um excelente animal para o sistema de produção extensivo no manejo sustentável da fauna selvagem: são resistentes a doenças e possuem elevado potencial zootécnico (Moreira e Macdonald, 1997; Vargas, 2005).

A elevada prevalência encontrada pode ser explicada pelo comportamento da população de capivaras e pelo ambiente em que essas vivem. O comportamento gregário, o hábito de pastar rente ao solo, a coprofagia ou cecotrofagia, associado ao ambiente populoso e restrito, presente no Parque Tingüi, tendem a facilitar a infecção e a dispersão dos parasitos.

Resultados similares foram obtidos por El-Kouba *et al.* (2008), que detectaram 96,9% das capivaras parasitadas no Estado do Paraná, e por Bonuti *et al.* (2002) e Sinkoc *et al.* (2004), que relataram a ocorrência de parasitismo em todos os animais amostrados, em estudos conduzidos nos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo respectivamente.

Foi identificada a ocorrência de cinco superfamílias no Filo Nematoda: Oxyuroidea, Rhabdiasoidea, Strongyloidea, Trichuroidea e Ascaroidea.



Na superfamília Oxyuroidea foi identificado o parasito *Protozoophaga obesa*, que ocorreu em 18,9% das amostras analisadas. Entretanto, essa prevalência pode subestimar a real taxa de infecção desse parasito. Isso devido principalmente à biologia dos oxiurídeos, que têm o hábito de eliminar seus ovos em massas gelatinosas diretamente no rebordo anal. Assim, o exame direto das fezes apresenta baixa sensibilidade, e como não foi empregado o método de fita adesiva na região perineal das capivaras é esperado que esse resultado representasse uma subestimativa da prevalência real de infecção.

Justificativa essa que pode ser corroborada pelo resultado da necropsia. Nesse exame todos os animais analisados apresentavam infecção por *P. obesa*. El-Kouba *et al.* (2008), que realizaram estudos em capivaras do Parque Barigüi e Parque Zoológico, ambos localizados na cidade de Curitiba, não encontraram parasitismo por *P. obesa*. Possivelmente por terem realizado apenas exames coproparasitológicos, sem análise de necropsia, e pelo menor número de amostras obtidas (n=33).

Por outro lado, estudos conduzidos por avaliação direta, durante a necropsia de animais abatidos, demonstram que o parasitismo pelo oxiurídeo *P. obesa* em capivaras é elevado. Bonuti *et al.* (2002) encontraram 96,66% dos animais infectados por esse parasito, e Sinkoc *et al.* (2004) verificaram a prevalência de infecção de 85,71%. O sucesso de infecção de *P. obesa* em capivaras pode ser justificado pelo hábito coprofágico desses roedores. Uma vez que os oxiurídeos eliminam formas prontamente infectantes, a via de transmissão *per-os* apresenta grande vantagem para infecção e permanência do parasitismo.

A maior prevalência de infecção foi de 56,6% para o parasito *Strongyloides chapini*, pertencente à superfamília Rhabdiasoidea. Esse nematódeo foi primeiramente descrito como parasito de capivara por Yamaguti (1961), sendo posteriormente relatado por Costa e Catto (1994) com prevalência de 47,8%. Esses autores também verificaram uma maior suscetibilidade de parasitismo em animais jovens, que apresentaram 100% de infecção contra 9% encontrado para animais adultos. Resultado muito similar ao encontrado no presente estudo foi obtido por Bonuti *et al.* (2002), que conduziram pesquisa no Estado do Mato Grosso do Sul, e encontraram 56,66% das capivaras infectadas

por *S. chapini*. Em estudo conduzido por Sinkoc (1997) no Estado do Rio Grande do Sul foi relatada a prevalência de 62,5%.

Os parasitos da superfamília Strongyloidea foram encontrados em 49,1% das amostras. De forma genérica foram identificados como estrongídeos, não sendo possível definir gênero já que a análise dos ovos não permite tal diferenciação. Como não foi realizado cultivo de larvas a partir das amostras de fezes, e devido aos animais necropsiados não estarem infectados, não foi possível determinar o gênero e espécie desses estrongídeos. Por essa razão, a prevalência de infecção por ovos desses parasitos foi agrupada na Superfamília Strongyloidea: Trichostrongylidae.

De forma similar, El-Kouba *et al.* (2008), em estudo epidemiológico de parasitos gastrintestinais de capivaras no Estado do Paraná, encontraram 30,3% dos animais infectados por estrongídeos.

Conforme Vieira *et al.* (2006) o parasitismo de capivaras por nematódeos da Superfamília Strongyloidea ocorrem pelas seguintes espécies: *Viannella hydrochoeri*, *Hydrochoerisnema anomalobursata*, *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus* sp., *Cooperia punctata* e *Cooperia pectinata*. Os estrongídeos considerados parasitos naturais da capivara e, portanto, mais prováveis agentes de infecção são *V. hydrochoeri* e *H. anomalobursata* (Costa e Catto, 1994; Casas, Duszynski e Zalles, 1995; Bonuti *et al.*, 2002; Sinkoc *et al.*, 2004). A ocorrência de *T. axei*, *Haemonchus* sp., *C. punctata* e *C. pectinata* é considerada acidental e talvez por essa razão menos freqüente. Assume-se que a infecção de capivaras por esses parasitos ocorra quando há coabitação com bovinos, caprinos, ovinos e eqüinos (Arantes, 1983).

Pela razão da área em estudo apresentar poucos herbívoros habitando o mesmo ambiente que as capivaras, é mais provável que os ovos encontrados nos exames coproparasitológicos dessa pesquisa pertençam as espécies *V. hydrochoeri* e *H. anomalobursata*. Bonuti *et al.* (2002) encontraram 13,3% dos animais amostrados infectados por *T. axei*, ao passo, que 93,33% estavam parasitados por *V. hydrochoeri* e 90% por *H. anomalobursata*. De forma similar, Sinkoc *et al.* (2004) relataram prevalência de infecção de 100% das capivaras por *V. hydrochoeri*. Esse nematódeo também tem sido descrito parasitando capivaras na Venezuela, Argentina e em vários Estados do Brasil (Nascimento *et al.*, 1991; Sinkoc *et al.*, 1995; María e Antônio, 2004). *H. anomalobursata*

também foi descrito em capivaras de cativeiro no Estado do Rio de Janeiro (Mattos Júnior e Sanavria, 1993) e em animais de vida selvagem no Estado do Rio Grande do Sul (Sinkoc, 1997).

Na superfamília Trichuroidea foi verificado a ocorrência de duas espécies de parasitos, sendo *Capillaria hydrochoeri*, presente em 20,8% das capivaras, e *Trichuris* sp., parasitando 11,3% dos animais pesquisados. El-Kouba *et al.* (2008) encontraram prevalência de infecção de 15% para *C. hydrochoeri*, e não identificaram animais parasitados pelo gênero *Trichuris*.

Nas capivaras avaliadas por necropsia, *C. hydrochoeri* foi encontrada em 66,6% dos animais, e não foi observado *Trichuris* sp. Os exemplares de *C. hydrochoeri* foram observados no estômago desses roedores. Resultados semelhantes aos obtidos por Bonuti *et al.* (2002), que no exame de necropsia encontraram 63,33% dos animais parasitados por *C. hydrochoeri* e também não encontraram infecção por *Trichuris* sp. Sinkoc *et al.* (2004) encontraram *C. hydrochoeri* em 100% das capivaras avaliadas, sendo que os nematódeos foram encontrados somente no estômago, e Costa e Catto (1994) relataram a infecção de 86,9% dos animais analisados.

O parasitismo por *Trichuris* sp. foi descrito pela primeira vez por Sinkoc *et al.* (1998b) que na oportunidade realizaram a necropsia de 24 capivaras e encontraram uma prevalência de infecção de 50%. A prevalência encontrada em animais jovens foi de 66,67% e em animais adultos de 33,33%.

A menor prevalência de infecção entre os nematódeos foi verificada para Ascaroidea: Ascarididae, com 9,4% de positividade. Resultado similar foi obtido por El-Kouba *et al.* (2008) que relataram o parasitismo em 12% dos animais analisados. Não há dados na literatura atual que indiquem parasitismo pela superfamília Ascaroidea em capivaras. Os resultados obtidos no Estado do Paraná são, portanto, dados inéditos. Para confirmação da infecção e descrição da espécie será necessário realizar um estudo com maior número de animais necropsiados. Por não haver descrição de gênero e espécie de parasitos de Ascaroidea em capivaras, os ovos encontrados foram definidos de forma genérica como ascarídeos.

Para definição da infecção por ascarídeos em capivaras será necessário futuramente o encontro e descrição da fase adulta do parasito. Como cães e gatos freqüentam o mesmo ambiente que as capivaras no Parque Tingüi, e

também naqueles estudados por El-Kouba *et al.* (2008), pode ter ocorrido infecção acidental das capivaras por ovos de *Toxocara canis* ou *T. catti*.

O cestódeo *Monoecocestus* spp foi encontrado parasitando 13,2% das capivaras avaliadas. Segundo levantamento realizado por Rego (1961) são três as espécies desse cestódeo que parasitam as capivaras no Brasil: *M. hagmanni*, *M. hydrochoeri* e *M. macrobursatum*. Em estudo conduzido na Bolívia, Casas, Duszynski e Zalles (1995) verificaram prevalências de 12% para *M. hagmanni* e *M. hydrochoeri* e de 34% para *M. macrobursatum*. No Brasil, Sinkoc *et al.* (2004) relataram as prevalências de 28,57% para *M. hydrochoeri* e de 42,86% para *M. hagmanni*.

O trematódeo *F. hepatica* foi encontrado em 9,4% dos animais avaliados. Embora se saiba que as capivaras são hospedeiros definitivos para *F. hepatica*, ainda são escassos os relatos sobre fasciolose nessa espécie. Vale citar que, segundo revisão realizada por Serra Freire (1999), o primeiro relato de *F. hepatica* na América do Sul foi feito por Walffugel no ano de 1916 em uma capivara. Nosso estudo complementa os dados sobre a ocorrência desse parasitismo.

A prevalência aqui descrita é mais baixa do que as relatadas em outros estudos. Em pesquisa conduzida no Parque Barigüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná, Rocco e Luz (2002) relataram prevalência de 84,2% de ovos de *F. hepatica*. Também em estudo realizado no Estado do Paraná, El-Kouba *et al.* (2008) obtiveram a prevalência de 54,5% dos animais parasitados, contudo, das amostras analisadas provenientes do Parque Barigüi foi relatada prevalência de infecção de 100%. Vale ressaltar que *F. hepatica* foi encontrada em 66,6% das capivaras analisadas por necropsia no presente estudo. Contudo mesmo nesses animais a taxa de infecção era baixa. Sendo que em cada roedor foi encontrado um único exemplar adulto do parasito.

Tais resultados podem ser explicados por alguns fatores: 1) não foi encontrado o hospedeiro intermediário natural de *F. hepatica* (moluscos do gênero *Lymnaea*) nas localidades do Parque Tingüi (Marcia Arzua e Luz, comunicação pessoal); 2) Rocco e Luz (2002) e El-Kouba *et al.* (2008) relatavam uma redução na população de *Lymnaea* spp. nos parques Barigüi e Zoológico em Curitiba, e já previam uma redução do número de animais parasitados; 3) como um marcador biológico, a baixa taxa de infecção dos animais necropsiados

pode confirmar a reduzida exposição das capivaras às metacercárias na região em estudo (fato diretamente associado à reduzida população de hospedeiros intermediários nesse ambiente); 4) o hábito de coprofagia mantido pelas capivaras pode resultar em menor índice de eliminação de ovos de *F. hepatica* na água; 5) As capivaras possuem trânsito livre entre os Parques Tingüi, Tangüa e Barigüi (Márcia Arzua, comunicação pessoal) o que pode indicar a possibilidade dos animais positivos no presente estudo terem sido infectados em outras localidades que não o Parque Tingüi.

Contudo, não deixa de ser importante o potencial zoonótico que a *F. hepatica* pode representar para os funcionários e freqüentadores dos parques e leitos de rios da cidade de Curitiba.

Os herbívoros, de forma geral, podem ser mantenedores e disseminadores da contaminação ambiental por ovos de *F. hepatica*. A presença de animais parasitados, mesmo que em baixa prevalência, é indicativo que o ciclo biológico do trematódeo está ocorrendo. O crescimento da população e repovoamento dos rios e lagos por *Lymnaea* spp. pode acontecer se permitidos os requerimentos ideais para a espécie em questão. Nesse caso, se as medidas de prevenção forem esquecidas poderão ocorrer surtos epidêmicos de fasciolose.

Dentre os protozoários parasitos foram identificados esporozoários pertencentes às famílias Eimeriidae e Sarcocystidae. Não há dados na literatura que relatem a infecção parasitária de capivaras por sarcocistídeos. Não foi possível identificar gênero desses parasitos, já que foi adotada para identificação apenas a análise morfológica.

Ao todo, foram encontrados oocistos de Sarcocystidae em 17% das amostras avaliadas. Para definição da infecção das capivaras por sarcocistídeos, e identificação de gênero/espécie que utiliza esse roedor como hospedeiro, será necessário a realização de bioensaios e análise genética dos sarcocistídeos encontrados nas fezes desses animais. A confirmação da infecção das capivaras por protozoários da família Sarcocystidae será inédita e pode ser muito reveladora na epidemiologia desses parasitos.

Na família Eimeriidae, foram encontrados oocistos de *Eimeria* spp. A prevalência de 45,3% encontrada nesse estudo denota a importância que a eimeriose, tanto na sua apresentação clínica quanto subclínica, pode ter no

sistema de produção comercial de capivaras. Os parasitos do gênero *Eimeria* apresentam elevada morbidade e acarretam grandes perdas tanto diretas quanto indiretas ao sistema produtivo. Apesar de criada em sistema extensivo, a capivara, mesmo no seu ambiente natural, tende a viver em grupos, o que pode facilitar a dispersão de *Eimeria* spp., e explicar a prevalência de infecção encontrada nessa pesquisa.

O parasitismo por *Eimeria* spp. em capivara já foi relatado na literatura, mas ainda são poucos os estudos. O primeiro relato foi realizado por Carini (1937) que, em estudo conduzido no Estado de São Paulo, descreveu as espécies *E. capibarae* e *E. hydrochoeri*. Seguido de Casas, Duszynski e Zalles (1995), que descreveram as espécies *E. trinidadensis*, *E. ichiloensis* e *E. boliviensis*. Esses coccídeos foram encontrados em capivaras do leste da Bolívia e sul da Venezuela.

Mais recentemente, em estudo conduzido no Estado do Rio Grande do Sul, Gurgel, Sartori e Araújo (2007), encontraram e descreveram mais uma nova espécie de parasito em capivaras, a qual denominaram *E. araside*. Esses pesquisadores também verificaram o parasitismo por *E. trinidadensis* e *E. ichiloensis*. Albuquerque *et al.* (a ser publicado) investigaram a eimeriose em capivaras do Estado da Bahia, e encontraram 69,2% das capivaras infectadas por *E. trinidadensis* e *E. ichiloensis*. Na Argentina, María e Antonio (2004) relatam prevalência de 27% por *Eimeria* spp. El-Kouba *et al.* (2008) encontram 57,6% das capivaras infectadas por *Eimeria* spp. no Estado do Paraná.

Os coccídeos do gênero *Eimeria* spp. podem ser responsáveis por grandes perdas econômicas no sistema produtivo de capivaras. Apesar da resistência que esses animais apresentam a doenças, apresentações subclínicas e perdas indiretas quase sempre ocorrem na associação de parasitismo.

## 5. CONCLUSÕES

As capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná, estavam amplamente parasitadas. Ao todo, 92,4% dos animais estavam parasitados por nematódeos, cestódeos, trematódeos e protozoários;

Foram verificados os parasitos: *Protozophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp., ascarídeos, estromgilídeos, *Fasciola hepatica*, *Monoecocestus* spp, *Eimeria* spp e sarcocistídeos;

Exames parasitológicos de fezes são excelentes métodos de diagnóstico e triagem na definição da fauna parasitária gastrintestinal de animais selvagens. Contudo, é sempre interessante aplicar a maioria de exames disponíveis;

A prevalência encontrada para *F. hepatica* e o não encontro de moluscos do gênero *Lymnaea* podem sugerir uma redução populacional do hospedeiro intermediário. Contudo também permite inferir que o ciclo biológico do parasito está ocorrendo.

A fasciolose ainda é uma realidade nas proximidades da bacia hidrográfica de Curitiba. Estudos de dinâmica populacional de *Lymnaea* spp. são tão necessários quanto a continuidade de ações em educação de saúde, principalmente para os grupos de risco.

## 6. PERSPECTIVAS

Para definir as espécies de Strongyloidea que ocorrem nas capivaras do Estado do Paraná, assim como sua prevalência, será necessário futuramente proceder à necropsia de maior número de animais ou proceder à identificação de larvas cultivadas a partir de amostras de fezes;

O parasitismo por Ascaroidea em capivaras deverá ser confirmado em estudos posteriores. Será necessário encontrar a fase adulta do parasito para definição da infecção e descrição da espécie;

Os coccídeos do gênero *Eimeria* spp. podem ser responsáveis por grandes perdas econômicas no sistema produtivo de capivaras. Estudos posteriores sobre coccidiose em roedores de forma geral são promissores;

Para definição da infecção das capivaras por sarcocistídeos, e identificação de gênero/espécie que utiliza esse roedor como hospedeiro ou reservatório natural, será necessário a realização de bioensaios e análise genética dos sarcocistídeos encontrados nas fezes desses animais;

A confirmação da infecção das capivaras por protozoários da família Sarcocystidae será inédita e pode ser muito reveladora na epidemiologia desses parasitos;



## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, G.R.; BERTO, B.P.; CATENACCI, L.S.; NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; LOPES, C.W.G. Eimerid coccidia in capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (Rodentia: Hydrochaeridae) from southern Bahia, Brazil. A ser publicado.

ALHO, C.J.R. Capivaras: uma vida em família. *Ciência Hoje. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, v. 23, n. 4, p. 64-68, 1986.

AMATO NETO, V. Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame das fezes. São Paulo, **Ed. Saraiva**, 1961.

ARANTES, I.G. Considerações sobre Trichostrongyloidea Cram, 1927, parasitas de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul (Municípios de Angélica, Aquidauana e Rio Verde). Jaboticabal, 1983, 76f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

ARANTES, I.G.; ARTIGAS, P.T.; NASCIMENTO, A.A. Helminhos parasitos de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) no Brasil. In: **Encontro de Pesquisas Veterinárias, Jaboticabal, SP**. Resumos. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, p. 63, 1985.

BONUTI, R.M.; NASCIMENTO, A.A.; MAPELLI, E.B.; ARANTES, I.G. Helminhos gastrintestinais de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na sub-região de Paiaguás, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 23, n. 1, p. 57-62, jan./jun, 2002.

CARINI, A. Sur deux nouvelles *Eimeria* d'*Hydrochoerus* capibara. **Annal. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 15, n. 4, p. 367-369, 1937.

CASAS, M.C.; DUSZYNSKI, D.W.; ZALLES, L.M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **J. Parasitol.**, v. 81, n. 2, p. 247-251, 1995.

COSTA, C.A.F.; CATTO, J.B. Helminhos parasitos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul Matogrossense. **Rev. Brasileira Biol.**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 1, p. 39-48, 1994.

EL-KOUBA, M.M.A.N.; MARQUES, S.M.T.; PILATI, C.; HAMANN, W. Aspectos gerais da fasciolose e de endoparasitoses em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) de três parques no Paraná, Brasil. **Veterinária em Foco Canoas**, v. 6, n. 1, p. 4-15, jul./dez, 2008.

FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **J. Parasitol.**, v. 25, p. 241–262, 1939.

GURGEL, A.P.F.; SARTORI, A.S.; ARAÚJO, F.A.P. Eimeriosis in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitol. Latinoamer.**, v. 62, n. 1, p. 76-78, 2007.

HOFFMAN, W.A. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico J. Pub. Healt.**, v. 9, p. 283-98, 1934.

MARÍA, I.; ANTONIO, D.R. Prevalencia de parásitos intestinales en poblaciones de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) de la laguna Ibera, provincia de Corrientes. Estado de Avance. Universidad nacional Del Nordeste. **Comunic. Cient. Tecnol.**, v. 36, 2004.

MATTOS JUNIOR, D.G.; SANAVRIA, A. Helmintos parasitos de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) em sistema de criação de cativeiro, no Estado do Rio de Janeiro. In: **Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Londrina, PR. Anais. Londrina: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 34, 1993.

MOREIRA, J.R.; MACDONALD, D.W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R.E. **Manejo e conservação da vida silvestre no Brasil**. Brasília, p.186-213, 1997.

NASCIMENTO, A.A.; TEBALDI, J.H.; ASCARI, H.; ARANTES, I.G. Helmintos parasitos de *Hydrochaeris hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Paulo. Anais. **Rev. Brasil. Parasitol. Vet.**, v. 1, n. 0, p. 3, 1991.

NOWAK, R.M.; PARADISO, J.L. Walker's mammals of the world. 3.ed. Baltimore: **Johns Hopkins University Press**, 1500p., 1992.

OJASTI, J. Human exploitation of capybara. **Neotrop. Wildlife Conservat.**, University of Chicago Press, Chicago, p.236-252, 1991.

PINHEIRO, M.S.; POUHEY, J.L.O.F.; DEWANTIER, L.R.; GARCIA, C.A.N.; RODRIGUES, R.C.; SILVA, J.J.C. Avaliação de carcaça de fêmeas e machos inteiros de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) criados em sistema semi-intensivo. **Arch. Latinoam. de Produc. Anim.**, v. 15, n. 2, p. 52-57, 2007.

REGINATTO, A.R.; FARRET, M.H.; FANFA, V.R.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. Protozoários gastrintestinais de capivara e cutia mantidas em cativeiro. In: **resumos 35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, n. 572-1, 2008.

REGO, A.A. Revisão do gênero *Monoecocestus* Beddard, 1914 (Cestoda, Anoplocephalidae). **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 3, p.325-354, 1961.

ROCCO, M.; LUZ E. Fasciolose no Parque Municipal do Barigüi, Curitiba, Paraná. Curitiba, 2002. Monografia (Especialista) - Universidade Federal do Paraná.

SANTARÉM, V.A. *Fasciola hepatica* in capybara. **Acta Trop.**, v. 98, p. 311-313, 2006.

SERRA FREIRE, N.M. Fasciolose hepática no Brasil: análise retrospectiva e prospectiva. In: **Caderno Técnico Científico da Escola de Medicina Veterinária**. Universidade do Grande Rio, Ed. UNIGRANRIO, n.1, 1999.

SILVA NETO, P.B. Criação racional e comercial de animais silvestres. **J. SOS Mata Atlântica**, v. 7, n. 2, p. 3, 1995.

SINKOC, A.L.; MÜLLER. G.; BRUM, J.G.W.; BEGROW, A.; DELEVATTI, C. Helminthos parasitos de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande, RS. In: Congresso Brasileiro da Sociedade de Zoológicos do Brasil, Sorocaba, SP. **Anais. Arq. Soc. Zool. Bras.**, Sorocaba, n.14-16, p.7, 1995.

SINKOC, A.L. Helminthos e artrópodos parasitos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* L.1786) em área de exploração pecuária na Região do Banhado do Taim, Rio Grande, RS, Brasil. Porto Alegre: 1997. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SINKOC, A.L.; BRUM, J.G.W.; MÜLLER, G. *Monoecocestus Jacobi* n. sp. (Cestoda: Anoplocephalidae) parasite of capybara *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (Rodentia : Hydrochoeridae) from the Region of Banhado do Taim, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 65, n. 1, p. 107-110, 1998a.

SINKOC, A.L.; MÜLLER, G.; BRUM, J.G.W. Ocorrência de *Trichuris* spp. Roederer, 1761 em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* L., 1766) em área de exploração pecuária na região do banhado do Taim, Município de Rio Grande, RS, Brasil. **Ciência Rural - Santa Maria**, v. 28, n. 2, p. 315-316, 1998b.

SINKOC, A.L.; BRUM, F.A.; MÜLLER, G.; BRUM, J.G.W. Helminhos parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* L., 1766) na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 71, n. 3, p. 329-333, jul./set., 2004

VARGAS, F.C. Estudo comparativo de duas populações de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no município de Pirassununga. São Paulo, 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

VIEIRA, F.M.; BESSA, E.C.A.; LIMA, S.S. Ocorrência de helmintos em *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia, Hydrochaeridae) na Represa de São Pedro, município de Juiz de Fora, MG, a partir de diagnóstico coprológico. Resumos: **XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica**, UFJF. Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas: Walter Machado Couto, 2006.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of wookworm ova. **Med. J. of Australia**, v. 8, p. 375-376, 1921.

YAMAGUTI, S. Systema helminthum: the nematodes of vertebrates. **New York Interscience**, v. 3, 1261p., 1961.

**CAPÍTULO III:**  
**A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS,  
1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO  
INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum* DUBEY,  
CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988**

## Resumo

O envolvimento de roedores no ciclo selvático de *Neospora caninum* e na epidemiologia da neosporose tem sido objeto de muitas pesquisas. Atualmente, são reconhecidos como potenciais hospedeiros intermediários desse parasito os roedores: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Apodemus sylvaticus*. Como a capivara é o maior roedor vivo do mundo e apresenta ampla distribuição na América do Sul, pergunta-se se esta espécie poderia ser potencial reservatório do parasito. O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de infecção por *N. caninum* em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre. Para tanto, 26 animais provenientes do Estado do Paraná, Sul do Brasil, foram capturados por contenção química e analisados para infecção pelo apicomplexa. Amostras de DNA de sangue, fígado, linfonodos, baço e coração foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), usando três marcadores para a região Nc5 (Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np4), espécie-específica de *N. caninum*. Também foi utilizado como alvo da PCR a região ITS1, sendo seus produtos de amplificação posteriormente seqüenciados para confirmação da identidade do protozoário. Das 26 capivaras pesquisadas, três (11,5%) apresentaram fragmento de DNA amplificado para região Nc5, e cinco (19,2%) para a região ITS1. Ao todo, seis (23%) capivaras foram positivas. As cinco seqüências de ITS1 apresentaram 100% de similaridade a seqüências de *N. caninum* depositadas no "GenBank". Os tecidos que apresentaram resultados de PCR positivos para esse apicomplexa foram linfonodos, fígado, coração e sangue. Esses achados são a primeira descrição parasitológica de infecção por *N. caninum* em capivaras. Levanta-se a hipótese que a capivara possa atuar como hospedeiro intermediário de *N. caninum*, e possuir um papel no ciclo de vida selvático desse apicomplexa na América do Sul.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Neospora caninum*, neosporose, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), roedores, ciclo selvático, epidemiologia.

## Abstract

The role of rodents in the sylvatic cycle of *Neospora caninum* and in the epidemiology of neosporosis has been the focus of many researches. The aim of the present study was to investigate the occurrence of this protozoan in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Twenty-six rodents from Paraná state, Southern Brazil were captured by chemical restraint and analyzed for *Neospora caninum* infection. Blood, liver, heart, lymph nodes, and spleen tissues collected from the above mentioned animals were tested by PCR. The targets of the PCR were the Nc5 region, highly specific to *N. caninum*, using Np21/Np6, Np21/Np4 and Np7/Np4 as pairs of primers, and also the ITS1 region by using ITS2 and ITS5 as primers. The amplified PCR products of ITS1 were analysed by sequencing to confirm the identity of *N. caninum*. Of the 26 feral rodents studied, three (11.5%) tested PCR-positive for Nc5 assay, and five (19.2%) were positive for ITS1 PCR assay. Six capybaras (23%) were positive in both assays. All the ITS1 sequences shared 100% similarity with each other and with sequences of *N. caninum* deposited in GenBank. Lymph nodes, heart, liver and blood were the tissues tested positive for the apicomplexan. Our findings provide the first parasitological evidence of *N. caninum* infection in capybaras. Based on our data, we hypothesize that capybaras can act as a reservoir of *N. caninum* and play a role in the sylvatic life cycle of this apicomplexan parasite in South America.

**Keywords:** *Neospora caninum*, neosporosis, capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), rodents, sylvatic cycle, epidemiology.

## 1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um esporozoário, parasito intracelular obrigatório que infecta animais (Dubey *et al.*, 2007). Pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa e à família Sarcocystidae. Há pouco mais de duas décadas era equivocadamente identificado como *Toxoplasma gondii* (Dubey *et al.*, 1988a). Principalmente, devido à grande similaridade morfológica, estrutural, biológica e patogênica que essas duas espécies apresentam. Foi somente em 1984 que Bjerkås *et al.* verificaram pela primeira vez a presença desse novo esporozoário nos tecidos de cães, mas foi quatro anos depois que Dubey *et al.* (1988a) descreveram o novo gênero *Neospora* e a nova espécie *N. caninum*.

Desde a descoberta da espécie mais de 1200 estudos sobre o parasito já foram publicados, e a neosporose despontou como uma importante doença de bovinos e cães no mundo inteiro. Nos últimos anos a doença associada à infecção por *N. caninum* emergiu como uma das principais doenças reprodutivas em rebanhos bovinos, principalmente em rebanhos leiteiros. Atualmente, a neosporose se apresenta como a maior causa de aborto e mortalidade neonatal nesses rebanhos. Representa um grande problema econômico tanto pelas perdas diretas quanto pelas perdas indiretas que ocasiona (Dubey, 1999a; Anderson *et al.*, 2000; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2001; Dubey, 2003).

O custo destinado ao diagnóstico de rebanho para definir a causa do aborto, a perda ou inviabilidade dos fetos, a inseminação artificial ou a cobertura, a queda de produção, a redução da vida útil do animal, o aumento do descarte e da reposição dos animais representam as principais perdas econômicas ocasionadas pela doença (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2006). Em cães a neosporose é manifestada como uma doença neuromuscular inflamatória, ascendente e progressiva, que pode causar paresia, convulsões e morte, principalmente em filhotes que apresentam infecção congênita (Dubey e Lindsay, 1996).

Os cães (*Canis familiaris*) e os coiotes (*Canis latrans*) são reconhecidos como hospedeiros definitivos de *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004a). Nesses animais foi reconhecido o ciclo sexuado do parasito devido à eliminação de oocistos nas fezes, após terem ingeridos tecidos contendo cistos com bradizoítos do esporozoário (Basso *et al.*, 2001; Gondim *et al.*, 2004a).



Os hospedeiros intermediários de *N. caninum*, conforme comprovado pelo isolamento de formas teciduais, são principalmente herbívoros domésticos. O protozoário já foi isolado de bovinos, ovinos, caprinos (Dubey *et al.*, 1990a; Barr *et al.*, 1992; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2003), e mais recentemente também de cervos e búfalos (Rodrigues *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2005). Formas teciduais de *N. caninum* foram encontradas nos tecidos de cães, definindo que esses animais também podem atuar como hospedeiros intermediários (Bjerkås e Dubey, 1991; Gondim *et al.*, 2001).

Até a década de 90 os eqüinos eram considerados hospedeiros de *N. caninum*. Entretanto, Marsh *et al.* (1998) isolaram do cérebro e medula espinhal desses animais um esporozoário muito similar a *N. caninum*, mas que apresentava diferenças com relação à antigenicidade de algumas proteínas, além de uma dissimilaridade entre sete nucleotídeos na seqüência de ITS1. Esses achados sugeriram que o esporozoário isolado de eqüinos representava uma nova espécie do gênero *Neospora*, e foi denominado *Neospora hughesi*. Desde então a neosporose é também considerada uma doença emergente em eqüinos (Lindsay, 2001).

Estudos epidemiológicos com base na detecção sorológica e molecular têm permitido descrever *N. caninum* em outras espécies animais (Dubey *et al.*, 2007). A infecção já foi relatada em herbívoros selvagens (Woods *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 1999b; Ferroglio *et al.*, 2001; Ezio e Ana, 2003) e carnívoros (Lindsay *et al.*, 1996a; Barber *et al.*, 1997; Buxton *et al.*, 1997; Cheadle *et al.*, 1999; Gondim, 2006). Alguns poucos estudos relatam a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no homem, contudo o parasito nunca foi isolado ou identificado. Por isso, o potencial zoonótico de *N. caninum* permanece incerto (Tranas *et al.*, 1999. Lobato *et al.*, 2006). Também é recente a descrição de infecção por *N. caninum* em roedores selvagens (Huang *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2007).

Essas descobertas sugerem a presença de um ciclo selvagem para o parasito. Essa possibilidade pode implicar em conseqüências consideráveis no entendimento da epidemiologia da neosporose, já que cães e outros canídeos, por exemplo, poderiam manter a infecção após consumo de pequenos mamíferos infectados por cistos teciduais do protozoário, e posteriormente

contaminar o ambiente com os oocistos do parasito (Wouda *et al.*, 1999; Ferroglio *et al.*, 2007).

Atualmente, são reconhecidos como potenciais hospedeiros intermediários de *N. caninum*, como demonstrado por imunohistoquímica e detecção de DNA, os roedores *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Apodemus sylvaticus* (Huang *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2007). Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* já foi relatada em capivaras, sugerindo a possibilidade de infecção, mas sem demonstração do parasito (Yai *et al.*, 2008).

As pesquisas em animais selvagens são fundamentais no completo esclarecimento da biologia e transmissão de *N. caninum*. Os objetivos do presente estudo foram: verificar a ocorrência de infecção de *N. caninum* em capivaras e assim determinar a possibilidade desse animal ser um hospedeiro intermediário do referido apicomplexa.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. HISTÓRIA E CLASSIFICAÇÃO DE *Neospora caninum*

Foi no início da década de 80 que Bjerkås *et al.* (1984) começaram a diferenciar a doença causada por *T. gondii* da doença que hoje é reconhecida como principal causa parasitária de perdas econômicas em rebanhos bovinos de todo o mundo. Esses pesquisadores verificaram em cortes histológicos de cérebro de cães a presença de cistos teciduais que continham bradizoítos. Os animais haviam apresentado sinais de encefalomielite e miosite *ante-mortem*, uma apresentação clínica e parasitária até então associada diretamente à toxoplasmose. Contudo, verificaram que esses animais não apresentavam resposta imune humoral contra *T. gondii*. Diante desse quadro foi levantada a hipótese de que um esporozoário semelhante a *T. gondii*, mas imunologicamente distinto se apresentava como causa da morte dos cães.

Frente a tal possibilidade, Dubey *et al.* (1988a) revisaram cortes histológicos de 23 cães atendidos num Hospital Veterinário dos Estados Unidos e que haviam apresentado suspeita ou diagnóstico de toxoplasmose. Para tanto utilizaram técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Em 13 cães confirmaram a presença de *T. gondii*, mas nos outros

10 cães encontraram o novo esporozoário, que apresentava diferenças ultra-estruturais e antigênicas de *T. gondii*. Esse novo parasito foi denominado *N. caninum*. Três anos mais tarde, Bjerkås e Dubey (1991) revisaram o esporozoário verificado por Bjerkås *et al.* (1984) em tecidos de cães, e confirmaram a infecção pela nova espécie *N. caninum*.

O diagnóstico do primeiro caso em bovinos foi relatado por Thilsted e Dubey (1989). Os pesquisadores analisaram cortes histológicos de cérebros de fetos bovinos provenientes de um rebanho leiteiro com histórico de aborto. Observaram a presença de cistos com bradizoítos. A confirmação de infecção por *N. caninum* foi realizada com exame imunohistoquímico.

A neosporose é atualmente reconhecida como uma importante doença em rebanhos bovinos e em cães. Em cães se apresenta por danos neuromusculares, causados por polimiosite, polirradiculoneurite e meningoencefalomielite disseminada (Dubey *et al.*, 1988b). Esses processos patogênicos em conjunto determinam a ocorrência de paresia ascendente e progressiva, convulsões, até a morte do animal. Em bovinos a neosporose é relacionada principalmente a problemas do trato reprodutivo e perdas econômicas, sendo reconhecida como uma das principais causas de aborto, infertilidade e ocorrência de natimortos (Dubey, 1999a; Anderson *et al.*, 2000)

A classificação taxonômica atualmente aceita para *N. caninum* e *N. hughesi* é apresentada no Quadro 1.

CLASSIFICAÇÃO	TÁXON
REINO	Protista
SUBREINO	Protozoa
FILO	Apicomplexa
CLASSE	Sporozoa
ORDEM	Eucoccidiida
FAMÍLIA	Sarcocystidae
GÊNERO	<i>Neospora</i>
ESPÉCIE	<i>N. caninum</i> <i>N. hughesi</i>

**Quadro 1** - Classificação taxonômica da espécie *N. caninum* e *N. hughesi*. Segundo Levine *et al.* (1980), Dubey *et al.* (1988) e Marsh *et al.* (1998).

## 2.2. MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE *N. caninum*

No ciclo biológico de *N. caninum* são identificados basicamente três formas parasitárias, que são as fases infectantes do parasito. São elas: os taquizoítos, os cistos teciduais com bradizoítos e os oocistos (Dubey, 1999) (Figura 1).

Os taquizoítos e cistos teciduais são estágios de reprodução assexuada encontrados intracelularmente nos hospedeiros intermediários. Os oocistos resultam da reprodução sexuada (gametogonia) que ocorre no interior do intestino do hospedeiro definitivo, sendo posteriormente eliminados nas fezes. Representam uma forma de resistência e dispersão dos esporozoários (Dubey *et al.*, 2007).

### 2.2.1. Taquizoítos

Os taquizoítos são as formas de proliferação rápida e medem aproximadamente 6 a 7 x 2 µm. Possuem forma ovóide, redonda ou de meia-lua dependendo do estágio de crescimento ou de divisão, e do plano de corte obtidos nos tecidos (Dubey *et al.*, 2002).

Apesar de infectarem primordialmente células do sistema fagocítico mononuclear, os taquizoítos têm sido identificados numa grande variedade de tecidos e células hospedeiras (Hemphill *et al.*, 1999). Já foi relatada a presença

de taquizoítos no coração, pulmões, fígado, músculo esquelético, pele, rins, cérebro, medula espinhal e placenta (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey e Lindsay, 1993; Wouda *et al.*, 1996). Nesses órgãos foram verificados no interior de neurônios, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, miócitos e células epiteliais de túbulos renais (Dubey e Lindsay, 1993; Locatelli-Dittrich, 2002). Esses dados sugerem que *N. caninum* possui uma baixa especificidade com relação à célula hospedeira, sendo assim capaz de invadir uma grande variedade de células nucleadas (Hemphill *et al.*, 1999a).

Após invasão ativa os taquizoítos permanecem no interior do citoplasma da célula hospedeira dentro de um vacúolo parasitóforo. Nesse vacúolo ocorre multiplicação assexuada por endodiogenia. Nesse tipo de reprodução, dois novos taquizoítos são formados no interior do taquizoíto original (“zoíto mãe”), semelhante a um tipo de brotamento interno. Essa multiplicação é rápida e ocasiona lise e morte celular favorecendo a disseminação da infecção e determinação da doença (Hemphill *et al.*, 1999b).

As principais diferenças observadas entre os taquizoítos de *N. caninum* e de *T. gondii* são relacionadas às róptrias, micronemas, grânulos densos, microporos e número de mitocôndrias da célula hospedeira ao redor do vacúolo parasitóforo (Speer *et al.*, 1999).

Em *N. caninum*, o número de róptrias varia de 6 a 16, algumas estão dispostas de forma posterior ao núcleo e são homogeneamente elétron-densas. Em *T. gondii* o número de róptrias varia de 4 a 10, são mais porosas e raramente apresentam róptrias na porção posterior ao núcleo. Os micronemas são numerosos em *N. caninum*, mas raros em *T. gondii*. Os grânulos densos são mais numerosos na porção posterior de *N. caninum*, e em *T. gondii* são mais numerosos na porção anterior. Os micrósporos são comumente observados em *T. gondii*, mas são raros em *N. caninum*. Nas células infectadas por *T. gondii* são muito mais numerosas as mitocôndrias localizadas ao redor da membrana do vacúolo parasitóforo, ao passo que em *N. caninum* são poucas as mitocôndrias próximas ao vacúolo parasitóforo.

Os taquizoítos raramente estão envolvidos em casos de infecção *per-os* já que não sobrevivem em solução de pepsina ácida, dificilmente resistindo à passagem pelo pH ácido do estômago (Lindsay e Dubey, 1990).

### 2.2.2. Cistos teciduais e bradizoítos

Geralmente, a fase proliferativa, representada pela rápida multiplicação dos taquizoítos, ocasiona uma resposta imune humoral. Assume-se que nessa ocasião os taquizoítos, ao adentrarem uma nova célula hospedeira, sofrem diferenciação em bradizoítos, que são envoltos por uma membrana e originam o cisto tecidual de *N. caninum*. Dentro desse cisto estão presentes os bradizoítos, que apresentam multiplicação lenta e podem ser compreendidos como formas de resistência do parasito (Dubey 1999).

Os cistos teciduais possuem formato arredondado ou oval e medem até 107  $\mu\text{m}$ . A parede do cisto mede até 4  $\mu\text{m}$ , sendo bem mais espessa que a de *T. gondii*. Eventualmente pode ser utilizada como parâmetro na distinção das duas espécies. O cisto contém os bradizoítos que medem aproximadamente 7 a 8 x 2  $\mu\text{m}$  (Dubey 1999; Dubey *et al.*, 2007).

São encontrados primordialmente em tecidos do sistema nervoso central (cérebro, medula espinhal, cerebelo, neurônios, gânglios) e também na retina (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey e Lindsay, 1996). Em tecidos extra-neurais ocorrem principalmente em músculos, já sendo encontrados num músculo ocular de um potro e em músculo esquelético de cães e bezerros (Lindsay *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2004).

Os cistos teciduais são infectantes pela via oral, pois a parede do cisto protege os bradizoítos da digestão ácida do estômago. Portanto, o consumo de tecidos contendo cistos com bradizoítos representa uma via de infecção importante (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999), principalmente no ciclo selvagem, em que a relação de predadorismo é mais presente (Gondim, 2006).

### 2.2.3. Oocistos

Os oocistos são a forma de resistência ambiental de *N. caninum*, e são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (cães e coiotes) na forma não esporulada (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004a). A esporulação ocorre no ambiente dentro de 24 horas (Lindsay *et al.*, 1999). Os oocistos esporulados contêm no seu interior dois esporocistos, e em cada esporocisto há 4 esporozoítos.

Os oocistos de *N. caninum* medem de 10 a 11 µm de diâmetro. São morfológicamente indistinguíveis de *Hammondia heydorni*, que tem o cão como hospedeiro definitivo, e de *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*, que têm o gato como hospedeiro definitivo (Dubey 1999). Os oocistos de *T. gondii* e *H. hammondi* também podem ser encontrados nas fezes de cães, devido ao hábito de coprofagia que alguns animais exercem (Schares *et al.*, 2005).

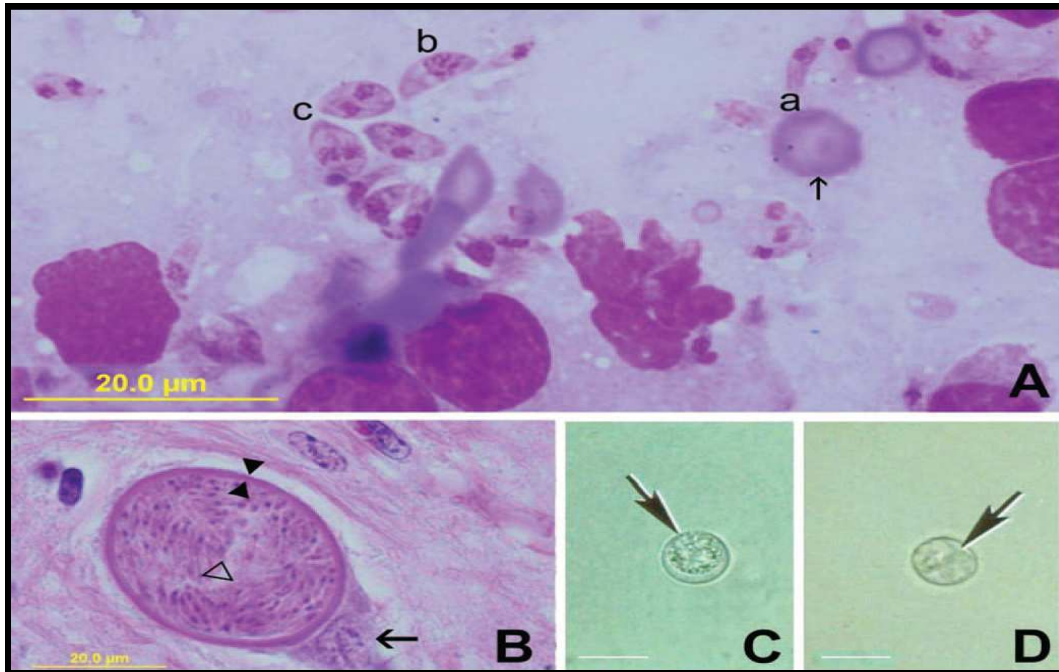
Não há muitos estudos sobre o tempo de sobrevivência dos oocistos de *N. caninum* no ambiente. Assume-se que o tempo de resistência seja similar ao apresentado pelos oocistos de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2007). Os oocistos esporulados de *T. gondii* são muito resistentes no ambiente e podem permanecer infectantes até 54 meses (Dubey, 1998c).

Estudos conduzidos experimentalmente revelam que o cão elimina pequeno número de oocistos, por um curto período de tempo, com frequência indeterminada durante sua vida (Lindsay *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2001). Essas pesquisas sugerem que o cão talvez não seja o principal disseminador da infecção (Dubey *et al.*, 2007).

Os oocistos esporulados são infectantes pela via oral. Os esporozoítos liberados no intestino delgado e penetram nas células epiteliais intestinais, onde se diferenciam em taquizoítos, que se multiplicam, rompem as células e disseminam a infecção (Lindsay *et al.*, 1999).

### 2.3. TRANSMISSÃO

O ciclo biológico de *N. caninum* é muito similar ao de *T. gondii*, exceto pelo fato de *N. caninum* ter como hospedeiros definitivos os cães e coiotes e da neosporose ser uma doença mais importante em bovinos. Por outro lado, *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felídeos de forma geral, e a toxoplasmose é uma doença mais importante no homem, caprinos e ovinos (Dubey *et al.*, 2007).



**Figura 1** - Formas parasitárias de *N. caninum*. (A) Nessa imagem podem ser observados diferentes taquizoítos (coloração de Giemsa). A forma e tamanho dos taquizoítos variam conforme o estágio de divisão e corte histológico: a- taquizoíto alongado; b- antes da divisão; c- três taquizoítos em divisão e comparados em tamanho com uma hemácia (seta); (B) secção histológica de um cisto contendo no seu interior os bradizoítos identificados pela seta aberta (coloração de hematoxilina e eosina). Entre as setas fechadas a espessura da parede do cisto; (C) oocisto não esporulado (escala 10 μm); (D) oocisto esporulado contendo dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos (escala 10 μm). Fonte: adaptado de Dubey *et al.* (2007).

Os hospedeiros intermediários de *N. caninum* são os cães, bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cervos e búfalos. Mas se estima que exista uma diversidade de hospedeiros muito maior para esse parasito. Vários estudos identificaram por reações imunohistoquímicas e/ou detecção de DNA a possibilidade de raposas, rinocerontes, lhamas, antílopes, alpacas e alguns roedores serem hospedeiros intermediários de *N. caninum* (Woods *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1996a; Barber *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1999b).

Outras pesquisas conduzidas por investigação sorológica relatam uma variedade ainda maior de animais que apresentam anticorpos anti-*N. caninum* e que poderiam ser potenciais hospedeiros do protozoário. Algumas pesquisas também investigam a possibilidade de outros canídeos (raposas e lobos, por exemplo) atuarem como hospedeiro definitivo do parasito, mas ainda sem sucesso (Dubey *et al.*, 2007).



De forma geral, *N. caninum* pode ser transmitido pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados ou pela ingestão de tecidos infectados por cistos teciduais. Dificilmente ocorrerá infecção pela ingestão de tecidos contendo taquizoítos, mas essa pode também representar uma via de infecção (Dubey *et al.*, 2007). Esses mecanismos de infecção representam a via de transmissão horizontal ou infecção pós-natal. Outra forma conhecida de infecção por *N. caninum* ocorre quando o parasito passa via transplacentária: da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita). Esses são os principais mecanismos de infecção natural por *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998; Dubey 1999).

Experimentalmente, bezerros podem ser infectados pela via lactogênica, e a presença de DNA de *N. caninum* também já foi demonstrada no colostro de vacas infectadas (Uggla *et al.*, 1998; Moskwa *et al.*, 2007). Contudo, essa via de infecção ainda não foi comprovada em condições naturais de trabalho (Davison *et al.*, 1999). Também é discutida a possibilidade de transmissão de *N. caninum* entre herbívoros pelo consumo de placenta infectada (Modry *et al.*, 2001). Entretanto, a placentofagia ainda não foi confirmada como potencial mecanismo de infecção em herbívoros. A ingestão de oocistos esporulados permanece ainda como a única forma de transmissão horizontal de *N. caninum* comprovada nesses animais (Dubey *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Transmissão de *N. caninum* nos hospedeiros definitivos

Pouco ainda se sabe sobre as fontes de infecção de cães e coiotes no ambiente. Os coiotes foram definidos há pouco tempo como hospedeiros definitivos do parasito (Gondim *et al.*, 2004a), e sendo animais de complicado manejo ainda são poucos os estudos relacionados à infecção natural nessa espécie.

Sabe-se historicamente que os cães podem ser infectados por transmissão vertical pela via transplacentária (Bjerkås *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 1990b), mas assume-se que essa não seria a principal forma de transmissão do parasito nesses animais (Dubey *et al.*, 2007). Sem a manutenção da transmissão pela via horizontal a tendência seria que, em algumas gerações, a prevalência de infecção começasse a reduzir (Barber e Trees, 1998).

A principal via de infecção em cães é ocorre pela transmissão horizontal. Vários estudos apontam que a maioria dos cães são infectados após o nascimento (Wouda *et al.*, 1999; Capelli *et al.*, 2004). Nessa via de transmissão os cães são infectados ao ingerir tecidos do hospedeiro intermediário contendo cistos com bradizoítos viáveis (McAllister, 1999).

Já foi demonstrado que a placenta e o feto de bovinos abortados, as membranas fetais e as carcaças de bezerros natimortos podem conter cistos teciduais viáveis de *N. caninum* (Fioretti *et al.*, 2000; Bergeron *et al.*, 2001a). Em um estudo, foi relatada a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães que consumiram fetos bovinos infectados (Trees e Williams, 2000), mas em outro estudo não foi verificado a eliminação de oocistos nas fezes (Bergeron *et al.*, 2001b). Cães alimentados com placentas de bovinos infectadas eliminaram oocistos nas fezes, mas em pouca quantidade e por poucos dias (Dijkstra *et al.*, 2001).

As principais fontes de infecção natural em cães precisam ainda ser investigadas para definir o real papel que esse animal exerce na epidemiologia da neosporose e na dispersão de *N. caninum*. É sugerido que os cães podem eliminar mais oocistos, por um maior número de dias, quando infectados por tecidos de uma determinada espécie ou grupo animal, que seja hospedeiro intermediário primário de *N. caninum* (Basso *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007). Também é discutida a possibilidade de existência de outros hospedeiros definitivos que possam exercer um papel epidemiológico mais consistente na disseminação ambiental do parasito (Dijkstra *et al.*, 2001).

A pesquisa e confirmação de um ciclo selvático para *N. caninum* e o seu papel na manutenção da infecção em cães e bovinos pode ainda responder a muitas dessas questões (Rosypal e Lindsay, 2005; Gondim, 2006). O envolvimento de animais selvagens na epidemiologia da neosporose ainda é pouco entendido, mas alguns estudos já indicam um aumento do risco de infecção em bovinos presentes em ambientes próximos a canídeos selvagens (Barling *et al.*, 2000).

Recentemente a possibilidade de infecção por *N. caninum* foi relatada em roedores selvagens e sinantrópicos (Huang *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2007). Existe a hipótese de que os roedores podem infectar-se pela ingestão de oocistos esporulados ou mesmo pela

ingestão de placenta e tecidos fetais bovinos abortados (Gondim, 2006). Esta possibilidade é de considerável importância epidemiológica já que roedores são animais cosmopolitas, presentes no ambiente urbano, rural e selvagem. São presas naturais de canídeos e podem ser hospedeiros intermediários em potencial (Rosypal e Lindsay, 2005; Gondim, 2006).

### 2.3.2. Transmissão de *N. caninum* nos hospedeiros intermediários

#### 2.3.2.1. Transmissão vertical (congênita)

A transmissão transplacentária de *N. caninum* em vacas infectadas para suas descendências é uma importante via de infecção em bovinos (Dijkstra *et al.*, 2001). Alguns autores sugerem que esse seja o principal mecanismo de infecção e manutenção do parasito nesses rebanhos (Davison *et al.*, 1999; Bergeron *et al.*, 2000). *N. caninum* apresenta uma elevada eficiência de transmissão transplacentária, sendo considerado o principal patógeno responsável por esse tipo de infecção em bovinos (Dubey *et al.*, 2007).

Diferentemente do que ocorre na toxoplasmose, as vacas infectadas por *N. caninum*, e que abortam devido a sua patogenicidade, não adquirem resistência e podem transmitir o parasito ao feto em gestações subseqüentes (Anderson *et al.*, 2000). Da mesma forma, bezerras infectadas congenitamente poderão desenvolver uma infecção crônica e ainda assim poder transmitir *N. caninum* à sua prole pela via transplacentária (Anderson *et al.*, 1997). Essas características favorecem a manutenção da transmissão vertical nessas populações (Anderson *et al.*, 2000).

Entretanto, é improvável que a transmissão vertical mantenha os níveis de infecção por *N. caninum* a médio e longo prazo. Assim como dificilmente está associada a surtos epidêmicos de abortos em rebanhos bovinos (Schaes *et al.*, 1999). Modelos matemáticos asseguram que a transmissão horizontal é muito importante na manutenção de *N. caninum* nos rebanhos, principalmente pelo fato das vacas serem monoparturientes e da infecção transplacentária não ocorrer em 100% dos casos (French *et al.*, 1999). Caso a transmissão vertical fosse o principal e único modo de dispersão de *N. caninum* nos rebanhos a tendência seria de uma regressiva queda nos níveis de infecção pelo parasito ao longo dos anos (Dubey *et al.*, 2007).

### 2.3.2.2. Transmissão horizontal (pós-natal)

É aceito que a infecção pós-natal pela ingestão de oocistos é a principal peça no entendimento da epidemiologia da neosporose. Essa via de transmissão é atualmente o único modo de infecção horizontal comprovado em rebanhos bovinos, pois ainda não foi determinada a possibilidade de infecção em herbívoros pela ingestão de cistos teciduais ou taquizoítos de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007). Contudo pouco ainda se sabe sobre a fonte de disseminação de oocistos no ambiente onde habitam os rebanhos bovinos, e sobre qual seria o real papel do cão na manutenção desse ciclo (Basso *et al.*, 2001).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

As capivaras utilizadas nesse estudo são todas residentes do Parque Tingüi localizado na cidade de Curitiba, Estado do Paraná (25°25' Sul e 49°16' Oeste). Nesse ambiente os animais possuem livre acesso a todas as áreas do Parque, vivem em pequenas ilhas artificiais e apresentam estreito contato com o público que visita a área.

Tal ambiente possibilita o contato das capivaras com animais domésticos, selvagens e com o homem. A população estimada varia de 200 a 250 animais. Desse total, uma parcela de 26 capivaras foi incluída na amostragem. Ao todo foram 15 fêmeas e 11 machos, com idade aproximada de 2 a 4 anos.

### 3.2. CONTENÇÃO QUÍMICA E LABORATÓRIO DE CAMPO

Os animais foram atraídos pela utilização de cevada a um brete de contenção construído no parque. Para proceder à coleta de material e exame físico foi realizada contenção química das capivaras. A metodologia adotada foi executada pelos professores Ricardo Vilani e Rogério Ribas Lange, do Departamento de Medicina Veterinária, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

O protocolo anestésico utilizado foi o seguinte: (1) 3 mg/Kg de uma solução de zolazepam e tiletamina (Zoletil<sup>®</sup>, Virbac, Carros, França); (2) 0,3

mg/kg de morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristalia, Itapira, São Paulo, Brasil); (3) 1,2 mg/kg de Azaperone (Destress<sup>®</sup>, Serra, Espírito Santo, Brasil).

Baseado em um peso aproximado para cada animal foram calculadas as doses individuais dos fármacos utilizados, que, após o cálculo, foram adicionados ao mesmo dardo. A solução foi administrada via intramuscular pela utilização de uma zarabatana (Figura 2). O peso dos animais incluídos na investigação variou de 37 a 63 Kg, sendo que a média de peso aproximada foi de 50 kg.

Após indução anestésica as capivaras foram deslocadas, com uso de veículo utilitário, ao laboratório de campo que foi adaptado e estruturado em uma casa de vigilância interna do Parque Tingüi.



**Figura 2** - Esquemática do método de captura e deslocamento das capivaras avaliadas nesse estudo. (A) Uso de zarabatana para disparo de dardo anestésico objetivando a contenção química de capivaras contidas em brete após ceva; (B) Capivara atingida pelo dardo após indução anestésica; (C) Deslocamento da capivara contida quimicamente; (D) Início do trabalho de identificação e biométrico e deslocamento do animal ao laboratório de campo. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008.

### 3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS CAPIVARAS

No laboratório os animais foram identificados com brincos. Cada brinco possuía numeração individual e duas colorações. Nos machos o brinco era implantado na orelha esquerda e apresentava coloração vermelha. Já nas fêmeas o brinco era implantado na orelha direita e apresentava coloração amarela.

Esse tipo de identificação é fácil de executar e facilita a visualização à distância, características importantes no manejo de animais selvagens. Contudo, apresenta a desvantagem de não ser resistente ao tempo, o que pode dificultar uma identificação em médio prazo dos animais capturados. Para identificação das amostras foi adotado o número respectivo da capivara seguido de seu sexo. Ao todo foram capturados 26 animais, com média de idade de 2 a 4 anos.

### 3.4. COLETA DAS AMOSTRAS

#### 3.4.1. Sangue

Amostras de sangue de 26 capivaras foram coletadas da veia femoral num volume total de 10 mL (Figura 3). Desse volume, 5 mL foram depositados em tubos com anticoagulante EDTA (tubos BD tipo *Vacutainer*<sup>®</sup> *spray-coated* K<sub>2</sub>EDTA) para preservação do sangue total. O volume de sangue restante foi adicionado em tubos de coleta sem anticoagulante (tubos BD *Vacutainer*<sup>®</sup>) para posterior separação do soro.

O sangue total foi utilizado na extração de DNA para detecção molecular de *N. caninum*. As amostras de sangue em tubo sem anticoagulante foram centrifugadas (2.500 X g durante 5 minutos) e o soros separados e armazenados a -20°C.

#### 3.4.2. Fígado

As amostras de tecido do parênquima hepático de vinte e quatro capivaras foram obtidas pela realização de biópsia percutânea incisional, guiada por imagem ultrassonográfica. Para evitar a ocorrência de peritonite e de contaminação cruzada entre as amostras foram utilizadas agulhas de biópsia esterilizadas e individuais para cada animal.

Para a execução da biópsia hepática cada capivara foi posicionada em decúbito lateral esquerdo ou decúbito dorsal. A seguir a pele da área de inserção da agulha foi depilada, higienizada e submetida à anti-sepsia. Então, a pele foi incisionada com lâmina de bisturi num comprimento de 2 a 3 cm. Esse procedimento teve por objetivos reduzir ao máximo a possibilidade de contaminação e facilitar a inserção da agulha de biópsia na cavidade abdominal.

A imagem do fígado foi captada pelo aparelho de ultrassonografia (“Aloka SSD 500 B-mode system”). Subseqüentemente, pela orientação anatômica e de imagem, a agulha de biópsia foi inserida na cavidade abdominal em direção ao fígado: caudo-cranial, angulação oblíqua de 30-45° (Figura 3). As amostras obtidas mediram aproximadamente 1 cm x 0,2 cm e foram preservadas em tubos individuais contendo solução de NaCl 0,9% estéril, a 6-8°C até encaminhamento ao laboratório, onde foram processadas e armazenadas.



**Figura 3** - Método de coleta de fragmento de parênquima hepático (A) e sangue (B) de capivara. (A) Obtenção da imagem do fígado com transdutor 7,5 MHz, inserção da agulha de biópsia em direção ao órgão para realização da biópsia hepática; (B) Coleta de sangue da veia femoral de capivara contida quimicamente. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008.

### 3.4.3. Necropsia

Durante o trabalho de campo três capivaras foram a óbito devido a complicações de manejo. Esses animais foram encaminhados à necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR.

Desses animais foram coletadas amostras de fígado, linfonodos, baço e coração. Essas amostras foram acondicionadas em tubos contendo solução de NaCl 0,9% estéril e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular, onde foram armazenadas a -20°C até a extração de DNA.

### 3.5. ANÁLISE MOLECULAR

#### 3.5.1. Extração de DNA

As amostras de DNA utilizadas nesse estudo foram obtidas por três técnicas de extração conforme o tipo de tecido. Para extração de DNA das amostras de fígado obtidas por biópsia (n=24) foi utilizado o kit de extração “ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Mini-Tissue” (ver item 3.5.1.1). As amostras de sangue (n=26) tiveram seu DNA extraído pela utilização do kit de extração “illustra blood genomicPrep Mini Spin” (item 3.5.1.2). As amostras de fígado (n=3), linfonodos (n=3), baço (n=3) e coração (n=3), obtidas na necropsia, foram submetidas à extração de DNA pela técnica de fenol-clorofórmio (item 3.5.1.3) e também pelo kit de extração “ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Mini-Tissue”.

##### 3.5.1.1. Técnica de extração de DNA por esferas magnéticas

As amostras de fígado, que foram coletadas por biópsia incisional hepática, e as amostras de linfonodos, baço e coração coletados na necropsia, foram submetidas à extração de DNA pela técnica de esferas magnéticas (“magnetic beads”). Essa técnica também foi utilizada para extração de DNA de taquizoítos de *N. caninum* da cepa referência NC-1, utilizado posteriormente como controle positivo nas reações de PCR (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2003).

Para execução da técnica foi utilizado o kit de extração “ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Mini-Tissue” (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA, catálogo número CS11204), que é destinado à extração de DNA genômico de pequenos fragmentos de tecido.

Esse método foi escolhido pelo tamanho relativamente pequeno das amostras de parênquima hepático biopsiados. Também devido ao fato da impossibilidade de reamostragem no caso de perda das amostras ou da necessidade de mais material, já que seria inviável recapturar o animal já manejado e amostrado. Essa técnica permite isolar DNA em maior quantidade e qualidade de pequenas amostras.

O princípio da técnica de extração por esferas magnéticas está basicamente ligado à característica aniônica do DNA, que possui carga negativa e tende a ligar-se em moléculas de carga positiva. Nessa técnica, essa



propriedade do DNA é associada a princípios de magnetismo para extrair purificar o DNA.

A primeira etapa na extração do DNA consistiu da lise de membranas celulares, proteínas e RNA. Inicialmente, para assegurar completa lise das membranas celulares, as amostras de fígado, linfonodos, baço e coração foram submetidas à ruptura por ultra-som. Foram realizados 2 ciclos de 30 segundos a 70 Hz de frequência, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo. Para evitar a contaminação entre as amostras foi utilizado material esterilizado individual.

Nas etapas seguintes o DNA foi extraído conforme recomendações do fabricante do kit “ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Mini-Tissue” (Anexo 1).

#### 3.5.1.2. Técnica de extração de DNA pela membrana de sílica

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada conforme recomendações do kit de extração “illustra blood genomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare UK Limited<sup>TM</sup>, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Essa técnica foi utilizada para elevar a qualidade e quantidade de DNA purificado, e otimizar o material para as metodologias de Biologia Molecular empregadas posteriormente (Anexo 2).

#### 3.5.1.3. Técnica de extração de DNA pelo fenol-clorofórmio

As amostras de linfonodos, baço, coração e fígado, coletadas na necropsia também foram submetidas à extração e purificação de DNA pelo método de fenol-clorofórmio. Para tanto, foi utilizado protocolo proposto por Sambrook e Russel (2001), com algumas adaptações.

Inicialmente, para assegurar completa lise do tecido e das membranas celulares, as amostras foram submetidas à lise por ultra-som. Foram realizados 3 ciclos de 30 segundos a 70 Hz de frequência, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo. Para evitar a contaminação foi utilizado material esterilizado para cada amostra. As amostras foram mantidas em banho de gelo para evitar o aquecimento.

Então, foram adicionados 450 µL de tampão Tris-EDTA (100mM Tris HCl pH 8,0; 0,1M EDTA pH 8,0), 50 µL de SDS 20% e 10 µL de proteinase K (20mg/mL). A mistura foi homogeneizada, em agitador de tubos, e a seguir

incubada em banho-maria a 55°C por 14 horas, sob agitação periódica ("overnight"). No dia seguinte, para desnaturação da proteinase K, foi realizada incubação a 95°C por 10 minutos. Após este tempo, as amostras foram resfriadas e adicionadas de 8 µL de RNase (20 mg/mL) e permaneceram em banho-maria a 37°C por 2 horas.

A desproteinização e purificação do DNA foram realizadas por adição volume/volume de solução de fenol, seguido de homogeneização em orbital durante 15 minutos. Seguiu-se à centrifugação a 12.000 X g por 5 minutos, em temperatura ambiente. O máximo possível de sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo. Esse procedimento foi realizado duas vezes. A seguir foi adicionado 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguido de homogeneização em orbital durante 10 minutos.

Após, foi realizada centrifugação a 12.000 X g por 5 minutos, em temperatura ambiente. O máximo possível de sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Por último, foi adicionado 500 µL de clorofórmio, seguido de homogeneização lenta em orbital por 10 minutos. Seguiu-se à centrifugação a 12.000 X g por 5 minutos, em temperatura ambiente. O máximo de sobrenadante foi transferido para novo microtubo.

Na última fase foi realizada a precipitação do DNA extraído. Para tanto foi adicionado 600 µL de etanol absoluto gelado, seguido de homogeneização delicada por inversão, e posterior adição de 30 µL de acetato de sódio a 3M seguido de homogeneização delicada por inversão. A seguir as amostras foram mantidas a -20°C durante 14 horas ("overnight").

Na manhã seguinte, foi realizada centrifugação a 12.000 X g por 30 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo, e o sedimento (contendo precipitado de DNA) foi lavado duas vezes com etanol 70%GL. Para tanto, foi adicionado a cada amostra 300 µL de etanol 70%GL, seguido de centrifugação a 12.000 X g por 15 minutos, 4°C e descarte do sobrenadante.

Finalmente, as amostras foram secadas à temperatura de 37°C e após secagem realizada a ressuspensão do DNA em 125 µL de água ultrapura. Para eluição do DNA as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2

horas e após “overnight” a 4°C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C até a sua utilização (Anexo 3).

#### 3.5.1.4. Análise do DNA extraído

A avaliação da quantidade e qualidade do DNA extraído foi realizada por leitura em espectrofotômetro a 260nm/280nm. A leitura em 260 nm determina a concentração de ácidos nucleicos da amostra e a leitura em 280 nm a concentração de proteínas. O ideal é que a razão ácidos nucleicos/proteínas esteja entre 1,7 e 2,0.

#### 3.5.2. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para a realização do diagnóstico molecular de *N. caninum* nas amostras de sangue, fígado, baço, linfonodos e coração das capivaras.

Para tanto, foram utilizados iniciadores que delimitam o segmento de DNA da região Nc5 do protozoário (Yamaga *et al.*, 1996). Essa região é muito específica para *N. caninum*, sendo claramente distinguível mesmo de *T. gondii* (Kaufmann *et al.*, 1996; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2003). Além da ótima especificidade, a utilização da PCR para esse segmento apresenta boa sensibilidade quando empregada no diagnóstico de *N. caninum* em tecidos de hospedeiros infectados (Hughes *et al.*, 2006).

Além de verificar a ocorrência da região Nc5 nas amostras de DNA de tecidos de capivaras, também foi verificada a presença da região ITS1 (“internal transcribed spacer”). A região ITS ocorre no DNA ribossomal e tem sido utilizada como importante ferramenta molecular nos estudos de filogenia. A região ITS1, por exemplo, está presente entre os genes 18S e 5.8S e é um marcador genético muito importante, sendo utilizado cada vez mais na análise filogenética de vários organismos (Homan *et al.*, 1997; Gondim *et al.*, 2004b).

Dependendo da espécie a região ITS1 apresenta determinados graus de variação intra-específica. Assim, a análise da seqüência de nucleotídeos da região ITS1 constitui uma importante ferramenta para caracterização de espécies, definição de isolados de um determinado organismo e diferenciação entre parasitos estreitamente relacionados (Marsh *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2001; Gondim *et al.*, 2004b; Slapeta *et al.*, 2002).

A utilização desses dois marcadores permite o diagnóstico específico de *N. caninum* e possibilita, após o seqüenciamento de ITS1, a diferenciação da seqüência entre as espécies próximas de *N. caninum* e a possibilidade de definição de uma nova espécie ou isolado (Slapeta *et al.*, 2002; Gondim *et al.*, 2004). A espécie *N. hughesi* foi definida após a verificação de alterações da seqüência de nucleotídeos de ITS 1 (Marsh *et al.*, 1998).

### 3.5.2.1. Região Nc5

Para a amplificação de segmentos de DNA da região Nc5 foram utilizados os iniciadores Np4, Np6, Np7 e Np21 descritos por Yamage *et al.* (1996). Os oligonucleotídeos Np7 e Np21 são os iniciadores diretos ou senso, enquanto Np4 e Np6 são os iniciadores reversos ou antisenso. Para cada PCR foram utilizados os seguintes pares de iniciadores Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np4 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características dos iniciadores utilizados na detecção da região Nc5 de *Neospora caninum* no sangue, fígado, coração, baço e linfonodos de capivaras.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência nucleotídica (5'-3')	Direção	Posição*
Np4	CCTCCCAATGCGAACGAAA	Antisenso	806-824
Np6	CAGTCAACCTACGTCTTCT	Antisenso	758-776
Np7	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	Senso	550-568
Np21	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Senso	449-467

\* Relativa à seqüência nucleotídica do DNA de *N. caninum* onde ocorre a hibridização de cada iniciador.

Para a realização da técnica da PCR foi utilizado protocolo adotado por Locatelli-Dittrich *et al.* (2003) com algumas modificações. Para cada amostra foi utilizado material esterilizado, ponteiras com filtro, o fluxo laminar foi devidamente desinfetado e a lâmpada UV mantida ligada por 20 minutos. Todas as condições de segurança para evitar contaminações com amplicons foram devidamente respeitadas. As soluções de amplificação ("mix") da PCR foram

preparadas no interior do fluxo laminar, localizado num ambiente separado. O DNA das amostras foi adicionado em outro ambiente. Todos esses cuidados são críticos para evitar contaminação entre as amostras e com contaminantes do ambiente.

O volume final de cada solução de amplificação foi de 60  $\mu$ L. Cada solução continha 6,0  $\mu$ L de tampão DNA polimerase 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de dNTPs, 0,1% de Triton-100X, 96  $\mu$ mol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 80 a 100 ng de DNA da amostra. Água ultrapura foi adicionada na quantidade suficiente para completar o volume final da reação (Anexo 4). Em cada ciclo de reações foram utilizados controles positivos e negativos.

Após a adição do DNA as amostras foram homogeneizadas individualmente e colocadas no termociclador (“Hibayd GeneAmp thermocycler”), que foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para a hibridização e 3 minutos e 30 segundos a 74°C para a extensão do DNA complementar. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

#### 3.5.2.2. Região ITS1

Para obtenção da amplificação de DNA da região ITS1 de *N.caninum* foram utilizados os iniciadores ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' descritos por White *et al.* (1990). Para a realização da PCR foi utilizado protocolo proposto por Gondim *et al.* (2004b) com algumas adaptações.

O volume final de cada reação de amplificação foi de 50  $\mu$ L. Cada solução continha 5,0  $\mu$ L de tampão DNA polimerase 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de dNTPs, 0,1% de Triton-100X, 30  $\mu$ mol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 80 a 100 ng de DNA da amostra. Água ultrapura foi adicionada na quantidade suficiente para completar o volume final da reação (Anexo 5).

Foram utilizados em cada reação de amplificação amostra contendo DNA de *N. caninum* (cepa referência NC-1) e amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles positivo e negativo respectivamente.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 20 segundos para desnaturação, 57°C durante 45 segundos para a hibridização e 74°C por 45 segundos para a extensão do DNA. Na última etapa foi programado um ciclo de 2 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

### 3.5.2.3. Identificação dos produtos da PCR

Após a amplificação no termociclador, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,6% e submetidos à eletroforese a 60 V durante 2 horas. Então o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 20 minutos e posteriormente visualizado em transiluminador com luz UV e fotodocumentado (“Life Technologies™ Gibco BRL UV transilluminator documentation system”).

### 3.5.3. Seqüenciamento de região ITS1 DE *Neospora caninum*

As amostras que apresentaram resultados positivos na amplificação da região ITS1 tiveram seus produtos de amplificação seqüenciados para confirmação da identidade de *N. caninum* (Anexo 6).

#### 3.5.3.1. Purificação

Para obter o isolamento ou purificação dos produtos de PCR para ITS1 foi utilizado o método do polietilenoglicol (PEG). A purificação antes da reação de seqüenciamento é necessária para eliminação de todos os nucleotídeos não incorporados na seqüência de ITS1 amplificada. Nessa etapa são eliminados os iniciadores e os dNTPs não utilizados na PCR, bem como o DNA da amostra que não foi amplificado.

Inicialmente foi adicionado 40 µL de PEG à solução de PCR contida no microtubo (relação volume/volume). Essa mistura foi transferida a um microtubo de 500 µL e incubada a 37°C durante 30 minutos. Após incubação o produto foi centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado com

pipeta de 100 µL. Então foi adicionado ao sedimento 125 µL de etanol 80% gelado, incubou-se por 1 minuto e foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo.

Foi adicionado, pela parede do microtubo, 125 µL de etanol 96% gelado e retirado logo em seguida, e por inversão do microtubo o excesso de sobrenadante foi todo descartado. O excesso de etanol interfere negativamente na reação de PCR, podendo resultar em falhas na interpretação da seqüência nucleotídica. Após foi realizada evaporação do etanol 96% em estufa 70°C. Finalmente, o sedimento foi ressuspensão em 15 µL de água ultrapura e mantido em incubação à temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

#### 3.5.3.2. Quantificação

A quantificação dos produtos de PCR purificados foi realizada por leitura em espectrofotômetro a 260nm/280nm.

#### 3.5.3.3. Reação de seqüenciamento

Para a realização da reação de seqüenciamento propriamente dita foram utilizados os iniciadores PN1 5'CTCCTTCGGAGAGGGGTA3' e PN2 5'TCTTCCCTCAAACGCTATC3' (Holmdahl e Mattsson, 1996).

Em cada reação de seqüenciamento foram adicionados: 20ng do produto de PCR purificado, 0,5 µL de tampão 5 X para reação de seqüenciamento, 0,5 µL de cada iniciador (é utilizado um iniciador para cada reação), 0,5 µL de "Big Dye 3.1" e água ultrapura para completar 10 µL de solução. Todo esse procedimento e as etapas seguintes foram executadas em ambiente escuro para não haver redução na fluorescência emitida pelo "Big Dye 3.1".

Após preparo da solução de reação as amostras foram levadas ao termociclador, que foi programado para execução de 35 ciclos: 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos e 60°C durante 4 minutos. Seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

#### 3.5.3.4. Precipitação e seqüenciamento

Após a reação foi adicionado em cada microtubo 40 µL de isopropanol 75% seguido de homogeneização com pipetagem. Então, foi realizada uma rápida centrifugação e manutenção em temperatura ambiente durante 20

minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 13000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo. Subseqüentemente, foi adicionado 200 µL de etanol 70% a temperatura ambiente e realizada centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos.

Todo excesso de etanol foi cuidadosamente removido com pipeta. Na seqüência foi realizada secagem das amostras em “speed vac” a 60°C durante 45 minutos. Posteriormente o sedimento foi ressuspensão em 20 µL de formamida “Hi-Di” e a seguir injetados no seqüenciador (“Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser”).

#### 3.5.3.5. Análise das seqüências de ITS1

As seqüências nucleotídicas de ITS1 obtidas pela amplificação e seqüenciamento foram alinhadas e comparadas a dados presentes no “GenBank”. Para comparações das seqüências obtidas foi utilizado o programa “BLAST” disponível no site da NCBI (“National Center for Biotechnology Information”).

## 4. RESULTADOS

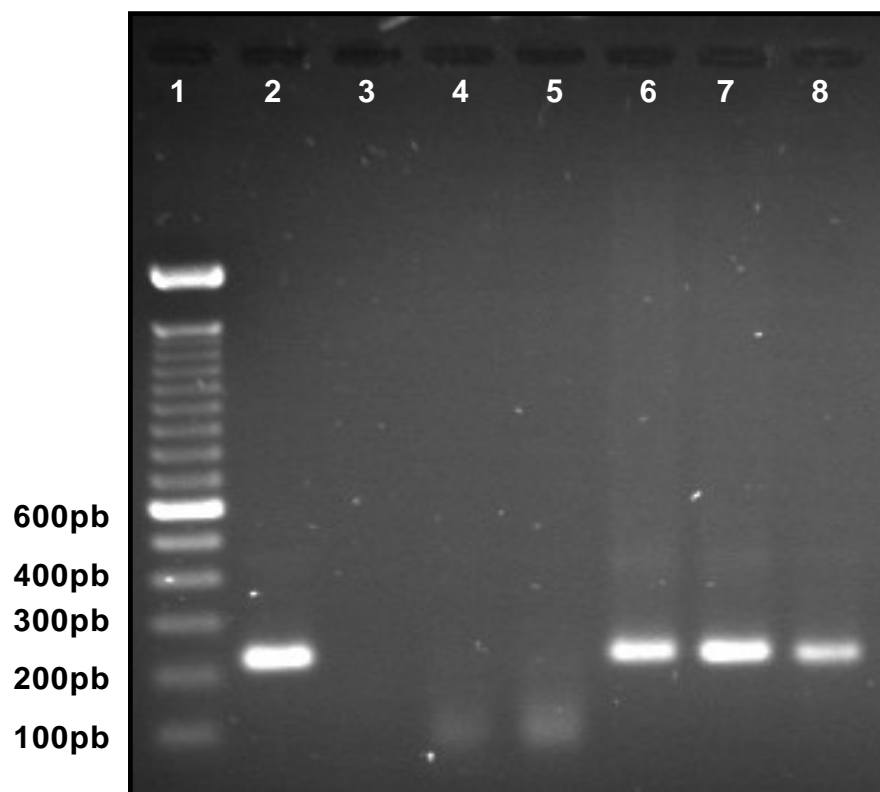
### 4.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Foi verificada a amplificação de fragmentos de DNA da região Nc5 do genoma de *N. caninum* nos tecidos de três, das vinte e seis capivaras analisadas nesse estudo. Esse resultado representa uma prevalência de infecção por *N. caninum* de 11,5%. Os três pares de iniciadores utilizados para a pesquisa da região Nc5 demonstraram a presença de *N. caninum* nos mesmos animais e tecidos, apresentando uma concordância de 100%.

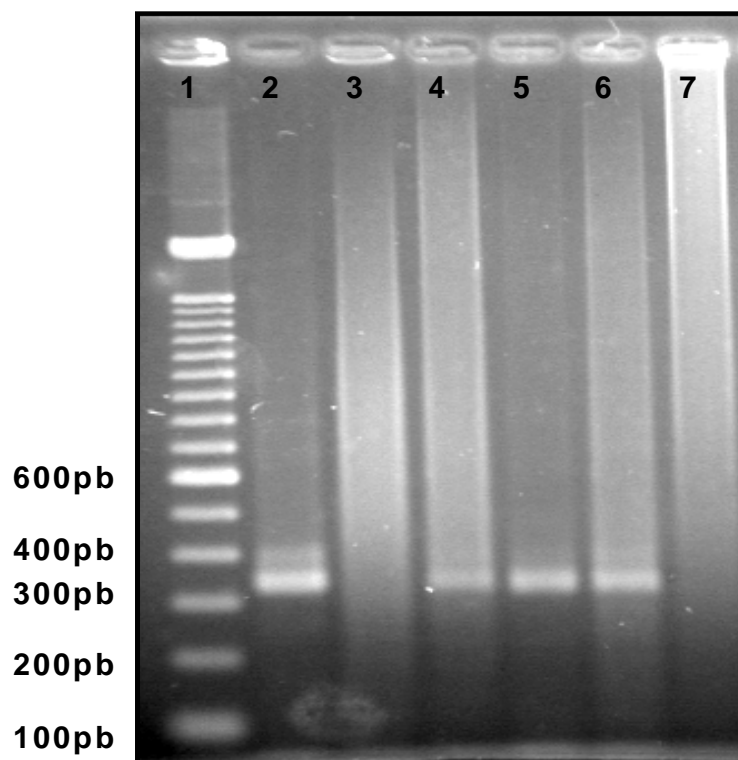
Os tecidos nos quais foi encontrado DNA de *N. caninum* foram os linfonodos de duas capivaras e fígado de outra capivara. Os animais positivos para *N. caninum* nos linfonodos resultaram negativos na pesquisa do parasito no sangue, fígado, baço e coração. Todas as amostras de baço, coração e sangue foram negativos na pesquisa da região Nc5 de *N. caninum*. Os animais positivos foram: 34 macho, 36 macho e 38 fêmea.



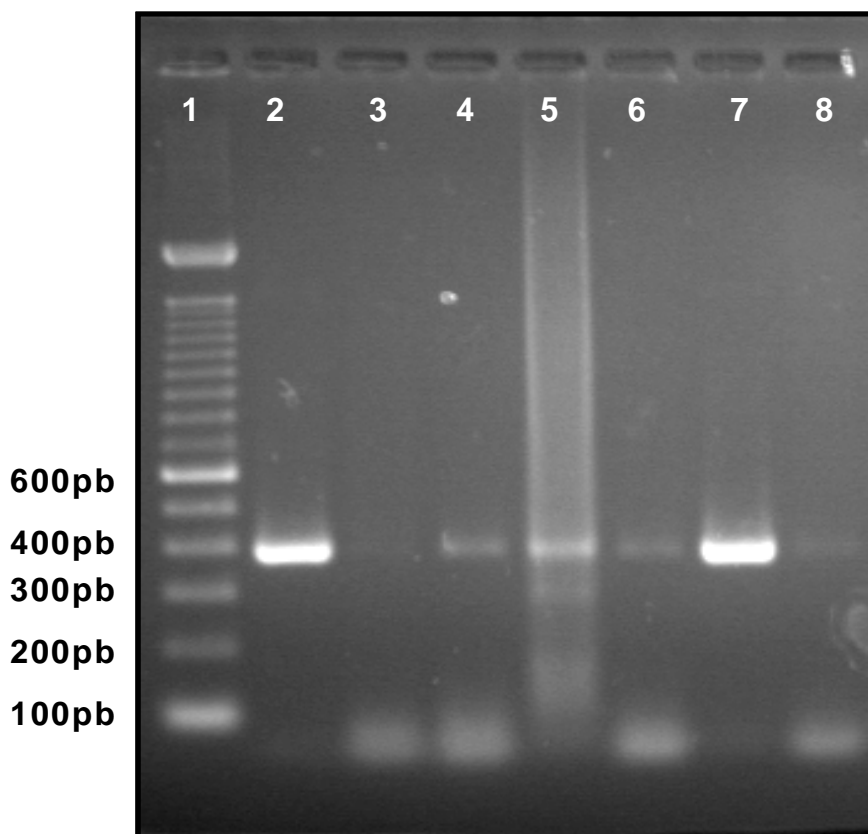
Nas figuras 4, 5, e 6 estão apresentados os produtos de amplificação da PCR para os pares de iniciadores Np7/Np4, Np21/Np6 e Np21/Np4 utilizados nessa pesquisa.



**Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np7 e Np4. Os fragmentos amplificados indicam a presença de DNA de *N. caninum* nos tecidos de capivaras. (1) Marcador molecular 100pb Sigma<sup>TM</sup>; (2) Cepa de referência Nc-1 de *N. caninum* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4) e (5) Amostras negativas (39F sangue e 40F fígado respectivamente); (6), (7) e (8) Presença de produto de amplificação específico de *N. caninum*, correspondendo respectivamente à capivara 34 macho (linfonodo), capivara 36 macho (linfonodo) e capivara 38 fêmea (fígado) infectadas pelo protozoário. Tamanho do fragmento de amplificação esperado: 275pb.



**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np21 e Np6. Os fragmentos amplificados indicam a presença de DNA de *N. caninum* nos tecidos de capivaras. (1) Marcador molecular 100pb Sigma<sup>TM</sup>; (2) Cepa de referência Nc-1 de *N. caninum* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4), (5) e (6) Presença de produto de amplificação específico de *N. caninum*, correspondendo respectivamente à capivara 34 macho (linfonodo), capivara 36 macho (linfonodo) e capivara 38 fêmea (fígado) infectadas pelo protozoário; (7) Amostra negativa (34 M baço). Tamanho do fragmento de amplificação esperado: 328pb.



**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região Nc5 de *N. caninum* utilizando os iniciadores Np21 e Np4. (1) Marcador molecular 100pb Sigma™; (2) Cepa de referência Nc-1 de *N. caninum* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4) e (5) Amostra de DNA de linfonodo da capivara 34M apresentando amplificação da região Nc5 de *N. caninum*. Na linha 5 foi utilizada maior concentração de DNA; (6) Presença de produto de amplificação específico de *N. caninum*, correspondendo à capivara 38 fêmea (fígado); (7) Amostra de DNA de linfonodo da capivara 36M apresentando amplificação da região Nc5 de *N. caninum*; (8) Repetição da linha 6; Tamanho do fragmento de amplificação esperado: 376pb.

Na pesquisa da região ITS1 foi verificado a presença de DNA de *N. caninum* em cinco animais, o que representa uma prevalência de infecção de 19,2% (5/26). Foi possível verificar a presença do parasito nos seguintes tecidos: sangue, fígado, coração e linfonodos. Os animais positivos para *N. caninum* pela pesquisa da região ITS1 foram: 34 macho, 38 fêmea, 26 fêmea, 29 fêmea e 28 fêmea.

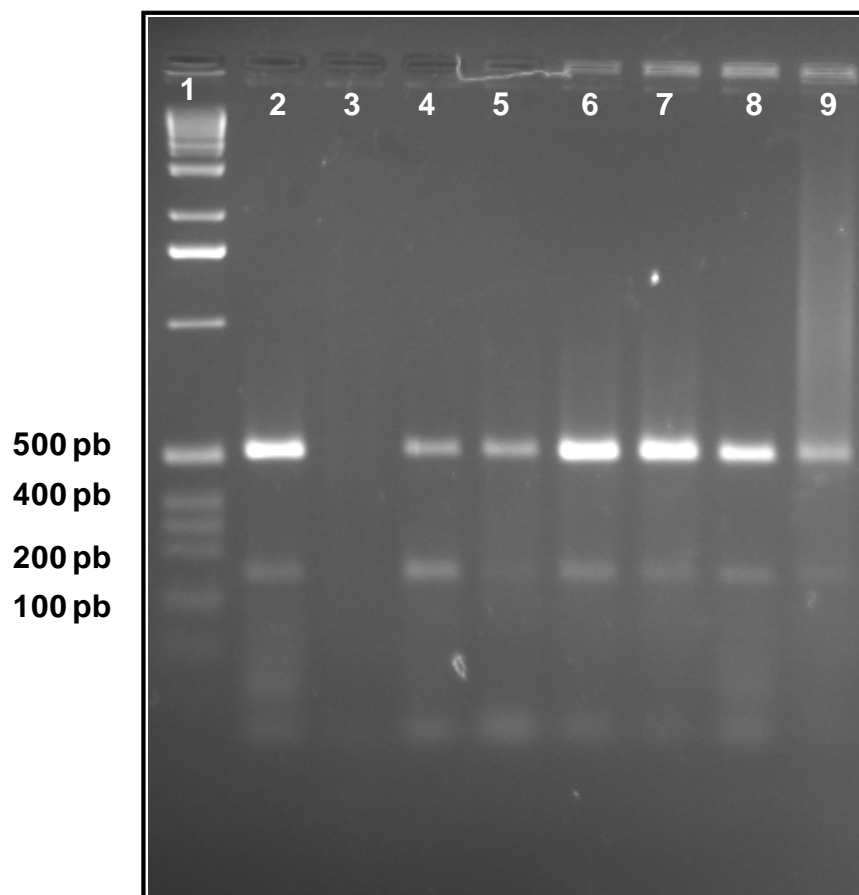
Além de verificar mais animais positivos, a PCR de ITS1 também detectou maior número de tecidos infectados. O animal 34 macho teve confirmação da presença de DNA de *N. caninum* para ITS1 nos linfonodos e no coração. A capivara 38 fêmea teve presença de DNA de *N. caninum* confirmada no fígado e

também no sangue, 26 fêmea demonstrou positividade para *N. caninum* nos linfonodos, fígado e coração, 29 fêmea foi positiva no sangue e 28 fêmea teve diagnóstico confirmado para ITS1 no fígado. Na figura 7 estão representados os produtos de amplificação obtidos nas amostras positivas para ITS1.

Houve uma concordância parcial entre os resultados obtidos na pesquisa da região Nc5 e de ITS1 de *N. caninum*. Enquanto a PCR da região NC5 resultou uma prevalência de 11,5% (3/26), a amplificação da região ITS1 detectou DNA de *N. caninum* em 19,2% (5/26) dos animais pesquisados (Tabela 2). Considerando os dois testes, a prevalência de infecção por *N. caninum* em pelo menos um dos testes foi de 23% (6/26), e a co-positividade entre Nc5 e ITS1 foi de 7,7% (2/26).

**Tabela 2** - Relação de tecidos e total de capivaras positivas para as duas seqüências alvo do DNA de *N. caninum* utilizados nessa pesquisa (Nc5 e ITS1). Prevalência de infecção considerando cada um dos testes, ambos os testes ou os dois testes associados.

Região alvo	Tecidos analisados (PCR positivo/ total)					Número de animais positivos (percentual)
	Sangue	Fígado	Baço	Coração	Linfonodos	
<b>Nc5</b>	0/26	1/26	0/26	0/26	2/26	3/26 (11,5%)
<b>ITS1</b>	2/26	3/26	0/26	1/26	2/26	5/26 (19,2%)
<b>Nc5 e ITS1</b>	0/26	1/26	0/26	0/26	1/26	2/26 (7,7%)
<b>Nc5 ou ITS1</b>	2/26	3/26	0/26	1/26	3/26	6/26 (23%)



**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de *N. caninum* utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5. (1) Marcador molecular 1Kb Sigma<sup>TM</sup>; (2) Cepa de referência Nc-1 de *N. caninum* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 38 fêmea (fígado); (5) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 26 fêmea (coração); (6) e (7) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 34 macho (linfonodo e coração respectivamente); (8) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 28 fêmea (fígado); (9) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 29 fêmea (sangue).

#### 4.2. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE ITS1

Os produtos de amplificação obtidos na PCR para ITS1 foram seqüenciados para confirmar a identidade genômica de *N. caninum*. As seqüências de ITS1 obtidas apresentaram 100% de similaridade a seqüências de ITS1 de *N. caninum* disponível no “GenBank” por Pena *et al.* (2007) em isolado do Brasil (número de acesso: DQ832318.1).

## 5. DISCUSSÃO

Nesse estudo é relatada pela primeira vez a presença de DNA de *N. caninum* em tecidos de capivaras. Esse resultado demonstra de forma inédita a primeira evidência parasitológica da infecção desses roedores por *N. caninum* e levanta a hipótese da capivara ser um hospedeiro intermediário natural do parasito. Para a obtenção do diagnóstico de *N. caninum* foram utilizadas a técnica de PCR e de seqüenciamento de DNA. Essas técnicas apresentam elevada especificidade no diagnóstico do parasito.

Ao todo, considerando a positividade da PCR em ambos os testes para a região Nc5 e região ITS1, *N. caninum* foi encontrado em 7,7% das capivaras analisadas. Sendo que a região Nc5 foi encontrada nos tecidos de 11,5% dos animais amostrados. Já na análise de ITS1, verificou-se a ocorrência de infecção por *N. caninum* de 19,2%. Contudo, se adotado como critério de positividade a presença de produtos de amplificação em pelo menos um dos dois testes, a prevalência de infecção por *N. caninum* foi de 23%. Tais prevalências são comparáveis com resultados obtidos em outros roedores selvagens (Huang *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2007).

A concordância parcial na pesquisa da região Nc5 e ITS1 em *N. caninum* pode decorrer da ocorrência de determinadas variabilidades genótípicas nas seqüências de DNA ribossomal de ITS1 e no DNA de Nc5 (Jenkins *et al.*, 2007). Também é plausível que a hibridização dos iniciadores para a região Nc5 apresente maior nível de stringência e, portanto, de maior especificidade de ligação se comparada à região ITS1.

A seqüência Nc5 do DNA de *N. caninum* é altamente específica para esse protozoário, bastante conservada, apresenta múltiplas cópias no seu genoma, não sendo encontrada no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis* spp. ou *Hammondia* spp. (Yamage *et al.*, 1996). Por outro lado, a sensibilidade da PCR para cada teste pode variar devido à existência de menor ou maior número de cópias de cada seqüência, Nc5 ou ITS1, no DNA de *N. caninum* (Slapeta *et al.*, 2002; Gondim *et al.*, 2004b).

De forma similar, Jenkins *et al.* (2007), trabalhando com *N. caninum* em tecidos de roedores (*Mus musculus*; *Rattus norvegicus*), encontraram maior sensibilidade diagnóstica na pesquisa de ITS1 em comparação com a pesquisa de Nc5. Nesse estudo, os autores encontraram a seqüência Nc5 em 9,5% e a

seqüência alvo de ITS1 em 21,9% dos animais pesquisados, o que corrobora nossos resultados.

A realização da reação de PCR visando a região Nc5 em conjunto à amplificação e seqüenciamento de ITS1 constituem uma ferramenta molecular muito segura no diagnóstico de *N. caninum*. Além disso, permitem a observação de variabilidades intra-específicas que ocorrem na região ITS1 para esse parasito.

As seqüências dos produtos de amplificação da região ITS1, obtidos nesse estudo, apresentaram 100% de similaridade entre si e com a seqüência de ITS1 obtida por Pena *et al.* (2007) em isolado do Brasil (número de acesso no "GenBank": DQ832318.1). Esse dado confirma a identidade dos produtos de PCR para ITS1 obtidos nesse estudo.

Quanto aos tecidos parasitados, foi verificada a presença de *N. caninum* nos linfonodos, fígado, coração e sangue dos animais pesquisados. Esse resultado demonstra uma ampla disseminação do apicomplexa nos tecidos da capivara. Tal fato pode favorecer a hipótese de esse animal ser um bom hospedeiro intermediário natural de *N. caninum*, favorecendo a infecção dos hospedeiros definitivos e permitindo uma dispersão eficiente do parasito.

Alguns estudos sugerem que *N. caninum* apresenta uma baixa especificidade com relação à célula hospedeira, sendo capaz de invadir uma grande variedade de células nucleadas e, conseqüentemente, infectar grande variedade de tecidos (Hemphill *et al.*, 1999a). Em outras espécies animais o parasito já foi demonstrado no coração, pulmões, fígado, músculo esquelético, pele, rins, cérebro, medula espinhal e placenta (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey e Lindsay, 1993; Wouda *et al.*, 1996).

O encontro de *N. caninum* nos linfonodos das capivaras aqui pesquisadas era esperado, pois esses órgãos concentram células do sistema fagocítico mononuclear, que tendem por sua vez a concentrar maior número de parasitos. O encontro de *N. caninum* no sangue de dois animais provavelmente é indicativo de quadro agudo de infecção ou de reagudização de uma infecção crônica. O diagnóstico de *N. caninum* no sangue ocorreu em duas capivaras fêmeas. Esse fato pode estar relacionado à possibilidade de transmissão transplacentária do parasito.

Foi observado durante o período de estudo a ocorrência de abortos em algumas capivaras do Parque Tingüi (Rogério R. Lange, comunicação pessoal). Se esses abortos estão relacionados ou não à infecção por *N. caninum* ainda é questão a ser investigada.

Grande atenção nas pesquisas tem sido direcionada na busca da identificação dos potenciais hospedeiros de *N. caninum*. Nessa linha de pesquisa muitos animais selvagens têm sido identificados como hospedeiros intermediários e definitivos do parasito (Rosypal e Lindsay, 2005; Gondim, 2006). Desde o relato da primeira ocorrência de *N. caninum* em animais selvagens, mais especificamente no cervo de rabo preto da Califórnia *Odocoileus hemionus columbianus* (Woods *et al.*, 1994), muitas novas questões e elucidações sobre o parasito começaram a ser levantadas.

A real rede de hospedeiros desse apicomplexa, a possibilidade de existência de um ciclo selvagem e urbano e as conseqüências dessas descobertas para a epidemiologia da neosporose em cães e bovinos tem sido motivo de questionamentos e pesquisas (Rosypal e Lindsay, 2005; Gondim, 2006).

Muitos estudos já identificaram infecção em canídeos (Lindsay *et al.*, 1996; Barber *et al.*, 1997; Buxton *et al.*, 1997; Cheadle *et al.*, 1999), e em herbívoros selvagens (Woods *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 1999; Ferroglio *et al.*, 2001). Ainda mais recente é a identificação de *N. caninum* em roedores selvagens. Até o momento, há apenas cinco relatos descrevendo a infecção por *N. caninum* em roedores (Huang *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2006, Jenkins *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2007; Barratt *et al.*, 2008). Recentemente, Yai *et al.* (2008), em estudo conduzido no Estado de São Paulo, relataram a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em 9,4% das capivaras pesquisadas.

A prevalência de infecção obtida nessa investigação pode ser explicada por algumas razões: **a)** vários tecidos foram analisados, o que aumenta a sensibilidade do diagnóstico; **b)** capivaras, cães e animais selvagens co-habitam o mesmo ambiente no Parque Tingüi, assim, é possível que ambos hospedeiros, definitivos e intermediários, mantenham o ciclo de vida de *N. caninum* nesse ambiente; **c)** casos de aborto têm ocorrido nas capivaras do Parque. É possível que a causa desses abortos seja a infecção por *N. caninum*. Caso a neosporose seja realmente a causa desses abortos é possível que ocorra a transmissão



vertical do parasito entre mãe e feto de capivara. Estudos da transmissão transplacentária de *N. caninum* têm demonstrado a infecção de mãe para feto em bovinos (Dubey *et al.*, 1992; Barr *et al.*, 1994a), ovinos (Dubey e Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996), caprinos (Lindsay *et al.*, 1995), camundongos (Cole *et al.*, 1995; Liddell *et al.*, 1999), cães (Cole *et al.*, 1995), gatos (Dubey e Lindsay, 1989), primatas (Barr *et al.*, 1994b) e suínos (Jensen *et al.*, 1998). Também seria possível a transmissão horizontal de *N. caninum* para cães, outros animais domésticos e animais selvagens pela ingestão de placenta, tecidos fetais e fetos de capivara infectados pelo parasito; **d)** a elevada densidade populacional de cães e capivaras no Parque Tingüi pode facilitar a dispersão do protozoário. As capivaras poderiam infectar-se pela ingestão de oocistos esporulados presentes na água e pastagem.

As capivaras podem ser importantes reservatórios do parasito na América do Sul, principalmente no Brasil, já que esses animais podem ser encontrados no ambiente urbano, rural e selvagem. Assim, poderiam atuar como elo de ligação dos ciclos urbano e selvático de *N. caninum*. No Brasil, em particular, a prática de desmatamento para fins de lavoura e pecuária aproxima as capivaras do ambiente rural e urbano. Nesse ambiente, a proximidade das capivaras a canídeos selvagens e cães pode resultar em implicações epidemiológicas na neosporose e transmissão horizontal de *N. caninum* nos rebanhos bovinos.

Outro fator que denota ainda mais a possível importância da capivara na epidemiologia da neosporose e no ciclo de *N. caninum* é a relação presa-predador que ocorre entre capivaras e canídeos. Cães e canídeos selvagens podem infectar-se pelo consumo de tecidos infectados com cistos viáveis e depois eliminar os oocistos nas fezes, que pode ser o estágio infectante para as capivaras.

Para confirmar a hipótese de esses animais serem hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* é necessário o encontro de bradizoítos ou taquizoítos viáveis nos tecidos desses animais (Dubey *et al.*, 2007). Portanto, para confirmar a possibilidade da capivara ser um hospedeiro intermediário de *N. caninum* será necessário demonstrar formas teciduais viáveis do parasito. Tal confirmação poderá ser realizada por bioensaios e isolamento do parasito.

No atual estudo foi demonstrada a primeira evidência da presença do protozoário nos tecidos da capivara, fato que nos permite inferir a possibilidade desse animal ser um hospedeiro intermediário natural de *N. caninum*. As complicações dessa confirmação na epidemiologia da neosporose e na manutenção do ciclo de *N. caninum* também terão de ser futuramente pesquisadas e elucidadas.

## 6. CONCLUSÕES

Foi comprovada a presença de DNA de *N. caninum* nos tecidos das capivaras residentes no Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Esse resultado é a primeira evidência parasitológica de infecção por *N. caninum* em capivaras.

A prevalência de infecção variou conforme a região alvo no DNA de *N. caninum*. Na análise da região Nc5 foi verificada a prevalência de infecção de 11,5% (3/26). Para a região ITS1 foram considerados positivos 19,2% das capivaras (5/26). A prevalência de infecção considerando positividade em ambos os testes foi de 7,7% (2/26). Já a prevalência considerando como positivos os animais que apresentaram produtos de amplificação para Nc5 ou ITS1 foi de 23% (6/26).

Foi encontrada ampla disseminação de *N. caninum* nos tecidos das capivaras, inclusive no sangue. Esse achado reforça a possibilidade da capivara ser um hospedeiro intermediário natural do esporozoário, além de representar uma potencial fonte de infecção para cães e canídeos selvagens.

## 7. PERSPECTIVAS

A capivara pode ser um hospedeiro intermediário de *N. caninum*. Estudos posteriores visando o isolamento do parasito, a caracterização da cepa isolada e testes de infectividade são necessários para confirmar a hipótese aventada no presente estudo.

A população de animais pesquisados apresenta problemas de aborto. É possível que *N. caninum* esteja envolvido na patogenia desses abortos. Assim, a transmissão vertical entre capivaras seria uma realidade. Para confirmar essa possibilidade é necessário pesquisa dos fetos abortados, fluidos e tecidos placentários na tentativa de identificar e isolar *N. caninum*.

Os roedores em geral podem ser “bons” hospedeiros intermediários de *N. caninum* e serem os principais responsáveis pela dispersão do parasito no ambiente selvagem e rural. A relação presa-predador entre canídeos e roedores é bem conhecida. Estudos com outros roedores sinantrópicos e selvagens serão importantes no esclarecimento da epidemiologia da neosporose e melhor entendimento do ciclo de vida de *N. caninum*.

Poucos são as pesquisas com canídeos selvagens no Estado do Paraná. O lobo-guará, por exemplo, pode ser um potencial hospedeiro definitivo de *N. caninum* e tem a sua base alimentar no consumo de pequenos roedores selvagens. Períodos de explosão populacional como o que ocorre com a “ratada”, principalmente no sul do Estado do Paraná, pode representar fase de dispersão ativa de *N. caninum* já que nesse período ocorre maior consumo de roedores pelos seus predadores. Conseqüentemente, pode haver uma maior eliminação de oocistos no ambiente.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A.. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.

BARBER, J.S.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.; REICHEL, M.P.; McMILLIAN, D.; TREES, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **J. Parasitol.**, v. 83, p. 1056-1058, 1997.

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 57-64, 1998.

BARLING, K.S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M.J.; THOMPSON, J.A.; MCNEILL, J.W.; CRAIG, T.M.; ADAMS, L.G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 217, p. 1361-1365, 2000.

BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; WOODS, L.W.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 365-367, 1992.

BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; BONDURANT, R.H.; ARDANS, A.A.; OLIVER, M.N.; CONRAD, P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, p. 207-215, 1994a.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDRICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Lab. Invest.**, v. 71, 236-242, 1994b.

BARRATT, J.; AL QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Mol. Cell. Probes**, v. 22, p. 228-233, 2008.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 612-618, 2001.

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. **Can. Vet. J.**, v. 41, p. 464-467, 2000.

BERGERON, N.; GIRARD, C.; PARÉ, J.; FECTEAU, G.; ROBINSON, J.; BAILLARGEON, P. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v. 13, p. 173-175, 2001a.

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; VILLENEUVE, A.; GIRARD, C.; PARÉ, J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, v. 97, p. 145-152, 2001b.

BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v. 70, p. 271-274, 1984.

BJERKAS, I.; DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Vet. Scand.**, v. 32, p. 407-410, 1991.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; PASTORET, P.P.; BROCHIER, B.; INNES, A.E. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 308-309, 1997.

CAPELLI, G.; NARDELLI, S.; REGALBONO, A.F.; SCALA, A.; PIETROBELLI, M. Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 123, p.143-148, 2004.

CHEADLE, M.A.; JENNIFER, M.S.; BLAGBURN, B.L. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. **J. Zoo. Wild. Med.**, v. 30, p. 248-251, 1999.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 730-732. 1995a.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1683-1689, 1999.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 192, p.1269-1285, 1988a.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **J. Parasitol.**, v. 84, p. 862-865, 1998c.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. **J. Parasitol.**, v. 75, p. 765-771, 1989a.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 230-233, 1990a.

DUBEY, J.P.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 197, p. 857-860, 1990b.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ANDERSON, M.L.; DAVIS, S.W.; SHEN, S.K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 201, p. 709-713, 1992.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 452-458, 1993

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v. 67, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 214, p. 1160-1163, 1999a.

DUBEY, J.P.; HOLLIS, K.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.H.; HUNGERFORD, L.; ANCHOR, C.; ETTER, D. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1709-1711, 1999b.

DUBEY, J.P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEER, C.A.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 345-353, 2001.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 42-56, 2003.

DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; JENKINS, M.C.; LINDSAY, D.S.; GREENE, C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 1157-1167, 2004.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinic. Microbiol. Reviews.**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

EZIO, F.; ANNA, T. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). **Vet. Parasitol.**, v. 115, p. 75-78, 2003.

FERROGLIO, E.; BASSANO, B.; TRISCIUOGLIO, A.; ROSSI, L. Antibodies to *Neospora caninum* in the *Alpin ibex* from the Italian Alps. **Z. Jagdwiss.**, v. 47, p. 226-228, 2001.

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Vet. Parasitol.**, v. 148, p. 346-349, 2007.



FIORETT, D.P.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETTI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORI, G.A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. **J. Vet. Med.**, v. 47, p. 47-53, 2000.

FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C.; TREES, A.J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1691-1704, 1999.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet. Parasitol.**, v. 101, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 159-161, 2004a.

GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004b.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitol.**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1175-1188, 1999a.

HEMPHILL, A. The host±parasite relationship in neosporosis. **Adv. Parasitol.**, v. 43, p.47-104, 1999b.

HOLMDAHL, O.J.; MATTSSON, J.G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer. **Parasitolol.**, v. 112, p. 177-182, 1996.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; KNAPEN, F.V. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 285-289, 1997.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABLE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Vet. Res.**, v. 35, p. 283-290, 2004.

HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitol.**, v. 132, p. 29-36, 2006.

JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 161-165, 2007.

JENSEN, L.; JENSEN, T.K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S.A.; UGGLA, A.; BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v. 106, p. 475-482, 1998.

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

LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by PCR detection. **J. Parasitol.**, in press, 1999.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The J. Parasitol.**, v. 76, p. 410-413, 1990.

LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; POWE, T.A.; SARTIN, E.A.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 1176-1180, 1995b.

LINDSAY, D.S.; KELLY, J.E.; McKOWN, R.; STEIN, F.J.; HERMAN, J.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 657-659, 1996a.

LINDSAY, D.S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R.R.; SEMRAD, S.D.; KONKLE, D.M.; MILLER, P.E.; BLAGBURN, D.L. Central nervous system neosporosis in a foal. **J. Vet. Diag. Investig.**, v. 8, p. 507-510, 1996b.

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

LINDSAY, D.S. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. **Equine Vet. J.**, v. 33, n. 2, p. 116-118, 2001.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SEGUNDO, G.R.S.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil. Curitiba, 2002. Tese (Doutorado em Processos biotecnológicos) - Curso de Pós-graduação em Processos biotecnológicos Setor de Tecnologia Universidade Federal do Paraná.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Vet. Rec.**, v. 153, p. 366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 135, p. 215-221, 2006.

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

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J. Parasitol.** v. 84, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M.M.; MCGUIRE, A.M.; JOLLEY, W.R.; LINDSAY, D.S.; TREES, A.J.; STOBART, R.H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Vet. Parasitol.**, v. 33, p. 647-655, 1996b.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

MCALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.

MODRY, D.; VÁCLAVEK, P.; KOUDELA, B.; SLAPETA, J.R. Placentofagia - an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? **Trends in Parasitol.**, v. 17, n. 12, p. 513, 2001.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitol. Res.**, v. 100, p. 633-636, 2007.

PENA, H.F.; SOARES, R.M.; RAGOZO, A.M.; MONTEIRO, R.M.; YAI, L.E.; NISHI, S.M.; GENNARI, S.M. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 61-66, 2007.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1144-1148, 2001.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; DUBEY, J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 124, p. 139-150, 2004.

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitol.**, v. 21, n. 10, October, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, third edition, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHARS, G.; RAUSER, M.; ZIMMER, K.; PETERS, M.; WURM, R.; DUBEY, J.P.; DE GRAAF, D.C.; EDELHOFER, R.; MERTENS, C.; HESS, G.; CONRATHS, F.J. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. **J. Parasitol.**, in press., 1999.

SCHARS, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **Int. J. Parasitol.**, v. 15, p. 1525-1537, 2005.

SLAPETA, J.R.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRY, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: Differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Vet. J.**, v. 163, p. 147-154, 2002.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; McAllister, M.M.; BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1509-1519, 1999.

TENTER, A.J.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D.J.L.; WOUDA, W. A European perspective on *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 877-924, 2000.

THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of a dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v. 1, p. 205-209, 1989.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M.; McAllister, M.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, p. 765-767, 1999.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Neosporosis in the United Kingdom. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 891-893, 2000.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; JAKUBEK, E.B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1467-1472, 1998.

VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Vet. Parasitol.**, v. 129, p. 253-257, 2005.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **In PCR protocols, a guide for methods and applications**, Academic Press, p. 315-322, 1990.

WOODS, L.W.; ANDERSON, M.L.; SWIFT, P.K.; SVERLOW, K.W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, p. 508-510, 1994.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1677-1682, 1999.

YAI L.E.; RAGOZO, A.M.; CAÑÓN-FRANCO, W.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Occurrence of *Neospora caninum* Antibodies in Capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) From São Paulo State, Brazil. **J Parasitol.**, v. 94, n. 3, p 766, 2008.

YAMAGE, M.; FLECHNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J. Parasitol.**, v. 82, p. 272-279, 1996.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### **PROTÓCOLO: Técnica de extração de DNA de tecidos pelo “ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Mini-Tissue Kit”.**

#### **1. Preparo da amostras**

- preparar o banho-maria a 55°C.
- adicionar 1 mL de Tampão de lise (L13) à amostra de tecido previamente homogeneizada.
- adicionar 20 µL de proteinase K e homogeneizar.
- incubar a 55°C por 3 horas ou até completa digestão do tecido.
- remover do banho-maria e se necessário centrifugar.
- adicionar 10 µL de RNase A e homogeneizar por inversão do microtubo.
- incubar a 37°C durante 2 minutos.

#### **2. Purificação do DNA**

- homogeneizar as “esferas magnéticas” no agitador de tubos para completa ressuspensão.
- adicionar 120 µL de “esferas magnéticas” e pipetar gentilmente 5 vezes para homogeneização.
- adicionar 100 µL de Tampão de purificação (N5).
- pipetar gentilmente 10 vezes para homogeneização.
- colocar os microtubos na estante magnética (MagnaRack<sup>TM</sup>). Manter por 2 minutos.
- remover o sobrenadante cuidadosamente e descartar.
- remover os microtubos da estante magnética.
- adicionar 1 mL de Tampão de Lavagem (W11) e pipetar gentilmente duas vezes para ressuspensão das “esferas magnéticas”.
- colocar os microtubos na estante magnética (MagnaRack<sup>TM</sup>). Manter por 1 minuto ou até completa atração das “esferas magnéticas”.
- remover o sobrenadante cuidadosamente e descartar.
- repetir os últimos 3 passos mais uma vez.



### **3. Eluição do DNA**

- remover os microtubos da estante magnética.
- adicionar 250  $\mu$ L de Tampão de Eluição (E5).
- pipetar gentilmente duas vezes para ressuspensão das “esferas magnéticas”.
- incubar a 55°C durante 5 minutos.
- colocar os microtubos na estante magnética (MagnaRack™). Manter por 2 minutos.
- remover e armazenar o sobrenadante contendo DNA purificado.

**ANEXO 2****PROTÓCOLO: Técnica de extração de DNA de sangue pelo ““illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit””**

- adicionar a cada amostra 20 µL de proteinase K e homogeneizar.
- adicionar 400 µL de Tampão de lise.
- homogeneizar em agitador de tubos por 15 segundos.
- adicionar 6 µL de RNase e homogeneizar.
- incubar a 37°C durante 10 minutos.
- realizar rápida centrifugação (11.000 X g durante 10 segundos).
- acoplar os microtubos contendo a membrana de sílica.
- transferir a amostra para o microtubo de membrana.
- centrifugar a 11.000 X g durante 1 minuto.
- adicionar 500 µL de tampão de lise.
- centrifugar a 11.000 X g durante 1 minuto.
- adicionar 500 µL de tampão de lavagem.
- centrifugar a 11.000 X g durante 3 minutos.
- adicionar 200 µL de tampão de eluição previamente aquecido a 70°C.
- incubar a 37°C durante 1 minuto e, a seguir, centrifugar a 11.000 X g durante 1 minuto.
- remover e armazenar o DNA eluído.

## ANEXO 3

### **PROTÓCOLO: Técnica de extração de DNA de tecido pelo método de fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook e Russel (2001).**

#### **1. Lise celular e eliminação do RNA**

- adicionar à amostra homogeneizada 450 µL de tampão Tris-EDTA (100mM Tris HCl pH 8,0; 0,1M EDTA pH 8,0).
- adicionar 50 µL de SDS 20% e 10 µL de proteinase K (20mg/mL).
- homogeneizar em agitador de tubos.
- incubar em banho-maria a 55°C durante 14 horas, sob agitação periódica ("overnight").
- no dia seguinte, desnaturar a proteinase K: incubação a 95°C durante 10 minutos.
- resfriar as amostras e adicionar de 8 µL de RNase (20mg/mL).
- incubar em banho-maria a 37°C durante 2 horas.

#### **1. Fase de desproteinização**

- adicionar volume/volume de solução de fenol.
- homogeneizar em orbital durante 15 minutos.
- centrifugar a 12.000 X g durante 5 minutos, em temperatura ambiente.
- remover o máximo possível de sobrenadante e transferir para outro microtubo.
- repetir os 4 passos anteriores mais uma vez.
- adicionar 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1),
- homogeneizar em orbital durante 10 minutos.
- centrifugar a 12.000 X g durante 5 minutos, em temperatura ambiente.
- remover o máximo possível de sobrenadante e transferir para outro microtubo.
- repetir os 4 passos anteriores mais uma vez.
- adicionar 500 µL de clorofórmio.
- homogeneizar lentamente em orbital durante 10 minutos.
- centrifugar a 12.000 X g durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

- remover o máximo possível de sobrenadante e transferir para outro microtubo.

## **2. Fase de precipitação do DNA**

- adicionar 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado.
- homogeneizar gentilmente por inversão.
- adicionar 30  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio a 3M.
- homogeneizar gentilmente por inversão.
- manter a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 14 horas ("overnight").
- na manhã seguinte, centrifugar a 12.000 X g durante 30 minutos, à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .
- descartar o sobrenadante por inversão do tubo.
- adicionar 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70 $^{\circ}\text{GL}$ .
- centrifugar a 12.000 X g durante 15 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ .
- descartar o sobrenadante.
- repetir os últimos 3 passos mais uma vez.
- inverter o tubo e deixar secar à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .
- após secagem ressuspender o DNA em 125  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.
- manter em temperatura ambiente por 2 horas e após *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- armazenar as amostras a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

## ANEXO 4

**Tabela 3** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA de *Neospora caninum* em reações com os pares de iniciadores Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np4.

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	36,55 µL
Tampão	10 X	1 X	6,0 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,8 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	2,4 µL
Iniciador senso	80 pmol/ µL	96 pmol	1,2 µL
Iniciador antisenso	80 pmol/ µL	96 pmol	1,2 µL
Triton-100X	10%	0,1%	0,6 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25 µL
DNA	8 ng/µL	80 a 100 ng	10 µL
Total	----	----	60 µL

## ANEXO 5

**Tabela 4** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de DNA da região ITS1 de *Neospora caninum*.

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	30,15 µL
Tampão	10 X	1 X	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	2,0 µL
ITS5	100 pmol/ µL	30 pmol	0,3 µL
ITS2	100 pmol/ µL	30 pmol	0,3 µL
Triton-100X	10%	0,1%	0,5 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25 µL
DNA	8 ng/µL	80 a 100 ng	10 µL
Total	----	----	50 µL

## ANEXO 6

### PROTÓCOLO: Técnica da reação de seqüenciamento de ITS1.

#### 1. Purificação de produtos de PCR com PEG

- adicionar volume/volume de PEG à solução de PCR.
- homogeneizar e transferir a mistura a um microtubo de 500 µL.
- incubar a 37°C durante 30 minutos.
- centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos (a orientação dos microtubos deve ser a mesma na centrífuga).
- descartar o sobrenadante com pipeta de 100 µL.
- adicionar 125 µL de etanol 80% gelado.
- esperar 1 minuto e centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos.
- descartar o sobrenadante por inversão do microtubo.
- adicionar, gentilmente, pela parede do microtubo, 125 µL de etanol 96% gelado e retirar logo em seguida.
- descartar todo o sobrenadante por inversão do microtubo.
- evaporar o excesso de etanol 96% na estufa a 70°C por 10 minutos.
- ressuspender em 15 µL de água ultrapura e homogeneizar diversas vezes com a pipeta.
- manter em incubação à temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

#### 2. Reação de seqüenciamento

- adicionar a um microtubo água ultrapura para completar 10 µL.
- adicionar 20 ng do produto de PCR purificado
- adicionar 0,5 µL de tampão 5 X para reação de seqüenciamento.
- adicionar 0,5 µL de um dos iniciadores para cada reação (2pmol)
- adicionar 0,5 µL de "Big Dye 3.1".
- incubar no termociclador: 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos e 60°C durante 4 minutos. Seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

### 3. Precipitação e seqüenciamento

- adicionar no tubo de PCR 40  $\mu$ L de isopropanol 75%.
- após adicionar o isopropanol, passar para o microtubo de 500  $\mu$ L e homogeneizar com pipetagem.
- rápida centrifugação ou “spin down” e manutenção em temperatura ambiente durante 20 minutos.
- centrifugar a 13000 rpm durante 25 minutos a 4°C.
- descartar o sobrenadante por inversão do microtubo.
- adicionar 200  $\mu$ L de etanol 70% não gelado.
- fazer “spin down” e centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
- remover todo o excesso de etanol foi com pipeta.
- secar as amostras em “speed vac” a 60°C durante 45 minutos.
- ressuspender em 10 a 20  $\mu$ L de formamida “Hi-Di”
- injetar no seqüenciador e desnaturar no termociclador por 2 minutos a 95°C.

**CAPÍTULO IV:**  
**A CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS,  
1766) COMO POTENCIAL HOSPEDEIRO  
INTERMEDIÁRIO DE *Toxoplasma gondii* NICOLLE e  
MANCEAUX, 1908**



## Resumo

A toxoplasmose é uma zoonose muito freqüente em todo o mundo. É causada pelo apicomplexa *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908), o qual apresenta um amplo espectro de hospedeiros e possui distribuição geográfica mundial. É considerada uma das mais importantes zoonoses transmitidas pelo alimento. Vem sendo discutido como um risco emergente na ocorrência de surtos de toxoplasmose o consumo de carne de animais selvagens, principalmente aqueles provenientes da caça. Os objetivos do presente estudo foram identificar a infecção por *T. gondii* em capivaras de Curitiba, Estado do Paraná, e determinar a prevalência de infecção nesses animais. Para tanto, foi realizada a pesquisa da ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* no soro de 26 capivaras, pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI  $\geq$  1:16). Também foi analisada a presença de DNA do parasito nos tecidos dos animais (sangue, fígado, coração, linfonodos e baço), pela PCR de fragmentos do gene B1 e região ITS1. Foi verificada ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em 61,5% das capivaras analisadas. A maior titulação foi de 1:512. Amostras de sangue, fígado e coração foram positivas na PCR para gene B1 e região ITS1. Para o gene B1 foi identificado DNA de *T. gondii* em 7,7% dos animais, na pesquisa de ITS1 foi verificada prevalência de infecção de 11,5%. Considerando a pesquisa das duas regiões foi obtida a prevalência de 15,4% de infecção por *T. gondii*. Os resultados indicam elevada prevalência de infecção por *T. gondii* em capivaras, que são aparentemente assintomáticas para a doença. Assim, o consumo de carne de capivara mal cozida pode também representar uma fonte de infecção para o homem, e deve ser considerado um comportamento de risco em inquéritos epidemiológicos na ocorrência de casos de toxoplasmose.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxoplasma gondii*, capivaras, *Hydrochaeris hydrochaeris*, toxoplasmose, epidemiologia, zoonose.

### Abstract

Toxoplasmosis is one of the more common parasitic diseases world-wide. Its causative agent, the apicomplexan *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908), is a ubiquitous protozoan parasite and is able to infect all warm-blooded animals. Toxoplasmosis is actually considered one of the more important foodborne diseases in the world. An emerging risk in acquiring infection by *T. gondii* is the increasing popularity of wild animals and game meat. Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) is the largest rodent in the world and is used for human consumption in many areas of South America. In the present study we identify infection by *T. gondii* in capybaras from Curitiba, Parana State, Southern Brazil and determinate the prevalence infection in these animals. In this reason, antibodies to *T. gondii* were assayed in the sera of 26 capybaras, using the indirect fluorescent antibody test (IFAT  $\geq$  1:16). Blood, liver, heart, lymph nodes, and spleen tissues collected from the above mentioned animals were tested by PCR. The targets of the PCR were the B1 gene and ITS1 region. Sixteen (61.5%) of the 26 capybaras tested were seropositive to *T. gondii*. Titers of specific antibodies to *T. gondii* ranged from 1:16 to 1:512. Of the 26 feral rodents studied, two (7.7%) tested PCR-positive for B1 gene assay, and four (11.5%) were positive for ITS1 PCR assay. Four capybaras (15.4%) were positive in both assays. Liver, heart and blood were the tissues tested positive for the apicomplexan. Our findings shows high rate of infection by *T. gondii* in asymptomatic capybaras. Based is this data we hypothesize that the consumption of undercooked capybara meat could represent a source for infection for humans.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, capybaras, *Hydrochaeris hydrochaeris*, toxoplasmosis, epidemiology, zoonosis.

## 1. INTRODUÇÃO

No ano de 2008, o apicomplexa *Toxoplasma gondii* completou 100 anos de sua descoberta. Esse protozoário foi inicialmente descrito por Splendore (1908) em tecidos de coelho no Brasil e por Nicolle e Manceaux (1908) em tecidos de um roedor no Instituto Pasteur da Tunísia. Contudo, foram Nicolle e Manceaux que nomearam a nova espécie como *Toxoplasma gondii*. Uma referência a forma dos taquizoítos (do grego: *toxon* = arco; *plasma* = forma) e ao hospedeiro no qual foi encontrado, o roedor *Ctenodactylus gundi* (Kim e Weiss, 2008). A descoberta de *T. gondii*, quase que simultânea, em duas espécies animais tão diferentes, em localidades geográficas muito distantes, e climaticamente dissimilares, antevia o amplo espectro de hospedeiros e a ampla disseminação geográfica desse novo parasito (Pedrassani, 2001).

O protozoário *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae e Subfamília Toxoplasmatinae. Sendo *T. gondii* a única espécie do gênero *Toxoplasma*. Esse parasito apresenta ampla gama de hospedeiros e distribuição cosmopolita.

Os hospedeiros definitivos são os felídeos. Nesses animais o parasito infecta células epiteliais intestinais e realiza sua reprodução sexuada, liberando milhares de oocistos não esporulados no ambiente. Os hospedeiros intermediários são praticamente todos dos animais homeotérmicos, como aves, mamíferos, inclusive o homem. A toxoplasmose é uma das zoonoses mais importantes de todo o mundo. Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada por *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000; Kim e Weiss, 2008).

No homem e em animais de produção a toxoplasmose é uma doença primariamente associada a abortos e infecção congênita, que pode determinar retardo mental e cegueira (Holland, 2003; Stanford *et al.*, 2006). A doença também tem sido muito associada à infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos, principalmente HIV positivos ou transplantados, nos quais costumam causar encefalites e infecções sistêmicas que podem levar à morte (Ammassari *et al.*, 1996; Tenter *et al.*, 2000).

São três as formas parasitárias infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos contidos no interior dos cistos teciduais e os oocistos esporulados que contém os esporozoítos (Hill *et al.*, 2005). Todos esses três estágios são infectantes tanto para os hospedeiros definitivos quanto para os hospedeiros intermediários.

A transmissão horizontal pode ocorrer: (a) pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados; (b) pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos nos tecidos dos hospedeiros intermediários; (c) transplante de órgãos ou de medula óssea infectados com taquizoítos ou cistos teciduais em indivíduos imunossuprimidos. Já a transmissão vertical ocorre pela transmissão transplacentária de taquizoítos do parasito. Também é relatada a transmissão de taquizoítos aos neonatos pela ingestão de leite (via lactogênica) logo após o nascimento (Dubey, 1993). Dessa forma, *T. gondii* pode ser transmitido de hospedeiros intermediários para hospedeiros definitivos, de hospedeiros definitivos para hospedeiros intermediários, bem como entre hospedeiros intermediários e hospedeiros definitivos (Tenter *et al.*, 2000). Por essa ampla capacidade de adaptação *T. gondii* apresenta elevado potencial de dispersão e de infecção (Sibley, 2003).

Ainda não se sabe ao certo qual a real contribuição de cada uma dessas vias de transmissão na infecção do homem e no desenvolvimento da doença (Sibley, 2003). Nem todas as vias de transmissão são epidemiologicamente importantes, e as fontes de infecção podem variar bastante conforme os hábitos, cultura e religião de cada povo e a localização geográfica em que se encontram (Tenter *et al.*, 2000). O consumo de carne de animais de caça, por exemplo, tem sido relatada em surtos epidêmicos de toxoplasmose no mundo inteiro (Dubey e Jones, 2008; Kijlstra e Jongert, 2008a). Na Austrália foi relatado um surto de toxoplasmose após o consumo de carne de canguru (Robson *et al.*, 1995).

Apesar de ser transmitido via transplacentária, assume-se que as principais vias de dispersão do parasito, e manutenção da infecção, são a ingestão de oocistos esporulados em água e alimentos contaminados e a ingestão de carne crua ou mal cozida infectada com cistos teciduais (Tenter *et al.*, 2000; Kijlstra e Jongert, 2008a).

Alguns surtos epidêmicos da doença têm sido relatados após ingestão de oocistos esporulados em água contaminada (Bowie *et al.*, 1997 Bahia-Oliveira *et*

*al.*, 2003; Dubey, 2004). Também é associado como fator de risco, para a ingestão de oocistos e infecção por *T. gondii*, as atividades relacionadas à jardinagem ou trabalho próximo ao solo (Cook *et al.*, 2000). Entretanto, a contaminação do ambiente com oocistos costuma ser mais restrita aos locais onde os gatos defecam (Afonso *et al.*, 2008), e nem todos os gatos eliminam oocistos nas fezes (Dabritz *et al.*, 2007; Schares *et al.*, 2008)

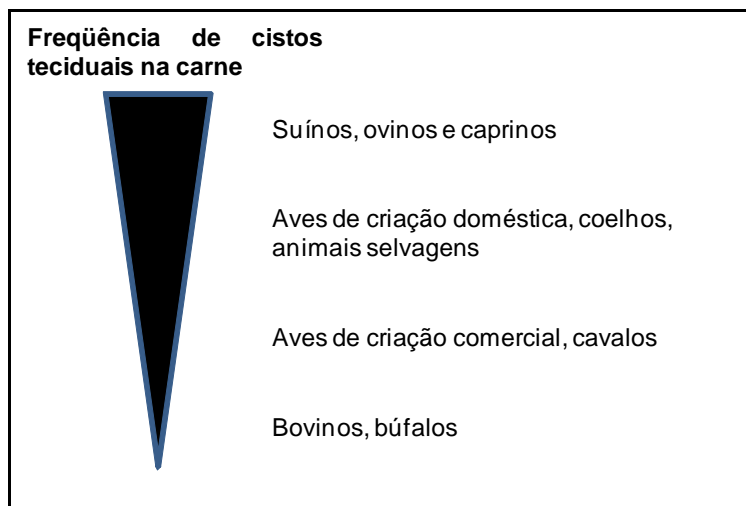
Por tais razões, acredita-se que a principal fonte de infecção pós-natal de *T. gondii* seja a ingestão de carne crua ou mal cozida (Kapperud *et al.*, 1996; Baril *et al.*, 1999; Kijlstra e Jongert, 2008a). Casos de toxoplasmose aguda, após a ingestão de carne crua ou mal cozida, têm sido relatados em vários países (Ross *et al.*, 2001; Carne *et al.*, 2002; Lake *et al.*, 2002). Também é verificado que em países nos quais se adotam sistemas de produção modernos e controlados, e nos quais os consumidores costumam comprar carne congelada, ocorre um declínio da soroprevalência para *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000; Kortbeek *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007).

Outro fator que reafirma a idéia de que a ingestão de tecidos, contendo cistos teciduais, seja a principal forma de infecção no homem, consiste no fato que essa via de transmissão é possível pela ingestão de carne de qualquer mamífero ou ave (Kijlstra e Jongert, 2008b). Fato talvez corroborado pela evidência de que vegetarianos estritos representam um grupo de menor risco à toxoplasmose e demonstram menor soroprevalência para *T. gondii* (Roghmann *et al.*, 1999).

Os animais assinalados como principais transmissores de *T. gondii* ao homem pela ingestão de carne são os suínos, ovinos e caprinos. Logo em seguida estão incriminadas as aves de criação doméstica, coelhos e animais de vida selvagem (Figura 1). Com menor risco de infecção se apresentam as carnes de eqüídeos e aves de criação comercial, já a ingestão de carne de búfalos e bovinos representa risco bem menor de infecção ao homem (Tenter *et al.*, 2000; Kijlstra e Jongert, 2008b).

Dentre esses hospedeiros intermediários, os animais selvagens estão continuamente recebendo maior importância na possibilidade de infecção de *T. gondii* ao homem (EFSA, 2007, Kijlstra e Jongert, 2008b). O risco emergente de infecção pela ingestão da carne desses animais está diretamente relacionado às

atividades de caça e à popularização da carne de animais selvagens (Kijlstra e Jongert, 2008a).



**Figura 1** - Potencial de transmissão de *T. gondii* ao homem pelo consumo de carnes de animais de produção e caça. Adaptado de Tenter *et al.* (2000).

Estudos epidemiológicos têm relatado a possibilidade de surtos epidêmicos de toxoplasmose após a ingestão de carne de animais de caça (Robson *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 2000, Dubey e Jones, 2008). Souza *et al.* (2006) em estudo conduzido no Parque Nacional de Emas, Estado de Goiás, verificaram soroprevalência para *T. gondii* em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), raposas-do-campo (*Pseudolopex vetulus*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), onças-pintadas (*Panthera onca*), suçuaranas (*Puma concolor*), queixadas (*Tayassu pecari*) e catetos (*Tayassu tajacu*). Vários estudos também relatam soroprevalência positiva para *T. gondii* em roedores selvagens e sinantrópicos (Morsy *et al.*, 1994; Smith e Frenkel, 1995; Marshall *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2006).

Em capivaras ainda são escassos os relatos de infecção por *T. gondii* descritos na literatura. Na região Sul do Brasil ainda não há nenhum relato de infecção pelo parasito. Visto o crescente destaque da capivara no cenário nacional, seja pela caça indiscriminada, seja pelo crescimento descontrolado dessa população ou pela adaptação desse animal nos sistemas de produção de carne, couro e óleo, é de considerável importância determinar o conjunto de patógenos que podem ser transmitidos pelo consumo de sua carne.

Assim, foi objetivo do presente estudo a investigação da presença e prevalência de infecção por *T. gondii* nas capivaras residentes no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os dados referentes à área geográfica e à população de estudo estão descritos no Capítulo III, item 3.1.

### 2.2. AMOSTRAGEM

#### 2.2.1. Contenção química

A metodologia utilizada para a contenção das capivaras foi anteriormente descrita no Capítulo III, item 3.2.

#### 2.2.2. Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada conforme descrito no Capítulo III, item 3.4, subitens 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3.

### 2.3. ANÁLISE SOROLÓGICA

As amostras de sangue em tubo sem anticoagulante foram centrifugadas (2.500 X g durante 5 minutos) e o soros separados e armazenados a -20°C. Os soros foram utilizados para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Para detecção desses anticorpos foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta.

O antígeno particulado (taquizoíto) utilizado foi produzido a partir de cepa RH padrão de *T. gondii*, que foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, PR. A manutenção dessa cepa foi realizada tanto *in vivo* quanto *in vitro* pelo mestrando Guilherme Garcia, do Laboratório de Parasitologia Molecular, UFPR. Os taquizoítos utilizados na reação de IFI foram produzidos por cultivo *in vivo*. Para tanto, foram realizadas sucessivas inoculações intraperitoneais em camundongos fêmeas “Swiss webster” (*Mus musculus*) de cerca de 40 dias de idade. Os taquizoítos obtidos foram purificados e concentrados.

Posteriormente, foi realizada a contagem de taquizoítos íntegros em câmara de Thoma. Após a contagem os parasitos foram diluídos em PBS estéril e formalina 2% para a obtenção de uma concentração padrão de taquizoítos a serem utilizados na reação. Em cada campo de reação da lâmina de imunofluorescência foram utilizados aproximadamente 500 taquizoítos íntegros.

A primeira etapa da reação de IFI consiste na fixação do antígeno nas lâminas. Para tanto, foram depositados em cada área de reação 20 µL de solução de antígeno. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente 10 minutos para permitir a sedimentação dos taquizoítos. Então foram incubadas em estufa a 37°C, a seco, durante uma hora à uma hora e meia.

Após a fixação do antígeno, foi adicionado a cada área de reação o soro correspondente de cada capivara. Foram utilizadas diluições a partir de 1:16, com um fator 2 de diluição (1:32; 1:64, 1:128 e assim por diante). Em cada área de reação foi adicionado um volume de soro de 20 µL. Então, as lâminas foram mantidas em incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. Nesse intervalo de tempo é esperado que as imunoglobulinas tipo G anti-*T. gondii*, presentes no soro dos animais positivos, liguem aos antígenos de superfície de membrana do taquizoíto.

Decorrido o período de incubação as lâminas foram lavadas por imersão em Tampão PBS pH 7,2 em dois tempos de 10 minutos. Após a segunda lavagem o excesso foi removido com água destilada. Foi permitida a secagem das lâminas em estufa 37°C num tempo aproximado de 10 minutos. Então, foi adicionado a cada área de reação da lâmina 20 µL de conjugado anti-capivara IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína.

O conjugado anti-capivara IgG foi adquirido da Secretária Municipal de Saúde do Estado de São Paulo. Para uso na reação de IFI, o conjugado foi diluído 200 vezes em PBS contendo 4% de Azul de Evans. Após adição do conjugado nas áreas de reação as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. Nesse tempo é esperado que as imunoglobulinas anti-IgG de capivara liguem àqueles anticorpos que estão fixados nos antígenos de membrana dos taquizoítos. Permitindo, assim, identificar os soros das capivaras que apresentam anticorpos anti-*T. gondii*.

Após a incubação as lâminas foram novamente lavadas por imersão em Tampão PBS pH 7,2 em dois tempos de 10 minutos. O excesso foi



posteriormente removido com água destilada e as lâminas foram secadas em estufa a 37°C. Então, as lâminas foram montadas com glicerina 90% e lamínulas e visualizadas em microscópio de luz ultravioleta no aumento de 400 vezes.

Foram consideradas positivas as reações que apresentavam fluorescência em toda a superfície do taquizoíta de *T. gondii*. A maior diluição do soro em que essa reação ainda se mostrava presente determinava o título de reação de cada amostra. Em cada lâmina foram acrescentados soros controles positivos e negativos, para serem usados como controle da reação e da leitura da lâmina.

## 2.4. ANÁLISE MOLECULAR

### 2.4.1. Extração do DNA

As amostras de DNA utilizadas nesse estudo foram obtidas pela aplicação de três diferentes técnicas de extração, conforme previamente descrito no Capítulo III, item 3.5.1, subitens 3.5.1.1, 3.5.1.2 e 3.5.1.3.

### 2.4.2. Reação em cadeia da polimerase

As amostras de DNA de sangue, fígado, baço, linfonodos e coração foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase objetivando o diagnóstico molecular de *T. gondii*. Para tanto, foram utilizados iniciadores que determinam a amplificação do gene B1 e região ITS1 do parasito.

#### 2.4.2.1. Gene B1

Para obtenção da amplificação de segmentos do gene B1, específico de *T. gondii*, foram utilizados os iniciadores T1 e T2 descritos por Pujol-Riqué *et al.* (1999). Na Tabela 1 estão descritas as características básicas desse par de iniciadores.

**Tabela 1** - Características dos iniciadores utilizados na detecção do gene B1 de *Toxoplasma gondii* no sangue, fígado, coração, baço e linfonodos de capivaras.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência nucleotídica (5'-3')	Direção	Posição*
T1	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	Senso	699-714
T2	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Antisenso	831-853

- Relativa à seqüência nucleotídica do DNA de *N. caninum* onde ocorre a hibridização de cada iniciador.

O volume final de cada solução de amplificação, tanto para a reação primária quanto para a reação secundária, foi de 50 µL. Cada solução continha 5,0 µL de tampão DNA polimerase 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,1% de Triton-100X, 25 pmol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 80 a 100 ng de DNA da amostra. Água ultrapura foi adicionada na quantidade suficiente para completar o volume final da reação (Anexo 1).

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *T. gondii* de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 58°C por 1 minuto para a hibridização e 2 minutos e 30 segundos a 74°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

#### 2.4.2.2. Região ITS1

Em comparação a outros organismos, a região ITS1 de *T. gondii* mostra alto grau de conservação, demonstrando pouca variabilidade entre cepas do parasito. Homan *et al.* (1997) ao compararem as seqüências de ITS1 de 20 isolados de *T. gondii* identificaram 100% de similaridade entre todas as linhagens. Comparado à região ITS1 de *N. caninum* ocorre uma divergência de

22% dos nucleotídeos, o que providencia um bom marcador molecular na distinção entre *T. gondii* e *N. caninum* (Homan *et al.*, 1997; Gondim *et al.*, 2004).

Para obtenção da amplificação de DNA da região ITS1 de *T. gondii* foram utilizados os iniciadores ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' descritos por White *et al.* (1990). Para a realização da PCR foi utilizado protocolo demonstrado por Gondim *et al.* (2004) com algumas adaptações.

O volume final de cada reação de amplificação foi de 50 µL. Cada solução continha 5,0 µL de tampão DNA polimerase 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,1% de Triton-100X, 30 pmol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 80 a 100 ng de DNA da amostra. Água ultrapura foi adicionada na quantidade suficiente para completar o volume final da reação. Em cada reação foi inclusa amostra contendo DNA de *T. gondii* e amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

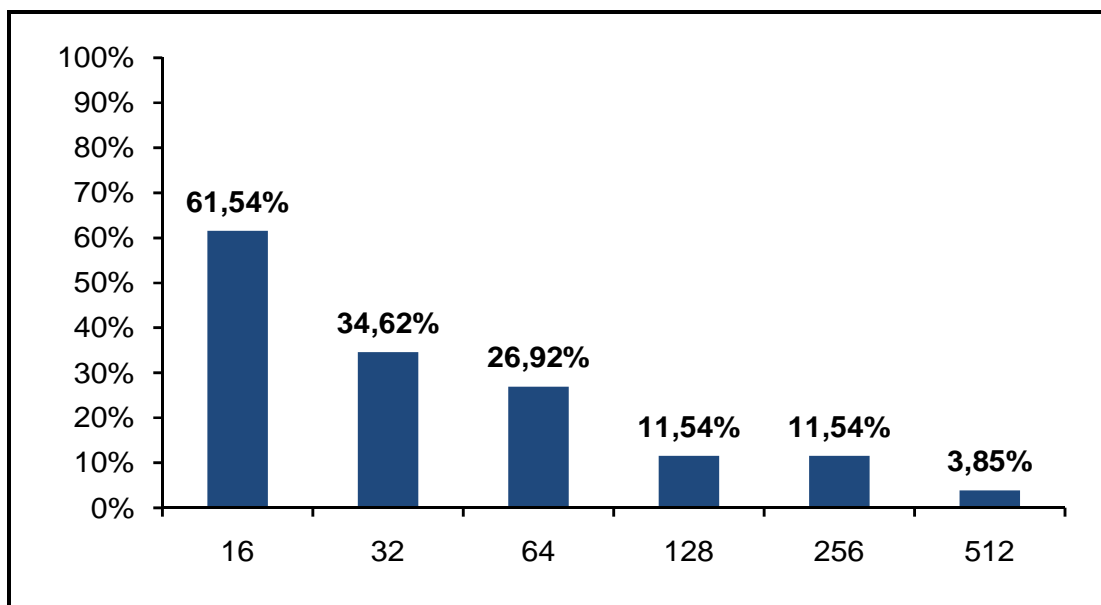
O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 20 segundos para desnaturação, 57°C durante 45 segundos para a hibridização e 74°C por 45 segundos para a extensão do DNA. Na última etapa foi programado um ciclo de 2 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

### 3. RESULTADOS

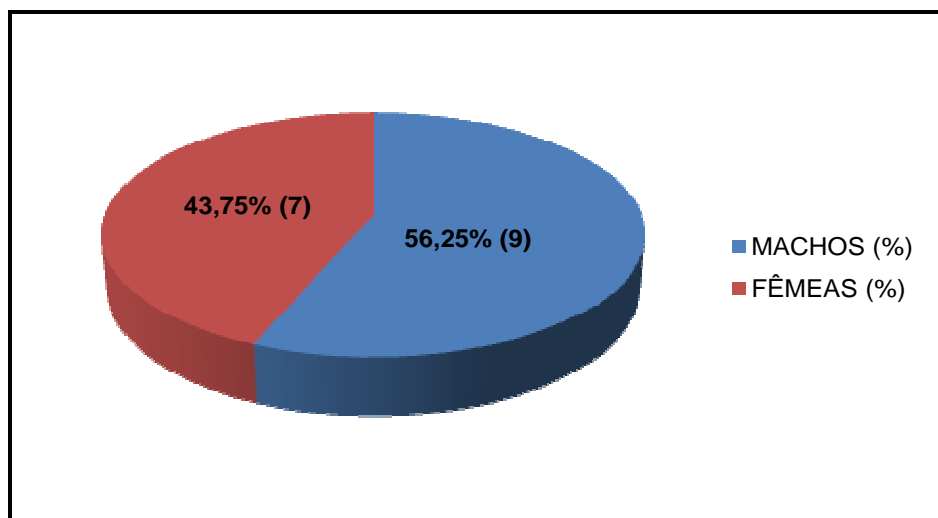
#### 3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Pela técnica de imunofluorescência indireta foi detectada a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, com título  $\geq 16$ , em 61,5% das capivaras analisadas (16/26). Desse total, 56,25% (9/16) são machos e 43,75% (7/16) são fêmeas (Figura 3). Acima da titulação 32 foi detectada a prevalência de 34,6% animais infectados (9/26), sendo desse total 4 machos e 5 fêmeas.

Considerando a titulação, sete capivaras apresentaram título 64, três apresentaram título 128 e 256 e uma capivara apresentou titulação de 512 (Figura 2).



**Figura 2** - Percentual de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, PR, reagentes na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela técnica de imunofluorescência indireta e titulação correspondente.



**Figura 3** - Percentual de capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, PR, reagentes na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela técnica de imunofluorescência indireta de acordo com o sexo (titulação  $\geq$  16).

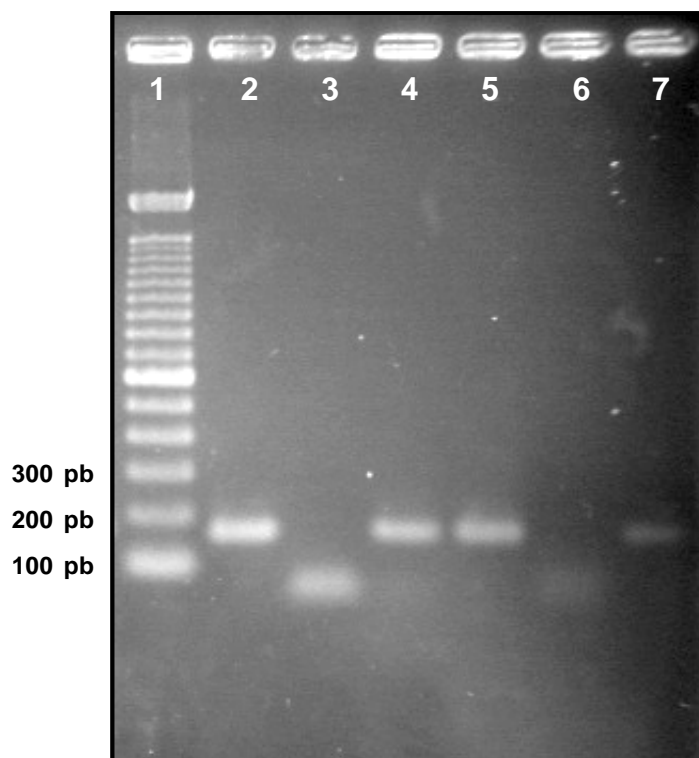
### 3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR para amplificação de fragmento do gene B1 identificou a presença de DNA de *T. gondii* em duas das capivaras analisadas (2/26). Esse resultado representa uma prevalência de infecção por *T. gondii* de 7,7%. Os animais positivos foram o número 33 macho e 31 fêmea. Na capivara 33 macho foi identificado DNA de *T. gondii* no fígado, já a capivara 31 fêmea foi positiva no fígado e no sangue (Figura 4).

Na pesquisa da seqüência de ITS1 foram identificados três animais positivos (11,5%). Para ITS1 foram identificados como positivos as capivaras 36 macho, 30 fêmea e 31 fêmea (Figura 5). No animal 36 macho, foi obtido amplificação de fragmento da região ITS1 no coração. Já nos animais 30 fêmea e 31 fêmea houve amplificação de seqüência de ITS1 no fígado.

Houve concordância parcial entre os resultados obtidos para a pesquisa do gene B1 e da região ITS1. Considerando a positividade nas duas reações houve encontro de DNA de *T. gondii* em apenas uma capivara, o que representa a prevalência de infecção de 3,8% (1/26). Tendo como critério de positividade a detecção de DNA de *T. gondii* em pelo menos uma das reações a prevalência de infecção encontrada foi de 15,4% (4/26) (Tabela 2).

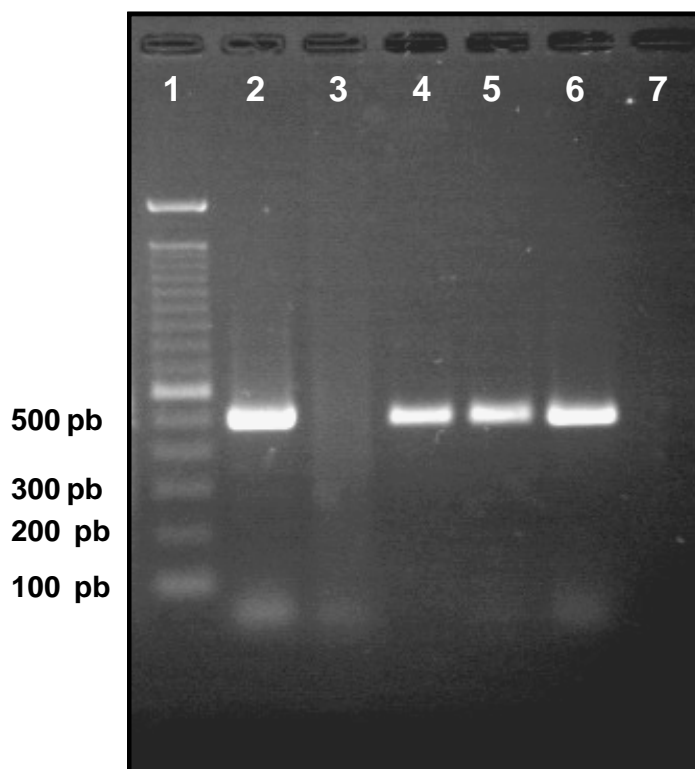
Todos os animais positivos para *T. gondii* na reação de PCR apresentaram sororreatividade para o parasito na reação de imunofluorescência indireta. As capivaras 33 macho e 31 fêmea, positivas na PCR do gene B1, apresentaram titulação de 1:64 e 1:512 respectivamente. Os animais 36 macho e 30 fêmea, positivos na PCR de ITS1, apresentaram, respectivamente, sororreatividade com título de 1:16 e de 1:256. A capivara 31 fêmea foi diagnosticada positiva para *T. gondii* na PCR do gene B1 e também da região ITS1.



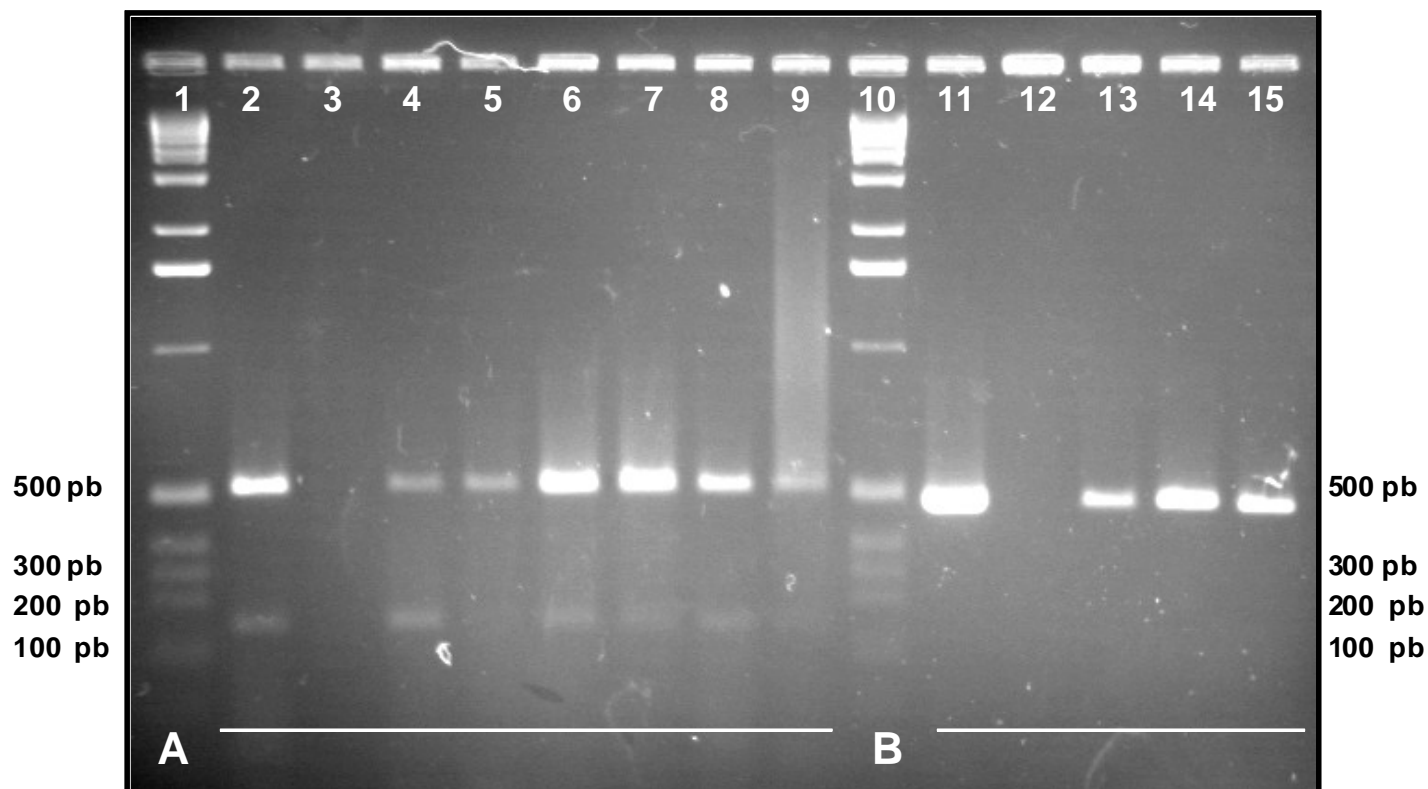
**Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação de fragmento do gene B1 de *T. gondii*. (1) Marcador molecular 100pb Sigma<sup>TM</sup>; (2) Cepa de referência RH de *T. gondii* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4) Amostra de DNA de fígado da capivara 33M apresentando amplificação de fragmento do gene B1. (5) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 31 fêmea (fígado); (6) Amostra negativa: linfonodo da capivara 36M; (7) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 31 fêmea (sangue); Tamanho do fragmento de amplificação esperado: 155pb.

**Tabela 2:** Relação de tecidos e total de capivaras positivas para as duas seqüências alvo do DNA de *T. gondii* utilizados nessa pesquisa (gene B1 e ITS1). Prevalência de infecção considerando cada um dos testes, ambos os testes ou os dois testes associados.

Região alvo	Tecidos analisados (PCR positivo/ total)					Número de animais positivos (percentual)
	Sangue	Fígado	Baço	Coração	Linfonodos	
<b>Gene B1</b>	1/26	2/26	0/26	0/26	0/26	2/26 (7,7%)
<b>ITS1</b>	0/26	2/26	0/26	1/26	0/26	3/26 (11,5%)
<b>B1 e ITS1</b>	0/26	1/26	0/26	0/26	0/26	1/26 (3,8%)
<b>B1 ou ITS1</b>	1/26	3/26	0/26	1/26	0/26	4/26 (15,4%)



**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de *T. gondii* utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5. (1) Marcador molecular 100pb Sigma<sup>TM</sup>; (2) Cepa de referência RH de *T. gondii* – controle positivo; (3) Controle negativo; (4) Amostra de DNA de coração da capivara 36M apresentando amplificação da região ITS1; (5) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 30 fêmea (fígado); (6) Presença de produto de amplificação correspondendo à capivara 31 fêmea (fígado); (7) branco.

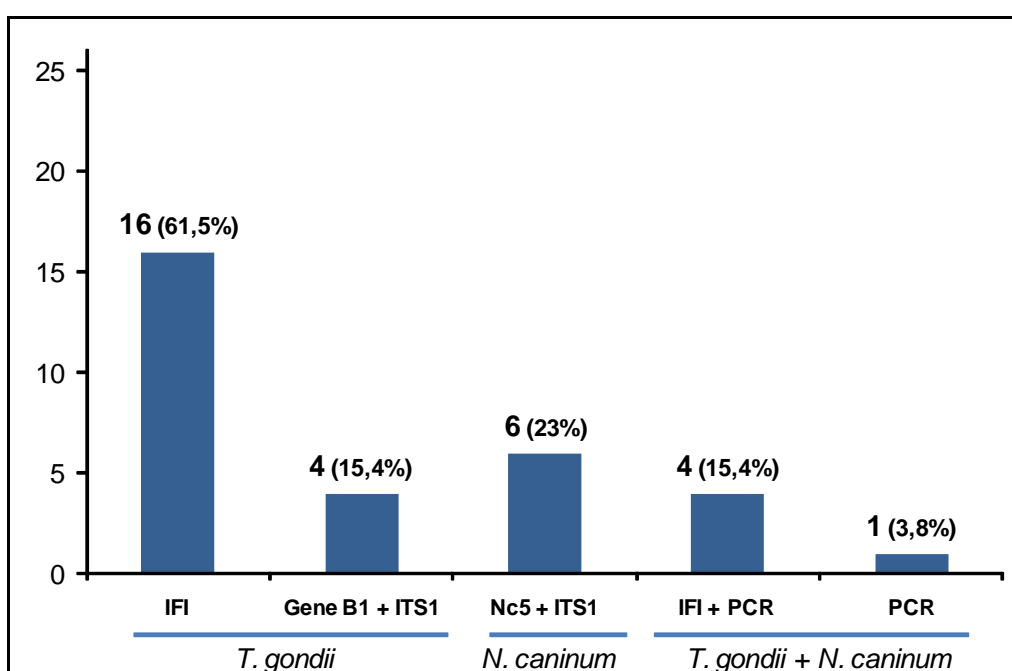


**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,6% de produtos de PCR obtidos pela amplificação da região ITS1 de *N. caninum* (A) e de *T. gondii* (B) utilizando os iniciadores ITS2 e ITS5. (1) e (10) Marcador molecular 100pb Sigma™; (2) Cepa de referência Nc-1 de *N. caninum* – controle positivo; (3) Controle negativo; 4) Capivara 38 fêmea (fígado); 5) Capivara 26 fêmea (coração); (6) e (7) Capivara 34 macho (linfonodo e coração respectivamente); (8) Capivara 28 fêmea (fígado); (9) Capivara 29 fêmea (sangue); (11) Cepa de referência RH de *T. gondii* – controle positivo; (12) Controle negativo; (13) Capivara 36M (coração); (14) Capivara 30 fêmea (fígado); (15) Capivara 31 fêmea (fígado).



### 3.3. CO-INFECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* EM CAPIVARAS

A prevalência de co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* nas capivaras analisadas no presente estudo foi de 15,4% (4/26). Essa prevalência de co-infecção foi adotada considerando o resultado da análise sorológica e da análise molecular dos parasitos (Tabela 3). Desse total, apenas um animal apresentou DNA de *T. gondii* e de *N. caninum* nos tecidos analisados (1/26), o que representa uma prevalência de 3,8% das capivaras pesquisadas.



**Figura 7** - Prevalência de infecção de *T. gondii* (imunofluorescência indireta e PCR de gene B1 e ITS1), de *N. caninum* (PCR de região Nc5 e ITS1) e da co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em capivaras, Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. No eixo das ordenadas: número total de animais pesquisados.

**Tabela 3** - Resultados da pesquisa sorológica (IFI) e molecular (PCR) de *T. gondii* e de *N. caninum* nas capivaras do Parque Tingüi, Curitiba, Paraná. Prevalência de infecção para cada umas das técnicas utilizadas e resultados da co-infecção *T. gondii* / *N. caninum*.

Capivara	<i>T. gondii</i>			<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> + <i>N. caninum</i>	
	IFI	Gene B1	ITS1	Nc5	ITS1	IFI e PCR	PCR
26F	N	N	N	N	P	N	N
26M	P	N	N	N	N	N	N
27F	P	N	N	N	N	N	N
28F	P	N	N	N	P	P	N
28M	N	N	N	N	N	N	N
29F	P	N	N	N	P	P	N
30F	P	N	P	N	N	N	N
30M	P	N	N	N	N	N	N
31F	P	P	P	N	N	N	N
32F	N	N	N	N	N	N	N
32M	P	N	N	N	N	N	N
33F	N	N	N	N	N	N	N
33M	P	P	N	N	N	N	N
34F	P	N	N	N	N	N	N
34M	P	N	N	P	P	P	N
35F	N	N	N	N	N	N	N
35M	P	N	N	N	N	N	N
36F	N	N	N	N	N	N	N
36M	P	N	P	P	N	P	P
37F	P	N	N	N	N	N	N
37M	P	N	N	N	N	N	N
38F	N	N	N	P	P	N	N
38M	P	N	N	N	N	N	N
39F	N	N	N	N	N	N	N
39M	N	N	N	N	N	N	N
40F	N	N	N	N	N	N	N
<b>TOTAL (%)</b>	<b>16 (61,5%)</b>	<b>2 (7,7%)</b>	<b>3 (11,5%)</b>	<b>3 (11,5%)</b>	<b>5 (19,2%)</b>	<b>4 (15,4%)</b>	<b>1 (3,8%)</b>

P: POSITIVO; N: NEGATIVO; M: MACHO; F: FÊMEA

#### 4. DISCUSSÃO

Nesse estudo é relatada a primeira descrição de infecção por *T. gondii* e de co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em capivaras do Estado do Paraná. Na reação de imunofluorescência indireta foi verificado que 61,5% dos animais analisados apresentavam imunoglobulinas do tipo G contra antígenos de *T. gondii*. Não houve variação significativa entre machos e fêmeas infectados. São poucos os estudos relacionados à infecção de *T. gondii* em capivaras. Em pesquisa conduzida no Estado de São Paulo, Brasil, Cañon-Franco *et al.* (2003) verificaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 69,8% das capivaras analisadas. Também no Estado de São Paulo, Yai *et al.* (2008) verificaram uma prevalência de infecção de *T. gondii* em 76,6% das capivaras.

A elevada prevalência de infecção por *T. gondii* encontrada no presente estudo e nas capivaras do Estado de São Paulo demonstra uma grande dispersão desse parasito na população de capivaras. Como esses animais estão amplamente distribuídos na América do Sul e sul da América Central é possível inferir que a capivara possui importante papel no ciclo de *T. gondii* nessas regiões.

Considerando os hábitos desse animal é possível atribuir determinados fatores que podem contribuir para a elevada prevalência de infecção encontrada nesses roedores. As capivaras são animais de hábitos gregários e apresentam comportamento semelhante dentro de um grupo, portanto estariam sujeitas às mesmas fontes de infecção. São herbívoros, vivem em áreas de capão de mata, próximo a florestas e possuem hábitos semi-aquáticos. Todas essas são condições ideais para disseminação e resistência dos oocistos, o que leva a acreditar que esses animais apresentam elevada exposição a esse estágio infectante de *T. gondii*. A ingestão de oocistos esporulados na água e nas forragens deve ser a principal fonte de infecção para as capivaras.

A contaminação do ambiente com oocistos de *T. gondii* pode ocorrer pela eliminação de fezes contaminadas tanto de gatos quanto de felídeos selvagens. Sob condições ideais os oocistos podem tornar-se infectantes entre 1 a 5 dias (Jackson e Hutchison, 1989). Os oocistos esporulados são muito resistentes no ambiente e podem continuar infectantes até 54 meses (Dubey, 1998). Como são impermeáveis, devido à parede do oocisto, acabam sendo muito resistentes a

desinfetantes e podem sobreviver por longos períodos na água (Dubey e Beattie, 1988; Tenter *et al.*, 2000).

Além de ser uma possível fonte de proteína para o homem, a capivara também pode ser predada na natureza por canídeos e felídeos selvagens. Por isso, pode ser uma fonte de infecção para esses animais. A infecção de felídeos selvagens pode ter particular importância na disseminação de *T. gondii* no ambiente selvático, já que esses animais podem eliminar oocistos nas fezes e contaminar o meio. A aproximação do homem ao ambiente de mata, ou mesmo a introdução da capivara no ambiente rural ou urbano, aproxima o gato doméstico a esses roedores. Colaborando também dessa forma para o fechamento do ciclo de transmissão de *T. gondii*.

Outra possibilidade de transmissão de *T. gondii* entre as capivaras seria a via transplacentária. Como esses animais apresentam alta prolificidade, esse mecanismo de infecção poderia também explicar a elevada prevalência do parasito nessa população. Na reação de PCR para fragmento de gene B1 foi encontrado DNA de *T. gondii* na circulação sanguínea e no fígado da capivara 31 fêmea, que apresentou o maior título na reação de IFI (1:512). A presença de infecção aguda de *T. gondii* e parasitemia está associada à transmissão transplacentária em outros animais, inclusive roedores, e no homem (Remington e Desmonts, 1990; Owen e Trees, 1998; Ebbesen, 2000; Marshall *et al.*, 2004).

A prevalência de co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* encontrada no presente estudo indica que as capivaras estão expostas à infecção por ambos os parasitos. O comportamento, dieta e hábitat desses animais os submetem ao mesmo risco de infecção tanto por *T. gondii* quanto por *N. caninum*. Sendo que a prevalência de infecção pode variar conforme o nível de contaminação do ambiente pelos oocistos de cada um dos parasitos. O valor de co-infecção pode estar subestimado se considerarmos a realização de análise sorológica apenas para *T. gondii*.

Na reação de PCR, considerando as duas regiões alvo (gene B1 e região ITS1), foi observado presença de DNA de *T. gondii* nos tecidos de 15,4% das capivaras. As reações apresentaram positividade no coração, fígado e sangue dos animais pesquisados.

A discrepância observada entre os resultados sorológicos e os de pesquisa de DNA pode estar relacionada ao fato de na maioria dos animais

terem sido analisados apenas o fígado e o sangue. Como o fragmento de fígado era pequeno e como nem todos os animais apresentariam parasitemia, era esperado que a pesquisa de anticorpos representasse um diagnóstico de maior sensibilidade.

Todas as capivaras positivas na reação de PCR apresentaram sorologia também positiva para *T. gondii*, confirmando indiretamente a especificidade do diagnóstico molecular. Apesar disto, animais negativos na sorologia poderiam estar infectados pelo parasito, sendo uma das razões para tanto o fato de termos pesquisado apenas a imunoglobulina tipo G. Recentemente, Yai *et al.* (2008) isolaram formas parasitárias viáveis de *T. gondii* de 90% das capivaras analisadas, independentemente do título de anticorpos e da positividade sorológica, já que na reação de IFI encontram 76,6% dos animais com anticorpos anti-*T. gondii*.

Assim como no Estado de São Paulo, foi encontrada uma elevada soroprevalência de infecção por *T. gondii* em capivaras do Estado do Paraná. É provável que esse protozoário apresente elevada dispersão em capivaras distribuídas em toda a América do Sul. Os hábitos da capivara e a sua posição na cadeia alimentar são fatores que podem incumbir a esse animal grande importância no ciclo de *T. gondii* nessa região do continente. A carne da capivara pode ser uma fonte de infecção para o homem, sendo importante incluir essa espécie animal em inquéritos epidemiológicos quando da ocorrência de casos de toxoplasmose.

## 5. CONCLUSÕES

Essa foi a primeira pesquisa sobre a infecção de *T. gondii* em capivaras conduzida no Estado do Paraná. A presença do parasito foi confirmada pela pesquisa de IgG anti-*T. gondii* e pela detecção do DNA do protozoário, tendo como alvo da PCR duas seqüências de seu genoma.

A soroprevalência de imunoglobulinas G anti-*T. gondii*, detectadas pelo método de imunofluorescência indireta, foi de 61,5% e não houve variação significativa entre machos e fêmeas. Elevada soroprevalência também foi obtida por Cañon-Franco *et al.* (2003) e Yai *et al.* (2008) em pesquisas conduzidas no Estado de São Paulo.

Amplificações do DNA do parasito foram obtidas no sangue, fígado e coração. Na análise de fragmento do gene B1 foi verificado a prevalência de infecção de 7,7% (2/26). Para a região ITS1 foram considerados positivos 11,5% das capivaras (3/26). A prevalência de infecção considerando positividade em ambos os testes foi de 3,8% (1/26). Já a prevalência considerando como positivos os animais que apresentaram produtos de amplificação para Nc5 ou ITS1 foi de 15,4% (4/26).

Foi encontrada ampla disseminação de *T. gondii* nos tecidos das capivaras, inclusive no sangue. Esse achado reforça a possibilidade da capivara ser um hospedeiro intermediário natural de *T. gondii*.

## 6. PERSPECTIVAS

Existe a possibilidade de transmissão vertical entre capivaras. Os casos de abortos observados em capivaras do Parque Tingüi podem estar relacionados à toxoplasmose. Para confirmar essa possibilidade é necessário pesquisa dos fetos abortados, fluidos e tecidos placentários na tentativa de identificar e isolar *T. gondii*.

A capivara pode ter importante papel na dispersão e manutenção de *T. gondii* no ambiente selvático da América do Sul, onde se encontram amplamente distribuídas. Mais estudos com capivaras de outras áreas e caracterização de isolados de *T. gondii* desses animais serão importantes no esclarecimento de sua importância epidemiológica na toxoplasmose e no ciclo de vida do parasito.

A capivara pode representar uma potencial fonte de infecção de *T. gondii* para canídeos, felídeos selvagens e para o homem. Estudos posteriores visando o isolamento do parasito, a caracterização da cepa isolada e testes de infectividade são necessários para confirmar a hipótese aventada no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, E.; LEMOINE, M.; POULLE, M.L.; RAVAT, M.C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; RABILLOUD, M.; RICHE, B.; GILOT-FROMONT, E. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 1017-1023, 2008.

AMMASSARI, A.; MURRI, R.; CINGOLANI, A.; ANTINORI, A. AIDS associated cerebral toxoplasmosis: an update on diagnosis and treatment. In: Gross U, editor. *Toxoplasma gondii*. **Berlin: Springer-Verlag**, p. 209-222, 1996.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.C.F.; OREFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state. **Brazil Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 55-62, 2003.

BARIL, L.; ANCELLE, T.; GOULET, V.; THULLIEZ, P.; TIRARD-FLEURY, V.; CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case control study in France. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 305-309, 1999.

BOWIE, W.R.; KING, A.S.; WERKER, D.H.; ISAACRENTON, J.L.; BELL, A.; ENG, S.B.; MARION, S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.

CAÑON-FRANCO, W.A.; YAI, L.; JOPPERT, A.M.; SOUZA, C.E.; D'AURIA, S.R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from Brazil. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 4, p. 850, 2003.

CARME, B.; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D.; BOUYNE, R.; AZNAR, C.; DEMAR, M.; BICHAT, S.; LOUVEL, D.; BOURBIGOT, A.M.; PENEAU, C.; NERON, P.; DARDE, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4037-4044, 2002.

COOK, A.J.C.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P.A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A.E.; DUNN, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. **Br. Med. J.**, v. 321, p. 142-147, 2000.



DABRITZ, H.A.; MILLER, M.A.; ATWILL, E.R.; GARDNER, I.A.; LEUTENEGGER, C.M.; MELLI, A.C.; CONRAD, P.A. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 231, p. 1676-1684, 2007.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. **Florida: CRC Press, Boca Raton**, p. 1-40, 1988.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst forming coccidia of humans and animals. In: Kreier JP, editor. **Parasit. Prot.**, v. 6, n. 2, p. 1-158, 1993.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **J. Parasitol.**, v. 84, p. 862-865, 1998.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet. Parasitol.**, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; BHAIYAT, M.I.; MACPHERSON, C.N.; DE ALLIE, C.; CHIKWETO, A.; KWOK, O.C.; SHARMA, R.N. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **J. Parasitol.**, v. 92, n. 5, p. 1107-1108, 2006.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 1257-1278, 2008.

EBBESEN, P. Placenta physiology. In: Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E.; editors. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. **Paris: Springer-Verlag**, p. 27-35, 2000.

EFSA. Monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. Scientific opinion of the panel on biological hazards. **EFSA Journal**, v. 583, p. 1-64, 2007.

GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004b.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim. Health Res. Reviews**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part 1: epidemiology and course of disease. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 136, p. 973–988, 2003.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; KNAPEN, F.V. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 285-289, 1997.

JACKSON, M.H.; HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Adv. Parasitol.**, v. 28, p. 55-105, 1989.

KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma*: the next 100 years. **Microb. Infect.**, v. 10, p. 978-984, 2008.

KAPPERUD, G.; JENUM, P.A.; STRAYPEDERSEN, B.; MELBY, K.K.; ESKILD, A.; ENG, J.; Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy – results of a prospective case-control study in Norway. **Am. J. Epidemiol.**, v. 144, p. 405–412, 1996.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 1359–1370, 2008a.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. *Toxoplasma* safe meat: close to reality? **Trends in Parasitol.**, v. 781, 2008b.

KORTBEEK, L.M.; DE MELKER, H.E.; VELDHUIJZEN, I.K.; CONYN-VAN SPAENDONCK, M.A.E. Population-based *Toxoplasma* seroprevalence study in the Netherlands. **Epidemiol. Infect.**, v. 132, p. 839–845, 2004.

JONES, J.L.; KRUSZON-MORAN, D.; SANDERS-LEWIS, K.; WILSON, M.; *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 405–410, 2007.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. Risk profile: *Toxoplasma gondii* in red meat and meat products. In: **New Zeal. Food Saf. Auth.**, p. 1-33, 2002.

MARSHALL, P.A.; HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; SMITH, J.E.; MURPHY, R.G.; HIDE, G. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus* **Parasitol.**, v. 128, p. 39-42, 2004.

MORSY, T.A.; SABRY, A.H.; HABIB, K.S.; ARAFA, M.A.; EL BAHRAWY, A.F.; AL DAKHIL, M.M. Antibodies against *Toxoplasma* in commensal rodents trapped in Riyadh Region, Saudi Arabia. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 24, n. 2, p. 279-84, 1994

PEDRASSANI, D. Prevalência de título de anticorpos imunoglobulinas G anti-*Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 em cães. PR. Curitiba, 2001. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

PUJOL-RIQUE, M.; DEROUIN, F.; GARCIA-QUINTANILLA, A.; VAILS, M.E.; MIRO, J.M.; DE ANTA, M.T.J. Design of a one-tube heminested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 857-862, 1999.

REMYINGTON, J.S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. **Philadelphia: WB Saunders**, v. 3, p. 89-195, 1990.

ROBSON, J.M.B.; WOOD, R.N.; SULLIVAN, J.J.; NICOLAIDES, N.; LEWIS, B.R. A probable foodborne outbreak of toxoplasmosis. **Comm. Dis. Intelligence**, v. 19, p. 517-522, 1995.

ROGHMANN, M.C.; FAULKNER, C.T.; LEFKOWITZ, A.; PATTON, S.; ZIMMERMAN, J.; MORRIS, J.G. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 790-792, 1999.

ROSS, R.D.; STEC, L.A.; WERNER, J.C.; BLUMENKRANZ, M.S.; GLAZER, L.; WILLIAMS, G.A. Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deer hunters. **Retina-J. Retin. Vitreous Dis.**, v. 21, p. 226-229, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, third edition, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHARES, G.; VRHOVEC, A.G.; PANTCHEV, N.; HERRMANN, D.C.; CONRATHS, F.J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 34–45, 2008.

SIBLEY, L.D. Recent origins among ancient parasites. **Vet. Parasitol.**, v. 115, p. 185-198, 2003.

SMITH, D.D.; FRENKEL, J.K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **J. of Wildlife Dis.**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.

SOUZA, S.L.P.; MARVULO, M.F.V.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; JACOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; FERRO, C.; RAGOZO, A.M.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SILVA, J.C.R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mamíferos silvestres do Parque Nacional de Emas, GO. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 14.**; Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, 2., Ribeirão Preto, p. 311, 2006.

STANFORD, M.R.; TAN, H.K.; GILBERT, R.E. Toxoplasmic retinochoroiditis presenting in childhood: clinical findings in a UK survey. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 90, p. 1464-1467, 2006.

TENTER, A.M.; HECKEROTHA, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR protocols, a guide for methods and applications**, Academic Press, p. 315-322, 1990.

YAI, L.E.; RAGOZO, A.M.; AGUIAR, D.M.; DAMACENO, J.T.; OLIVEIRA, L.N.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Isolation of *Toxoplasma gondii* from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **J. Parasitol.**, v. 94, n. p. 1060-1063, 2008.

# **ANEXO**

## ANEXO

**Tabela 4** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do gene B1 do DNA de *T. gondii*.

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	29,75 µL
Tampão	10 X	1 X	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	2,0 µL
Iniciador senso	50 pmol/ µL	25 pmol	0,5 µL
Iniciador antisenso	50 pmol/ µL	25 pmol	0,5 µL
Triton-100X	10%	0,1%	0,5 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25 µL
DNA	8 ng/µL	80 a 100 ng	10 µL
Total	----	----	50 µL

**CAPÍTULO V:**  
**ANÁLISE DA CONDIÇÃO SANITÁRIA DAS CAPIVARAS**  
**(*Hydrochaeris hydrochaeris* LINNAEUS, 1766) DO**  
**PARQUE TINGÜI, CURITIBA, PARANÁ**

## Resumo

O crescimento da população de capivaras é favorecido por ações do homem sobre o meio ambiente. Existe no Parque Tingüi, cidade de Curitiba, Estado do Paraná condições que favorecem o aumento exponencial da população desses animais. Esse fato, aliado à proximidade com animais domésticos e o homem, pode possibilitar a transmissão de patógenos que utilizam a capivara como reservatório ou hospedeiro. Com o objetivo de determinar os riscos que esses roedores representam para a saúde pública, foi investigado no presente estudo a sua condição sanitária. Para tanto, vinte e seis capivaras foram capturadas e avaliadas para infecção por esporozoários, tripanossomatídeos e riquetsias. Paralelamente, foram coletadas amostras de fezes (n=53) e três animais foram necropsiados para avaliação da fauna parasitária gastrointestinal. As amostras investigadas na pesquisa de esporozoários, tripanossomatídeos e riquetsias foram: sangue total, soro, fígado, baço, coração e linfonodos. O diagnóstico de esporozoários foi realizado pelas técnicas de imunofluorescência (IFI) e reação em cadeia da polimerase (PCR); de tripanossomatídeos pelas técnicas de IFI, PCR, cultivo *in vivo*, *in vitro*, microhematócrito, esfregaço por distensão delgada e gota espessa; e de riquetsias pela técnica de PCR. A fauna parasitária gastrointestinal foi avaliada por exames coproparasitológicos e pela análise direta em necropsia. Foi verificado que as capivaras do parque Tingüi apresentam infecção pelos parasitos: *Protozophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, estromgilídeos, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp, *Eimeria* spp, *Fasciola hepatica*, *Monoecocetus* spp, ascarídeos e sarcocistídeos, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Foram obtidos resultados negativos para a infecção por *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Desses, os parasitos que podem eventualmente infectar o homem são *F. hepatica* e *T. gondii* e aqueles que podem infectar animais domésticos são *F. hepatica*, *N. caninum* e *T. gondii*. Esses resultados demonstram que as capivaras do Parque Tingüi representam um risco mínimo para a saúde do homem e outros animais que habitam a área, e que possuem contato próximo com esses roedores. Contudo, estudos de monitoramento são necessários para prevenir futuros surtos de zoonoses.

**PALAVRAS-CHAVE:** tripanossomatídeos, esporozoários, riquetsias, parasitos gastrintestinais, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), epidemiologia, zoonose.



### Abstract

The growth of the capybaras' population is favored by the action of the man on the environment. It exists in the Tingüi Park, city of Curitiba, Paraná State conditions that favor the increase of the population of these animals. This fact, ally to the proximity with domestic animals and the man, can make possible the transmission of parasites that use the capybara as a reservoir or host. To determine the risks that these rodents represent for the public health, its sanitary condition was investigated. Twenty and six capybaras were captured and evaluated for infection by sporozoan, trypanosomatids and rickettsial pathogens. Also, the gastrointestinal parasitic fauna were analysed by four different coproparasitologic techniques and necropsy. The samples analysed to diagnose the infection by sporozoan, trypanosomatids and rickettsiae were: blood, serum, liver, spleen, heart and lymph nodes. The diagnose of sporozoa was assessed using the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and polimerase chain reaction (PCR); trypanosomatids by IFAT, PCR, *in vivo and in vitro* culture, microhematocrit centrifuge technique, blood smear; and rickettsial pathogens by PCR. The capybaras evaluated in the present study were infected by: *Strongyloides chapini*, Strongyloidea, *Protozoophaga obesa*, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp., Ascaroidea, *Fasciola hepatica*, *Monoecocestus* spp., *Eimeria* spp., Sarcocystidae, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. And resulted negative for the infection by *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. Of these, the parasites that can eventually infect the man are *F. hepatica* and *T. gondii* and those that can infect domestic animals are *F. hepatica*, *N. caninum* and *T. gondii*. These results demonstrate that capybaras of the Tingüi Park represents a minimum risk for the health of the man and other animals that inhabit the area. However, future studies are necessary to prevent zoonosis outbreaks.

**Keywords:** trypanosomatids, sporozoan, rickettsial, gastrointestinal parasites capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), epidemiology, zoonosis.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento exponencial da população de capivaras do Parque Tingüi tem sido razão de preocupação das autoridades responsáveis e da população da cidade de Curitiba, especialmente aquela que procura o parque na busca de lazer e entretenimento. As principais questões levantadas são relacionadas ao impacto para a saúde pública, à poluição do ambiente com os dejetos das capivaras e à própria conservação e bem-estar desses animais. O Parque Tingüi está localizado em área domiciliar da cidade de Curitiba, onde vivem e transitam milhares de pessoas. A proximidade desses roedores ao ambiente urbano é cada vez maior e a adoção de providências para evitar danos ao ambiente, ao homem, aos animais domésticos e à capivara mostra-se cada vez mais necessárias.

Um dos principais focos de atenção e preocupação da sociedade é mesmo com relação à possibilidade da transmissão de patógenos desses animais para o homem. A capivara é um reservatório de riquetsias, entre elas *Rickettsia rickettsii* que causa a febre maculosa, de *Leptospira interrogans*, que pode infectar o homem e os animais domésticos e de produção, e de *Trypanosoma evansi* que causa o “mal-das-cadeiras” principalmente em eqüídeos (Muñoz e Chávez, 2001; Labruna *et al.*, 2002; Vasconcelos, 2002). Esses roedores podem ainda albergar outros parasitos que podem causar zoonoses, como: *Fasciola hepatica*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. (Rocco e Luz, 2002; Reginatto *et al.*, 2008; El-Kouba *et al.*, 2008).

A situação presente no Parque Tingüi pode propiciar a transmissão de patógenos entre as capivaras e o homem, e também entre os animais domésticos. As condições epidemiológicas estão presentes e são favoráveis para a transmissão de parasitos. A elevada concentração desses roedores, o trânsito contínuo de pessoas que visitam o parque, a presença de animais domésticos e o estreito contato entre essas populações são todos pontos críticos na possibilidade de surtos de doenças. Talvez seja um fator agravante o fato das capivaras utilizarem a água da lagoa e das proximidades do parque, já que posteriormente, sendo drenada para o rio Barigüi, essa água irá abastecer os pontos de tratamento da Sanepar e abastecer a cidade. O risco seria a transmissão de patógenos veiculados pela água, como coliformes fecais, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Visando a mensuração do risco que a superpopulação de capivaras do parque Tingüi representa para a saúde pública buscou-se determinar a condição sanitária desses animais. Para tanto, foi investigada a fauna parasitária gastrointestinal (Capítulo II), a ocorrência de infecção por esporozoários (Capítulo III e IV), tripanossomatídeos e riquetsias (Capítulo V).

Nesse capítulo será feita uma breve apresentação e discussão geral dos resultados obtidos nessa pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS:

- Realizar exames sorológicos, moleculares e parasitológicos para detecção de *Leishmania* spp. e verificar, de forma direta e indireta, a presença do parasito em capivaras;

- Realizar exames moleculares e parasitológicos para detecção de *Trypanosoma* spp., e verificar, de forma direta, a presença do parasito em capivaras;

- Realizar exames moleculares e parasitológicos para detecção de *Rickettsia* spp., e verificar a presença da bactéria em capivaras residentes na cidade de Curitiba, Estado do Paraná;

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Definir a possibilidade das capivaras localizadas no Parque Tingüi, Curitiba-PR, atuarem como reservatórios de tripanossomatídeos e riquetsias;

- Determinar se as capivaras localizadas no Parque Tingüi representam riscos à saúde pública à medida que ocorre o crescimento descontrolado de sua população;

- Adotar métodos direcionados para o controle da população de capivaras e medidas de prevenção quanto à possível ocorrência de zoonoses.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os dados referentes à área geográfica e à população de estudo estão descritos no Capítulo III, item 3.1.

#### 3.2. AMOSTRAGEM

##### 3.2.1. Contenção química

A metodologia utilizada para a contenção das capivaras foi anteriormente descrita no Capítulo III, item 3.2.

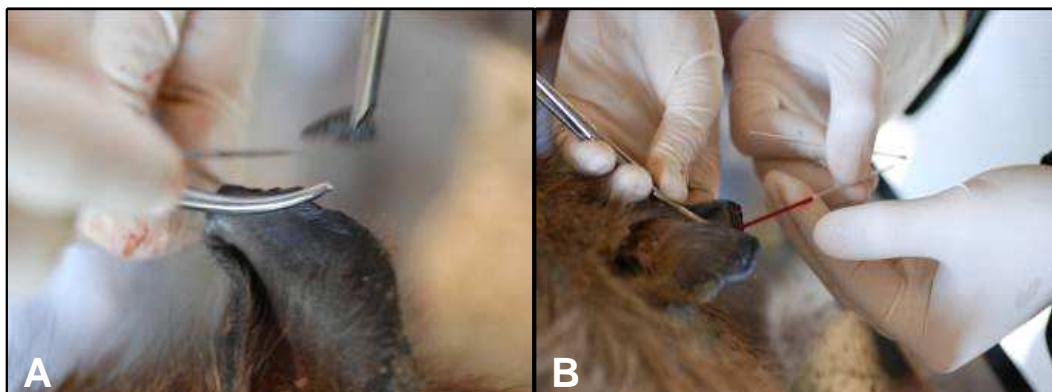
##### 3.2.2. Coleta das amostras

A coleta das amostras de sangue, fígado, baço, linfonodos e coração foi realizada conforme descrito no Capítulo III, item 3.4, subitens 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3.

##### 3.2.2.1. Pele e sangue periférico

Amostras de pele do ápice da orelha foram obtidas por biópsia excisional. A pele foi depilada, higienizada com água e sabão e para anti-sepsia foi utilizado álcool 70%GL. Para a biópsia foram utilizados pinça hemostática de Kelly, bisturi e pinça dente-de-rato.

Os fragmentos de pele mediram aproximadamente 1 cm x 2 cm e foram preservados em tubos individuais contendo solução de NaCl 0,9% estéril, a 6-8°C até encaminhamento ao laboratório, onde foram processadas e armazenadas. Sangue periférico foi obtido no ápice da orelha com uso de capilar de microhematócrito. Após a coleta dessa amostra, foi realizada hemostasia com termocautério na orelha incisionada (Figura 1).



**Figura 1** - Demonstração do método de coleta da pele da orelha (A) e do sangue periférico (B) em capivara contida quimicamente. Foto: Professor Rogério Ribas Lange, 2008.

### 3.3. ANÁLISE SOROLÓGICA

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. no soro das capivaras pesquisadas. O antígeno utilizado foi a forma promastigota de *Leishmania braziliensis*, na concentração de 500 células em cada área de reação. Os soros foram diluídos a partir de 1:20, com fator 2 de diluição (1:20; 1:40, 1:80 e assim por diante). O conjugado anti-capivara IgG foi adquirido da Secretária Municipal de Saúde do Estado de São Paulo. Para uso na reação de IFI, o conjugado foi diluído 200 vezes em PBS contendo 4% de Azul de Evans. A técnica foi executada conforme descrito no Capítulo IV, item 2, subitem 2.3.

Foram consideradas positivas as reações que apresentavam fluorescência em toda a superfície de *L. braziliensis*. A maior diluição do soro em que essa reação ainda se mostrava presente determinava o título de reação de cada amostra. Em cada lâmina foram acrescentados soros controles positivos e negativos, para serem usados como controle da reação e da leitura da lâmina.

### 3.4. ANÁLISE MOLECULAR

#### 3.4.1. Extração do DNA

As amostras de DNA utilizadas nesse estudo foram obtidas pela aplicação de três diferentes técnicas de extração, conforme previamente descrito no Capítulo III, item 3.5.1, subitens 3.5.1.1, 3.5.1.2 e 3.5.1.3.

### 3.4.2. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada como método de diagnóstico molecular para os seguintes parasitos: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *Rickettsia* spp. Foram utilizadas, para tanto, as amostras de DNA de sangue total, fígado, coração, baço e linfonodos. Nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 estão resumidas as informações sobre os protocolos utilizados para cada PCR.

**Tabela 1** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de *T. cruzi* (Kirchhoff *et al.*, 1996).

Componente	Concentração de uso	Concentração na reação	Volume na reação
Água ultrapura	----	qsp	13 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1,0 µL
TCZ1	20 pmol/ µL	25 pmol	1,25 µL
TCZ2	20 pmol/ µL	25 pmol	1,25 µL
Gelatina	2%	0,01%	0,125 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0,625 U	0,125 µL
DNA	8 ng/µL	40 a 50 ng	5 µL
Total	----	----	25 µL

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *T. cruzi* de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 33 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 65°C por 1 minuto para a hibridização e 1 minuto a 72°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

**Tabela 2** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de *T. rangeli* (Vargas *et al.*, 2000).

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	14,9 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,0 mM	0,5 µL
dNTPs	5 mM	0,1 mM	0,5 µL
R1	20 pmol/ µL	12,5 pmol	0,625 µL
R2	20 pmol/ µL	12,5 pmol	0,625 µL
Gelatina	2%	0,01%	0,125 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1,0 U	0,2 µL
DNA	8 ng/µL	40 a 50 ng	5 µL
Total	----	----	25 µL

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *T. rangeli* de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 33 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 65°C por 1 minuto para a hibridização e 1 minuto a 72°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

**Tabela 3** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de *L. amazonensis* (Mimori *et al.*, 1998).

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	13,55 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1,0 µL
a1	25 pmol/ µL	25 pmol	1,0 µL
a2	25 pmol/ µL	25 pmol	1,0 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1,0 U	0,2 µL
DNA	8 ng/µL	40 a 50 ng	5 µL
Total	----	----	25 µL

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *L. amazonensis* de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto e 30 segundos para a hibridização e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 10 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.



**Tabela 4** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do DNA de *L. braziliensis* (Mimori *et al.*, 1998).

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	10,5 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1,0 µL
B1	10 pmol/ µL	25 pmol	2,5 µL
B2	10 pmol/ µL	25 pmol	2,5 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25 µL
DNA	8 ng/µL	40 a 50 ng	5 µL
Total	----	----	25 µL

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *L. braziliensis* de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 67°C por 1 minuto para a hibridização e 1 minuto a 72°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 10 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

**Tabela 5** - Solução de amplificação da PCR e componentes utilizados para amplificação de fragmento do gene *gltA* de *Rickettsia* spp. (Labruna *et al.*, 2004).

<b>Componente</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Concentração na reação</b>	<b>Volume na reação</b>
Água ultrapura	----	qsp	14,95 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1,0 µL
CS 78	100 pmol/ µL	20 pmol	0,2 µL
CS 323	100 pmol/ µL	20 pmol	0,2 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	2,0 U	0,4 µL
DNA	8 ng/µL	40 a 50 ng	5 µL
Total	----	----	25 µL

Em cada ciclo de reações foi adicionado uma amostra de DNA de *Rickettsia* sp. de cepa referência e uma amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles da reação.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 95°C por 15 segundos para desnaturação, 48°C por 30 segundos para a hibridização e 30 segundos a 72°C para a extensão. Na última etapa foi programado um ciclo de 7 minutos a 72°C para a extensão final seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

### 3.5. GOTA-ESPESSA, MICRO-HEMATÓCRITO E DISTENSÃO DELGADA DE SANGUE PERIFÉRICO

Amostras de sangue venoso periférico de cada capivara (n=26) foram avaliadas de forma direta pela técnica de gota espessa, micro-hematócrito (Murray *et al.*, 1977; Woo, 1970) e distensão delgada. As lâminas foram coradas pela técnica de May-Grünwald/Giemsa e a leitura realizada em todos os campos, ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes e de 1000 vezes (objetiva de imersão).

### 3.6. CULTIVO *IN VITRO*

As amostras de linfonodo (n=3), fígado (n=26), baço (n=3), coração (n=3), pele de orelha (n=26) e camada leucocitária (n=26) foram cultivadas em meio NNN (McNeal, Novy e Nicolle), que favorece o crescimento de tripanossomatídeos. Os meios de cultivo foram mantidos em temperatura ambiente e os repiques foram realizados a cada 5 dias.

### 3.7. CULTIVO *IN VIVO*

Foram utilizados camundongos fêmeas “Swiss webster” (*Mus musculus*) de cerca de 40 dias de idade. Esses animais foram inoculados, via intraperitoneal, com amostras de sangue total previamente processado por métodos de concentração de tripanossomatídeos e esporozoários.

Após a inoculação, os camundongos foram avaliados a cada três dias para verificação de parasitemia. Tal pesquisa foi conduzida pela análise do sangue periférico da extremidade da cauda dos camundongos. O exame foi realizado a fresco e após coloração pela técnica de May-Grünwald/Giemsa, ao microscópio óptico, aumento de 400 vezes e de 1000 vezes (objetiva de imersão).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Não foi verificada a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Nos soros das capivaras pesquisadas.

### 4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Todos os animais resultaram negatividade na pesquisa de DNA de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *Rickettsia* spp. As reações de PCR amplificaram somente fragmentos de DNA dos controles positivos.

#### 4.3. GOTA-ESPESSA, MICRO-HEMATÓCRITO E DISTENSÃO DELGADA DE SANGUE PERIFÉRICO

Não foram verificados parasitos na análise direta do sangue periférico dos vinte e seis animais pesquisados.

#### 4.4. CULTIVO *IN VITRO*

Após seis meses de repiques não foi observado crescimento de tripanossomatídeos em nenhuma das amostras avaliadas.

#### 4.5. CULTIVO *IN VIVO*

Não foi verificada a presença de parasitos no sangue periférico dos camundongos inoculados com material de sangue total das capivaras amostradas.

### 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi verificado que as capivaras do parque Tingüi apresentam infecção pelos parasitos gastrintestinais: *Protozoophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, estrogilídeos, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp, *Eimeria* spp, *Fasciola hepatica*, *Monoecocetus* spp, ascarídeos e sarcocistídeos. Também foi constatado o parasitismo por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, e obtidos resultados negativos para a infecção por *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Em estudos paralelos foi verificada a ocorrência de infecção por *Leptospira interrogans* (15,3%), sorovares *copenhageni* (15,3%), *pomona* (3,8%), *hardjo* (3,8%) e *hebdomadis* (3,8%), e por *Brucella* spp. (15,3%) (Joseli Catarina Schimanski e Rogério Ribas Lange, comunicação pessoal).

Foi observado que os animais investigados possuíam uma elevada carga parasitária, sem, contudo, demonstrar sinais de parasitismo. Esse dado enaltece características da capivara como a rusticidade e resistência a doenças, e denota a importância que esse animal pode ter como reservatório de patógenos que podem causar doença no homem e em animais domésticos. Dos parasitos e bactérias diagnosticados nos animais investigados, aqueles que podem infectar o homem são *Fasciola hepatica*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* e *Brucella* spp.

O trematódeo *Fasciola hepatica* possui potencial zoonótico desde que todas as condições necessárias para o seu ciclo biológico estejam presentes. No ambiente de estudo não foi encontrado o hospedeiro intermediário natural do parasito: moluscos do gênero *Lymnaea*. Entretanto, faz-se necessário uma pesquisa mais completa em todas as áreas de águas lânticas do parque para obter confirmação segura da ausência ou baixa infestação de *Lymnaea* spp. nesse meio.

Foi verificada uma prevalência de infecção por *F. hepatica* de 9,4%. Das três capivaras necropsiadas, duas estavam parasitadas pelo trematódeo (66,6%). Entretanto, nesses dois animais foi verificada a presença de apenas um parasito adulto nas vias biliares extra-hepáticas. Ovos de *F. hepatica* foram encontrados em três amostras de fezes analisadas pela técnica de sedimentação espontânea (2/53) e pela técnica da tamização (1/53). Nessas amostras foi verificada a ocorrência de apenas de um a três ovos por lâmina. A baixa carga parasitária encontrada nas capivaras infectadas pode ser marcador da reduzida exposição ambiental desses animais às metacercárias, que por sua vez pode confirmar a baixa população de hospedeiros intermediários no ambiente. As capivaras possuem trânsito livre entre os Parques Tingüi, Tangüa e Barigüi (Márcia Arzua, comunicação pessoal) o que pode indicar a possibilidade dos animais positivos no presente estudo terem sido infectados em outras localidades que não o Parque Tingüi.

Contudo, não deixa de ser importante o potencial zoonótico que a *F. hepatica* pode representar aos funcionários e freqüentadores do Parque Tingüi. A fasciolose ainda é uma realidade nas proximidades da bacia hidrográfica de Curitiba. Estudos de dinâmica populacional de *Lymnaea* spp. são tão necessários quanto a continuidade de ações em educação de saúde, principalmente para os grupos de risco.

É improvável que as capivaras do Parque Tingüi representem uma fonte de infecção de *T. gondii* para o homem. Para tanto seria necessário a ingestão de carne crua ou mal cozida desses roedores. As pessoas que transitam o parque não são expostas ao risco de toxoplasmose pelo convívio estreito com as capivaras. Entretanto, sabe-se que esse animal é muito valorizado no sistema de produção devido ao seu elevado potencial zootécnico e à qualidade de seus produtos, sendo a sua carne bastante apreciada em muitos países da América

do Sul e Central (Silva Neto, 1995; Pinheiro *et al.*, 2007). Assim, o consumo de carne de capivara pode eventualmente ser associado a casos de toxoplasmose, mas não representa risco iminente de zoonose aos freqüentadores do parque.

Talvez, as capivaras representem maior risco à saúde pública por serem possíveis reservatórios de *L. interrogans*. A eliminação da bactéria pela urina desses animais pode contaminar a água e áreas de gramado do parque e expor as pessoas e animais domésticos que freqüentam a área ao risco de infecção. Para comprovar o real risco de infecção por *L. interrogans* seria necessário demonstrar essa bactéria na urina ou tecido renal das capivaras. A sororreatividade indica contato e resposta imune do hospedeiro ao patógeno, mas não confere necessariamente àquele animal o estado de portador da infecção. Essa mesma observação pode ser estendida para *Brucella* spp. O homem é um hospedeiro acidental dessa bactéria e para infectar-se necessita do contato com mucosas do animal infectado. Outras formas de infecção ocorrem pela ingestão de produtos contaminados, como vísceras e leite (Poester *et al.*, 2002).

Os resultados negativos para a infecção por *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp. eram esperados devido à ausência ou reduzida prevalência dos vetores de cada parasito no ambiente de estudo. De qualquer maneira, tais dados permitem afirmar com segurança a impossibilidade de esses patógenos causarem doenças na população que habita as áreas ao redor do Parque Tingüi, bem como àqueles que utilizam do espaço do parque para seu lazer. Considerando *Rickettsia* spp. o risco é realmente mínimo já que foi observado uma infestação muito baixa por carrapatos vetores da bactéria nas capivaras pesquisadas e na área de estudo (Márcia Arzua, comunicação pessoal).

Não foram encontrados cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes avaliadas. Assim, podemos inferir que o risco de infecção para o homem e animais domésticos é reduzido. Contudo, como a capivara pode ser hospedeiro desses protozoários (Reginatto *et al.*, 2008) e devido *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. serem importantes parasitos transmitidos pela água, mais estudos não necessários para confirmar o potencial de transmissão de tais patógenos por esses roedores.

## 6. CONCLUSÕES

As capivaras do parque Tingüi, Curitiba, Paraná, possuem elevada carga parasitária. Esses animais estão infectados por: *Protozophaga obesa*, *Strongyloides chapini*, estrogilídeos, *Capillaria hydrochoeri*, *Trichuris* sp, *Eimeria* spp, *Fasciola hepatica*, *Monoecocestus* spp, ascarídeos, sarcocistídeos, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leptospira interrogans* e *Brucella* spp.

Foram obtidos dados negativos para infecção por *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Dos parasitos e bactérias diagnosticados nas capivaras, aqueles que podem infectar o homem são: *Fasciola hepatica*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* e *Brucella* spp. Desses, *Leptospira interrogans* representa o maior risco para a saúde pública. *Toxoplasma gondii* e *Brucella* spp apresentam risco virtualmente nulo para as pessoas que freqüentam a área de estudo.

A fasciolose apresenta potencial zoonótico na região de acordo com as variações da população de *Lymnaea* spp. e por essa razão é necessário a continuidade de ações em educação de saúde, principalmente para os grupos de risco.

## 7. PERSPECTIVAS

Estudos de dinâmica populacional de *Lymnaea* spp. nas águas do Parque Tingüi são necessários como medida epidemiológica de prevenção a surtos de fasciolose na região;

Para confirmar o papel da capivara como reservatório de *L. interrogans* serão necessários estudos que demonstrem direta ou indiretamente a bactéria na urina ou rins desse roedor;

Visando assegurar que as capivaras do parque Tingüi não eliminam cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. estudos de monitoramento são necessários. A contaminação da água com as fezes desses animais pode representar uma fonte de infecção importante para o homem e animais domésticos.



## REFERÊNCIAS

EL-KOUBA, M.M.A.N.; MARQUES, S.M.T.; PILATI, C.; HAMANN, W. Aspectos gerais da fasciolose e de endoparasitoses em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) de três parques no Paraná, Brasil. **Veterinária em Foco Canoas**, v. 6, n. 1, p. 4-15, jul./dez, 2008.

KIRCHHOFF, L.V.; VOTAVA, J.R.; OCHS, D.E.; MOSER, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **J Clin Microbiol.**, v. 34, n. 5, p. 1171-1175, 1996.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 90-98, 2004.

MIMORI, T.; SASAKI, J.; NAKATA, M.; GOMEZ, E.A.; UEZATO, H.; NONAKA, S.; HASHIGUCHI, Y.; FURUYA, M.; SAYA, H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. **Gene**, v.14, n. 2, p.179-186, 1998.

MUÑOZ, K.; CHÁVEZ, A. *Trypanosoma evansi* isolated from capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, n. 7., p. 945-946, 2001.

MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; MCLNTYRE, W.I.M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 325-326, 1977.

PINHEIRO, M.S.; POUHEY, J.L.O.F.; DEWANTIER, L.R.; GARCIA, C.A.N.; RODRIGUES, R.C.; SILVA, J.J.C. Avaliação de carcaça de fêmeas e machos inteiros de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) criados em sistema semi-intensivo. **Arch. Latinoam. de Produc. Anim.**, v. 15, n. 2, p. 52-57, 2007.

POESTER, E.P.; GONÇALVES, V.S.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 90, n.1-4, p.55-62, 2002.

REGINATTO, A.R.; FARRET, M.H.; FANFA, V.R.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. Protozoários gastrintestinais de capivara e cutia mantidas em cativeiro. **In: resumos 35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, n. 572-1, 2008.

ROCCO, M.; LUZ E. Fasciolose no Parque Municipal do Barigüi, Curitiba, Paraná. **Monografia apresentada à Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de especialista**, 2002.

SILVA NETO, P.B. Criação racional e comercial de animais silvestres. **J. SOS Mata Atlântica**, v. 7, n. 2, p. 3, 1995.

VARGAS, N.; SOUTO, R.P.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A.; ZINGALES, B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Exp Parasitol.**, v. 96, n.3, p.147-159, 2000.

VASCONCELOS, S.A. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Int. Leptosp. Soc. Barbados**, p. 62, 2002.

WOO, P.T.K. The haematocrite centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Trop.**, v. 27, p. 384–386, 1970.

## GLOSSÁRIO

**Agente etiológico:** é o agente causador ou responsável por uma doença. Pode ser vírus, bactéria, fungo, protozoário ou helminto. É sinônimo de “patógeno”.

**Agente infeccioso:** é o microorganismo (vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos) capaz de produzir infecção ou doença infecciosa.

**Cisto:** é a forma de resistência de certos protozoários, nos quais se encontra uma película ou cápsula protetora envolvendo uma forma capaz de reproduzir-se quando encontrar o ambiente adequado.

**Contaminação:** é a presença de um agente infeccioso na superfície do corpo, roupas, brinquedos, água, leite ou alimentos.

**Endemia:** é a prevalência usual de determinada doença, com relação a uma área, cidade, estado ou país. Representa o número esperado de casos em uma população, em determinado período de tempo.

**Epidemia:** é a ocorrência muito elevada de determinada doença, com relação a uma área, cidade ou país. Representa o número muito acima do esperado de casos em uma população, em determinado período de tempo.

**Epidemiologia:** é o estudo da distribuição e dos fatores determinantes da freqüência de uma doença; a epidemiologia trata de dois aspectos fundamentais: a distribuição (idade, raça, sexo, geografia) e os fatores determinantes da freqüência (tipo de patógeno, meio de transmissão, etc.); em resumo: estuda os fatores responsáveis pela existência ou aparecimento de uma doença ou outro evento.

**Estádio:** é fase intermediária ou intervalo entre duas mudas da larva de um artrópode ou helminto (em entomologia é sinônimo de instar). Ex.: larva de primeiro estágio, larva de terceiro estágio.

**Estágio:** é a fase de transição ou forma evolutiva de um organismo durante seu ciclo biológico. Ex.: estágio de ovo, estágio de larva, de pupa, de adulto.

**Fase aguda:** é a fase da doença que surge após a infecção onde os sinais clínicos são mais nítidos (febre alta, parasitemia elevada, etc.). É um período de definição: o paciente se cura, passa para a fase crônica ou morre.

**Fase crônica:** é a fase que se segue à fase aguda, na qual o paciente apresenta sinais clínicos mais discretos, havendo um certo equilíbrio entre os hospedeiros e o agente etiológico e, usualmente, a resposta imunológica é bem elevada.

**Fômite:** é representado por utensílios que podem veicular o agente etiológico entre diferentes hospedeiros. Ex.: roupas, seringas, espéculos, etc.

**Fonte de infecção:** é o objeto, o paciente ou local de onde o agente etiológico passa para novo hospedeiro ou novo paciente. Ex.: carne com cisticercose: teniose, etc.

**Hábitat:** é o ecossistema local ou órgão onde determinada espécie ou população vive. Ex.: o hábitat da capivara é formado pelo conjunto de águas lânticas, lagos, lagoas, rios e áreas de mata ou pastagem.

**Hospedeiro:** é o organismo que alberga o parasito.

**Hospedeiro definitivo:** é o que apresenta o parasito em sua fase de maturidade ou em fase de reprodução sexuada. Ex.: o hospedeiro definitivo do *Toxoplasma gondii* são os felídeos; os hospedeiros definitivos do *Neospora caninum* são os cães e coiotes.

**Hospedeiro intermediário:** é aquele que apresenta o parasito em sua fase larvária ou assexuada. Ex.: animais endotérmicos (aves e mamíferos) são hospedeiros intermediários de *Toxoplasma gondii*.

**Hospedeiro paratênico ou de transporte:** é o hospedeiro intermediário no qual o parasito não sofre desenvolvimento ou reprodução, mas permanece viável até atingir novo hospedeiro definitivo.

**Incidência:** é a frequência com que uma doença ou fato ocorre num período de tempo definido e com relação à população (casos novos, apenas).

**Infecção:** penetração e desenvolvimento ou multiplicação de um agente etiológico no organismo humano ou animal, podendo ser vírus, bactéria, protozoário, helminto, etc.

**Infecção assintomática:** presença do agente etiológico em um hospedeiro, sem aparecimento de qualquer sinal clínico.

**Infestação:** é o alojamento, desenvolvimento e reprodução de artrópodes na superfície do corpo, nas vestes ou na moradia de humanos ou de animais.

**Letalidade:** expressa o número de óbitos com relação a determinada doença ou fato, tendo como referência uma população. Ex.: 100% das pessoas não-vacinadas, quando atingidas pelo vírus rábico, morrem.

**Morbidade:** expressa o número de pessoas doentes com relação a uma doença e uma população. Ex.: na época do inverno, a morbidade da gripe é muito elevada; ou seja, na época do inverno a incidência da gripe é muito grande.

**Parasitemia:** presença de parasitos na corrente sanguínea. Ex.: na fase aguda da doença de Chagas, usualmente, a parasitemia é muito elevada.

**Parasitismo:** é a associação entre seres vivos onde existe unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados (o de maior porte ou hospedeiro) prejudicado pela associação.

**Parasito:** é o ser vivo que se associa a outro ser vivo, à custa e dependência deste. Pode ser: ectoparasito (vive extremamente no corpo do hospedeiro); endoparasito (vive dentro do corpo do hospedeiro).

**Parasito acidental:** é o que exerce o papel de parasito, porém habitualmente possui vida não-parasitária. Ex.: larvas de moscas que vivem em frutos ou vegetais em decomposição e acidentalmente atingem humanos.

**Parasito errático:** é o que vive fora do seu hábitat ou de seu hospedeiro normal.

**Parasito facultativo:** é o que pode viver parasitando um hospedeiro ou não, isto é, pode ter hábitos de vida livre ou parasitária. Ex.: as larvas de moscas Sarcophagidae podem provocar miíases humanas, desenvolver-se em cadáveres ou ainda fezes.

**Parasito heteroxênico:** é o que possui hospedeiro definitivo e intermediário.

**Parasito monoxênico:** é o que possui apenas o hospedeiro definitivo. Ex.: *Toxocara canis*, *Ancylostoma duodenale*.

**Parasito obrigatório:** é aquele incapaz de viver fora do hospedeiro. Ex.: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*.

**Parasito oportunista:** é aquele que usualmente vive no paciente sem provocar nenhum dano (infecção inaparente), mas em determinados momentos se aproveita da baixa resistência do paciente e desenvolve doenças graves.

**Período de incubação:** é o período decorrente entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos.

**Poluição:** é a presença de substâncias nocivas, especialmente químicas, mas não infectantes, contaminando o ambiente: ar, água, alimentos, etc.

**Prevalência:** termo geral utilizado para caracterizar o número total de casos de uma doença ou qualquer outra ocorrência numa população e tempo definidos (casos antigos somados aos casos novos).

**Profilaxia:** é o conjunto de medidas que visa à prevenção, erradicação ou controle de uma doença ou de um fato prejudicial aos seres vivos; as medidas profiláticas sempre dependem dos fatores epidemiológicos.

**Reservatório:** hospedeiro infectado que alberga o agente etiológico, sem manifestar sinais, porém capaz de transmiti-lo a outrem; vegetal, animal ou humano onde vive e multiplica-se um agente etiológico sem causar doença e do qual é capaz de atingir outros hospedeiros.

**Sinantropia:** é a habilidade de certos animais silvestres (mamíferos, aves, insetos) de freqüentar habitações humanas; isto é, são capazes de circular entre os ambientes silvestres, rural e urbano, muitas vezes, veiculando patógenos.

**Vetor:** é um artrópode, molusco ou veículo que transmite um parasito entre dois hospedeiros.

**Vetor biológico:** quando o agente etiológico se multiplica ou se desenvolve no vetor.

**Vetor mecânico:** quando o parasito não se multiplica ou se desenvolve no vetor, esse simplesmente serve de transporte ao parasito.

**Virulência:** é a severidade e rapidez com que um agente etiológico provoca lesões no hospedeiro.

**Zoonoses:** doenças que são naturalmente transmitidas entre humanos e animais vertebrados podendo dividir-se em: 1) anfixenose (doença que circula indiferentemente entre humanos e animais, isto é, tanto os animais como os humanos funcionam como hospedeiros do agente); 2) antropozoonose (doença primária de animais e que pode ser transmitida aos humanos); 3) zooantroponose (doença primária de humanos e que pode ser transmitida aos animais).

FONTE: NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica**. Editora Atheneu, São Paulo, Capítulo 61, p. 465-468, 2006.



# **ANEXO**

# The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features

Fabiano Montiani-Ferreira, Jesse Truppel, Mariana H. Tramontin, Ricardo G. D'Octaviano Vilani and Rogério R. Lange

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários, 1540, 80035-050, Curitiba – PR, Brazil

Address communications to:

Dr Fabiano Montiani-Ferreira

Tel.: 55 41 9969-6983

Fax: 55 41 9969-6983

e-mail: montiani@ufpr.br;

ferreir9@cvm.msu.edu

## Abstract

**Purpose** To carry out a descriptive investigation of the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) eye and to perform selected ophthalmic diagnostic tests with the aim of establishing normal physiological reference values for this species.

**Method** A total of 22 healthy, capybaras were used to test most of the parameters in this investigation. Ages varied from 2 to 4 years of age. Selected diagnostic ocular tests were performed including Schirmer tear test, tonometry using an applanation tonometer (Tonopen®), central corneal thickness using an ultrasonic pachymeter (Sonomed, Micropach®, Model 200P +), axial globe length and culture of the normal conjunctival bacterial flora.

**Results and discussion** Capybara's normal ocular features include: dorsal and ventral puncta, vestigial third eyelid, true cilia only at the upper eyelid margins. The bulbar conjunctiva is noticeably densely pigmented with a brown to bronze color. The capybara's pupil is oval in shape and vertical in position. No *tapetum lucidum* is present in this species and the retinal blood vessels are almost absent. Results for selected ocular diagnostic tests investigated were: Intraocular pressure:  $18.4 \pm 3.8$  mmHg; Schirmer tear test:  $14.9 \pm 5.1$  mm/min; Central corneal thickness:  $0.46 \pm 0.03$  mm; Axial globe length:  $22.20 \pm 1.71$  mm. No statistically significant differences between ages or genders were found for any of the results. *Corynebacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. were isolated from healthy conjunctiva, suggesting they are normal constituents of the conjunctival flora of the capybara eye. The corneal epithelium of the capybara possesses a thin and discrete Bowman's layer. Results and parameters obtained in this investigation exposed unique anatomic features of the capybara eye and will help veterinary ophthalmologists to more accurately diagnose discrete or unusual pathological changes of the capybara eye. Furthermore, corneal thickness and axial length of the capybara are similar to that of human beings, revealing that the world's largest living rodent might be an excellent biological model for ophthalmic studies.

**Key Words:** biometry, capybara, corneal thickness, *Hydrochaeris hydrochaeris*, intraocular pressure, normal conjunctival flora, rodentia, Schirmer tear test, ultrasonic pachymetry

## INTRODUCTION

Establishing normal parameters for ophthalmic tests for wild, exotic and laboratory animals constitutes an important scientific field for descriptive vision research. The eyeball and visual systems of several interesting species, especially neotropical animals, remain virtually unknown to many scientists. As an example, the current body of knowledge regarding the capybara eye is insufficient at best. The objectives of this investigation regarding the capybara eye are (1) describe selected anatomic and morphologic features; (2) present clinical parameters such as Schirmer tear test and

intraocular pressure (IOP); (3) report the mean corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry; (4) show biometric data of the eyeball, mostly obtained by B-mode ultrasonography; (5) document conjunctival bacterial and fungal flora and, lastly; (6) describe selected histologic features, with emphasis on the conjunctival and corneal tissues.

The capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) is a unique animal. It is the world's largest extant rodent with an average height at the shoulder being 50 cm. With its massive skull and vestigial tail, the capybara gives the appearance of an enormous guinea pig (Fig. 1). Capybaras are excellent swimmers and can remain submerged for several minutes.<sup>1</sup>



**Figure 1.** A male capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) at Tingui Park, Curitiba-PR. A bare, raised glandular area on top of the snout is perceptible, a feature that is only present in males.

They are vegetarians, eating grass on dry land as well as aquatic vegetation. In addition to the eyes and ears being set high on the head,<sup>2,3</sup> the adaptation to an aquatic lifestyle is continued by its feet. There are four semiwebbed toes on the forefeet and three on the hind feet. The name originally derives from the Guarani language *Kapijyva*, meaning 'lord of the grass.' In the sexually mature male a bare raised glandular area on top of the snout is conspicuous (Fig. 1). The dorsal regions of the capybara's body are typically reddish brown and the ventral regions are lighter. It is a typical and well-known wild animal of Brazil being present throughout the country, particularly at the Brazilian Pantanal. There are reports of its presence from Panama in Central America south into northern Argentina. Although the capybara's original range may have been more extensive, its current has been severely affected by hunting with certain populations having been eradicated. However, capybaras quickly adapt to conditions imposed by human beings, and it is not listed as an endangered species on either the International Union for Conservation of Nature (IUCN) or the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) lists. Regarding activity levels, capybaras can be diurnal or nocturnal depending on season and hunting pressure. Capybaras are found in areas with permanent standing or running water and can inhabit marshes or estuaries and live along rivers and streams.<sup>1,4</sup>

To the authors' knowledge, other than a few morphologic features, there is no further information regarding the anatomy, clinical parameters, and tests of the normal capybara eye in the literature.<sup>2,3</sup>

## MATERIALS AND METHODS

A total of 22 young adult capybaras were used for this investigation, including 12 females and 10 males ranging from 2 to 4 years of age. The capybaras used in this survey were all residents of the Tingui Park, Curitiba-PR, Brazil (25°25'S and 49°16'W), where they live among the park's

fresh-water islands for exhibition to the public. Capybaras were initially live-trapped and then chemically restrained as explained below. Physical examinations were performed by veterinarians, both local practitioners and veterinarians from the Federal University of Paraná (UFPR), before ocular examinations to exclude animals with indications of systemic disease. A complete ophthalmic examination including slit-lamp biomicroscopy and direct and indirect ophthalmoscopy was performed prior to this investigation to exclude capybaras presenting with ophthalmic disease conditions. The following measurements or procedures were performed: Schirmer tear test, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness, B-mode ultrasonographic biometry and microbiological analysis of the conjunctival sac.

Additionally, during the year of 2007 the Animal Pathology Service at Federal University of Paraná (UFPR) received 3 adult dead capybaras, 2 females and 1 male, which had been either attacked by dogs or hit by cars in the metropolitan region of Curitiba-PR. These capybaras had no apparent eye lesions and were used to investigate normal histologic features of the ocular surface as well as to validate biometric data obtained with B-mode ultrasonography in live animals.

When applicable, statistical analyses of the measurements including a complete descriptive statistical analysis, simple linear correlation and *t*-tests (when comparing two groups of data) were performed using the computer software JMP, version 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Data were deemed significant when  $P < 0.05$  and are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

### *Chemical restraint*

Chemical restraint was used to immobilize the animals for clinical data acquisition. Using estimated weights of each animal, the following drugs were individually calculated and administered concurrently: (1) 3 mg/kg of a fixed-ratio combination of zolazepam/tiletamine (Zoletil<sup>®</sup>, Virbac, Carros, France); (2) 0.3 mg/kg of morphine (Dimorf<sup>®</sup>, Cristalia, Itapira-SP, Brazil); (3) 1.2 mg/kg of Azaperone (Destress<sup>®</sup>, Serra-ES, Brazil). The drug doses were all mixed in the same dart and then administered intramuscularly by the use of a blow gun. The range of body weights of the animals immobilized varied from 37 to 63 kg, with the majority of animals weighing approximately 50 kg.

The same team of investigators performed the ocular tests, examinations and measurements each time a capybara was captured. In addition to the chemical restraint, sterile topical anesthetic (proparacaine hydrochloride 0.5% ophthalmic solution USP, Alcon Laboratories, Forth Worth, TX) was instilled after the Schirmer tear test and swabs of conjunctival sac for microbiological culture were taken, but before ultrasonographic, IOP and CCT measurements were taken. All procedures using capybaras were conducted in accordance with the humane principles set forth in the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

*Eye examination*

The anterior ocular structures of all 22 capybaras were evaluated using a transilluminator and slit lamp biomicroscope (Kowa SL-14; Kowa, Tokyo, Japan). Palpebral fissure length and horizontal corneal diameters were measured in both eyes using Jameson calipers. Indirect ophthalmoscopy (Heine Omega 180 Headworn Binocular Indirect Ophthalmoscope, Dover, NH) was performed on 10 eyes (five capybaras).

*Schirmer tear test*

To minimize tear evaporation and other potential influences of the systemic anesthetics used, sterile Schirmer tear test (STT) standardized strips (Schering-Plough Animal Health, Union, NJ) were used immediately after the administration of the chemical restraint to measure lacrimal gland production in all 22 capybaras. This test was also performed prior to the instillation of any topical anesthetic to avoid influencing the results. The procedure described and performed in the present investigation was the Schirmer type I test, which measures the basal plus potentially a portion of the reflex tear secretion.

*Intraocular pressure*

IOP was measured by applanation tonometry using a Tonopen<sup>®</sup> XL (Mentor, Norwell, MA). Three final IOP readings with variances of < 5% on the Tonopen XL<sup>®</sup> were obtained and averaged for each eye in all capybaras.

*Central corneal thickness*

Central corneal thickness was measured in all 22 capybaras using an ultrasonic pachymeter (Micropach<sup>®</sup> Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY), with the speed of sound in the cornea preset at 1640 m/s.

*B-mode ultrasonographic biometry*

B-mode scan ultrasonography was performed on each of the 22 capybaras examined using an Aloka SSD 500 B-mode system (Aloka Corporation, Tokyo, Japan). The B-scan 7.5-MHz probe was gently applied perpendicularly to the center of the cornea using ultrasonic transmission gel (Aquasonic-100, Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ). Care was taken during probe placement to avoid corneal indentation. Reflected ultrasonic waves were captured. Optimal positioning was confirmed when the posterior wall of the eye globe could be clearly visualized on the B-scan ultrasonogram and the image appeared symmetrical and the reflections from the four principal landmarks (cornea, anterior lens surface, posterior lens surface and retinal surface) along the eye globe axis were perpendicular (Fig. 4). The optimal image was frozen on the screen and then all biometric measurements were then taken. Two electronic cursors were placed on the B-scan image to capture each of the measurements, namely: cornea-anterior lens capsule (CALC); anterior-posterior lens capsule (APLC) (Fig. 4); posterior lens capsule-retinal surface (PLCRS); and lastly, cornea-retinal surface (CRS).

*Microbiological analysis*

Sterile swabs were used to collect samples from the conjunctival sac of both eyes of 20 capybaras (10 males and 10 females) for microbiological analysis. No topical anesthetic was used prior to swabbing the cornea for culture, as this may interfere with the growth of organisms.<sup>5</sup> Chronologically, this procedure was performed directly after STT measurements. Sterile gloves were used for the STT measurement (using sterile standardized strips) on each animal and maximum care was taken to avoid contamination prior to sample collection for microbiologic analysis. Swabs were immediately sent in Stuart medium to the Basic Pathology Microbiology Laboratory at the Basic Sciences Sector – UFPR, Curitiba-PR, Brazil. Culture of the microorganisms was performed in BHI broth (brain-heart infusion), and on blood agar and MacConkey plates, which were incubated at 37 °C in an aerobic environment for 24 to 48 h. The same bacterial growth media used in this research was also used elsewhere to establish normal conjunctival flora of the opossum, raccoon and ferret in other investigations.<sup>6,7</sup> Bacterial colonies were identified by Gram's stain and standard procedures.

*Gross examination of fixed tissue and histology*

The eyes of three capybaras that died of injuries were examined histologically. Immediately after the arrival of the carcasses, only a few hours after death, bilateral enucleation was performed. The vitreous chamber of the enucleated eye was infused with approximately 0.3 mL of 10% buffered formalin and then immersed in formalin for 1 week. Once adequately fixed, the eye was sectioned in the sagittal plane for gross and histologic evaluation, with particular attention paid to the conjunctiva and cornea. The optic disc diameter was measured using a Jameson caliper. Following dehydration through graded ethanol, the eye tissues were embedded in paraffin and sectioned in 5 µm thick slices. Conjunctival and corneal tissue sections were then mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff (PAS) and Gomori's trichrome before the histological analysis.

**RESULTS**

All continuous numeric data obtained for all ophthalmic tests in the population used in this investigation were normally distributed according to the Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit Test. Table 1 contains the condensed results of the descriptive statistical analyses.

*Morphological features of the normal capybara eye*

Ophthalmic examinations revealed that the normal anterior ocular structures in the capybara include dorsal and ventral puncta as well as a rather vestigial third eyelid that did not cover the whole surface of the eye when traction was applied at its margin with forceps. Additionally, capybaras possess true cilia (eyelashes) only at the upper eyelid margins and no cilia at the lower eyelid margins (Fig. 2). The bulbar

**Table 1.** Results obtained for selected ophthalmic diagnostic tests for the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) eye

Ocular tests or biometric data	Mean value	Standard deviation	95% confidence interval
Schirmer tear test (mm/minute)	14.97	4.66	13.02–16.91
Intraocular pressure (mmHg)	16.47	4.28	14.68–18.25
Palpebral fissure length (mm)	26.35	2.33	25.32–27.37
Horizontal corneal diameter (mm)	17.3	1.23	16.78–17.81
Central corneal thickness (mm)	0.483	0.027	0.471–0.494
Anterior chamber depth CALC (mm)	4.6	1.35	4.03–5.16
Lens thickness APLC (mm)	7.41	0.7	7.11–7.70
Vitreous chamber depth PLCRS (mm)	10.13	0.88	9.73–10.46
Axial length of the eye bulb CRS (mm)	22.2	1.71	21.48–23.0



**Figure 2.** Normal appearance of the eyelids and ocular surface of the capybara. Note the presence of cilia on the upper eyelid only. Also note the brown pigmentation of the bulbar conjunctiva.

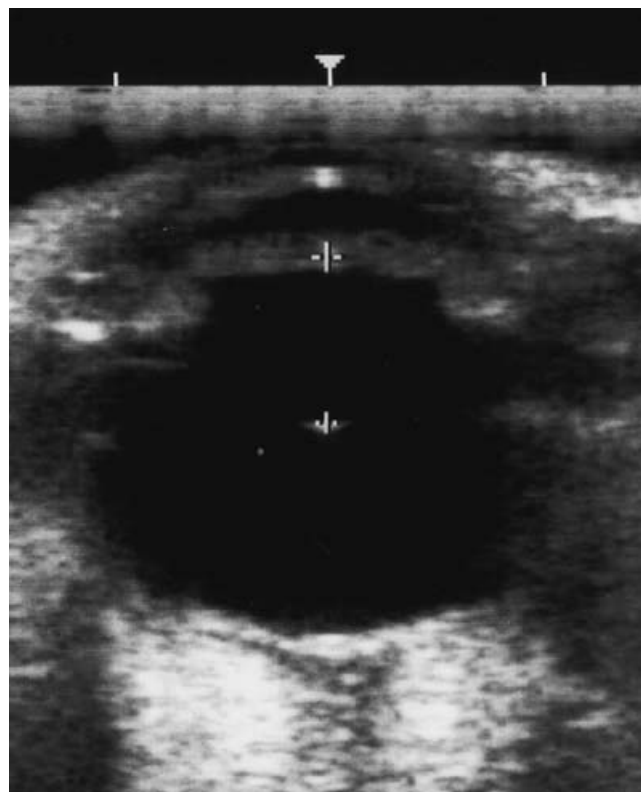
conjunctiva near the limbus is noticeably densely pigmented with a brown to bronze color (Fig. 2). Mean horizontal corneal diameter of both eyes was  $17.3 \pm 1.23$  mm. The mean horizontal palpebral fissure length of both eyes was  $26.35 \pm 2.33$  mm. Iris colors varied among the individuals examined, but were all various shades of brown (Figs. 2 and 3). The capybara has a pupil that is oval in shape and vertical in position (Fig. 3). When fully dilated, the pupil becomes circular. As viewed by the ophthalmoscope, it is evident that there is no *tapetum lucidum* and the retinal blood vessels are almost absent as there are only scarce (2 or 3) minute blood vessels that emanate from the optic disc and extend only a short distance beyond it. Heavy brown choroidal pigmentation covered with a network of choroidal vessels is the predominant feature of the capybara fundus. The optic disc is circular with a small central pit with dimension of about 1/20th of the normal disc size.

#### Schirmer tear test

No significant Schirmer tear test differences were determined between right and left eyes or between genders. Mean Schirmer tear test results for both eyes was  $14.97 \pm 4.66$  mm/min.



**Figure 3.** Note the light brown color of the iris in this representative specimen. Also note that the capybara has a pupil that is oval in shape and vertical in position.



**Figure 4.** B-scan ultrasonogram after optimal positioning was achieved. The four principal landmarks (cornea, anterior lens surface, posterior lens surface and retinal surface) along the eye bulb axis are all perpendicular. Here in this representative example two electronic cursors (white crosses) were placed on the B-scan image to capture anterior-posterior lens capsule (APLC) distance.

#### Intraocular pressure

No significant IOP differences were determined between right and left eyes or genders. The mean IOP was  $16.47 \pm 4.28$  mmHg.

### Central corneal thickness

No significant central corneal thickness (CCT) differences were determined between right and left eyes. In our investigation CCT differed slightly, but not significantly ( $P = 0.054$ ) between male and female capybaras. The mean CCT for the adult male was  $0.478 \pm 0.024$  mm and for female capybaras it was  $0.487 \pm 0.028$  mm. Mean central corneal thickness of both sexes was  $0.483 \pm 0.027$  mm. A positive correlation ( $P = 0.0001$ ) was found between weight (kg) and central corneal thickness.

### B-mode ultrasonographic biometry

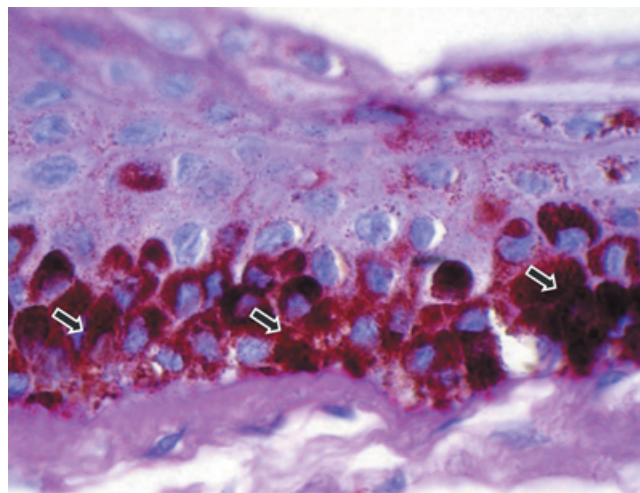
No significant biometric differences were determined between right and left eyes or between genders. The mean axial eye globe length was  $22.20 \pm 1.71$  mm. Mean anterior chamber depth (axial chamber length) was  $4.60 \pm 1.35$  mm. Mean lens thickness (axial length) was  $7.41 \pm 0.7$  mm. Mean vitreous chamber depth (axial chamber length) was  $10.13 \pm 0.88$  mm.

### Microbiological analysis

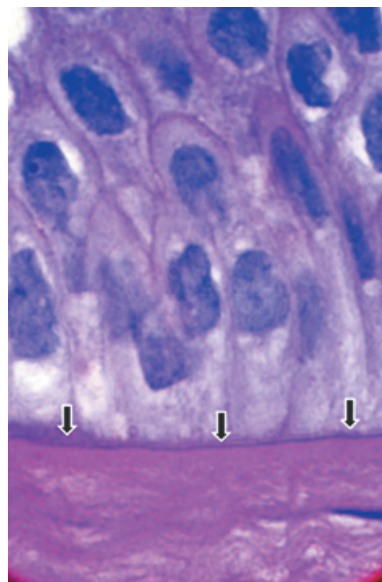
Four different Gram-positive bacterial species were identified in microbiological samples from 34 out of 40 eyes. The genera of the isolates were: *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* and *Staphylococcus* sp. A single genus of bacteria was isolated from 19 eyes. Two genera of bacteria were isolated from nine eyes. Three genera of bacteria were isolated from six eyes. *Corynebacterium* sp. was the most common bacteria isolated, being present in 18 eyes (prevalence of 29%). *Micrococcus* sp. was the second most common bacteria isolated, being present in 17 eyes (prevalence of 27.4%). *Bacillus* sp. was present in 11 eyes (prevalence of 17.74%) and, lastly, *Staphylococcus* sp. was present in 10 eyes (prevalence of 16.13%). Gram-negative bacteria were not isolated from any of the capybaras' eyes.

### Gross examination of fixed tissue and histology

The mean optic nerve diameter on fixed eye globes was  $2.07 \pm 0.11$  mm. The histological evaluation of the conjunctiva revealed a stratified epithelium composed of seven to eight layers of cells. Goblet cells were intermingled with the epithelial cells as in most other animal species. A distinctive histological feature present in all capybara eyes examined was the presence of a large number of cytoplasmic melanin granules of the deepest three to four layers of the conjunctiva, particularly the basal cell layer (Fig. 5). The corneal epithelium consisted of a stratified squamous epithelium of 9–10 cell layers. An additional conspicuous and interesting histologic feature is the presence of a thin and discrete Bowman's layer located between the corneal epithelium and stroma (Fig. 6). A well-formed trabecular meshwork was noticed in all eyeballs. In two samples an iris process extending from the base of the iris surface to the peripheral end of the cornea was observed. The anterior iris stroma and choroid, the latter in particular, are very rich in melanocytes. An extensive and heavily pigmented ciliary body was also



**Figure 5.** A photomicrograph of the capybara's stratified conjunctival epithelium, which is composed of 7 to 8 layers of cells. Note the presence of large numbers of cytoplasmic melanin granules in the deepest 3 to 4 layers of the conjunctiva, particularly the basal cell layer (arrows). Stain: Gomori's trichrome. Magnification:  $\times 400$ .



**Figure 6.** A photomicrograph of the capybara's corneal epithelium that has a thin and discrete Bowman's layer (below the arrows). Stain: PAS. Magnification:  $\times 1000$ .

present in all samples examined. The anterior iris pigment epithelium was thinner than the posterior. The anterior lens capsule was thick. Posterior to the lens equator the lens capsule was thinner and there was no lens epithelium beneath. The overall organization and the layering of the retina were also assessed in these transverse sections. All retinal nuclear and synaptic layers from the photoreceptors to the ganglion cells showed a typical mammalian pattern. More distinctive characteristics noticed in this species are the inner plexiform layer (IPL) being thicker than the outer nuclear layer (ONL)

and the nerve fiber layer (NFL) decreasing in thickness at the periphery of the retina.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The natural habitats of many neotropical animals are being destroyed in developing nations. Many species are, in fact, considered threatened or even in danger of extinction.<sup>8</sup> Many of these endangered species have unique eye shapes, sizes, and elegant mechanisms for vision, which have not yet been described by scientists. If action is not taken soon, a number of potentially interesting biologic models for comparative ophthalmic studies will be permanently lost in the near future. Thus, basic descriptive ophthalmic research, particularly for neotropical wild animals, is becoming an urgent and increasingly important field of science.

The vestigial third eyelid present in the capybara is similar to that of the Canadian beaver.<sup>9</sup> This investigation showed that capybara cilia are absent on the lower eyelid, which is identical to dogs. The pupil is oval in shape and vertically oriented, which is in agreement with what two other authors previously described in classic comparative ophthalmology literature,<sup>2,3</sup> and in opposition with one author,<sup>10</sup> who failed to observe this feature and described this species as having a circular pupil. Curiously, most rodents have pupils that are predominantly circular both when dilated and constricted, with the only exceptions being the marmot, ground squirrel, coipu, degu, chinchilla, and the capybara, all of which have vertically oriented pupils in the constricted state.<sup>2,3,10</sup>

The retinal vascular patterns of rodents vary enormously in the various suborders, ranging from anangiomatic to holoangiomatic.<sup>2,3</sup> The capybara has a fundus pattern resembling that of the American beaver and chinchilla.<sup>2,3,9</sup> This pattern has already been labeled as a pseudoangiomatic, atapetal type,<sup>2</sup> in contrast to the rat's pattern, that has a holoangiomatic retina with arterioles and venules that radiate from the optic disc<sup>2</sup> like spokes on a bicycle wheel.

The Schirmer tear test (STT) is an important component of the complete ophthalmic examination in mammals for evaluating lacrimal gland function. A number of wild and exotic mammal species have been evaluated to establish normal physiological parameters for this clinical test.<sup>11-19</sup> The normal STT value had not been established for capybaras until the present investigation. In nonanesthetized guinea pigs median STT values before anesthetic administration were 3 mm/min (range, 0 to 12 mm/min), much lower than capybaras.<sup>19</sup> Higher values were encountered in nonanesthetized chinchillas with a mean value of  $20.00 \pm 7.8$  mm/min.<sup>12</sup>

During the last several years a number of investigations of normal intraocular pressures (IOP) values were reported for numerous domestic, exotic and wild animal species, but the capybara was not included in these studies.<sup>19-29</sup> Tiletamine, which was used as a sedative in the capybaras in this study, belongs to the drug family of cyclohexamines (phencyclidine and its derivatives, including ketamine). In one study in cats, it was shown that ketamine increases IOP but tiletamine

does not.<sup>25,26</sup> It is unknown whether the anesthetic drugs zolazepam, morphine and azaperone used in combination with tiletamine in the present investigation influenced the IOP and STT results. However, the capybara, a large-sized wild rodent, will always require some form of sedation to permit a thorough ophthalmic examination unless it is severely debilitated. Mean values for STT and IOP were already previously reported in other sedated wild and exotic animals, even after sedation with ketamine.<sup>9,12,23</sup> Because the combination of these different anesthetics used in the present investigation are so popularly used in wild species, we believe that these normal ranges for STT and IOPs will be useful for detection of ocular disease by wildlife personnel and veterinarians working with capybaras at zoos, public parks, and wildlife programs such as live-trapping for their relocation. The mean IOP for capybaras ( $16.47 \pm 4.28$  mmHg), was in a range similar to the anesthetized American beaver ( $17.11 \pm 6.39$  mmHg), another wild rodent already investigated. For comparison, normal mean IOPs measured by applanation tonometry and reported for nonanesthetized laboratory rodents are:  $12.36 \pm 0.32$  mmHg for the mouse,<sup>27</sup>  $18.5 \pm 4.2$  mmHg for the chinchilla,<sup>28</sup>  $13.9 \pm 4.2$  mmHg for the rat<sup>29</sup> and  $18.27 \pm 4.55$  mmHg for the guinea pig.<sup>19</sup>

Ultrasonic corneal pachymetry is the most accurate and reliable *in vivo* method currently available to measure corneal thickness in animals and human beings.<sup>30</sup> Mean central corneal thickness (CCT) acquired with an ultrasonic pachymeter has been the subject of a number of reports investigating the cornea of several domestic, exotic and wild animals.<sup>30-44</sup> Nevertheless, CCT has never been measured in the normal capybara eye. In our investigation CCT was not significantly different ( $P = 0.054$ ) between male and female capybaras. The mean CCT for the adult male ( $0.478 \pm 0.024$  mm) and female capybaras ( $0.487 \pm 0.028$  mm) were considerably thicker than in rats ( $0.156 \pm 0.03$  mm)<sup>43</sup> but similar to that found for adult human beings ( $0.467 \pm 0.040$  mm).<sup>44</sup>

Biometric data of the eye globe using A- and B-mode ultrasonography were reported in a number of species, but this feature was not previously investigated in the capybara.<sup>45-57</sup> Just as observed in dog eyes studied by B-mode ultrasonography,<sup>57</sup> we found that capybara axial globe length, lens thickness, and chamber depths were not significantly different according to the eye (left or right) studied or gender.

The statistical range of measurements obtained for the axial length of the capybara eye (1.91 to 27.0 mm; 95% confidence interval = 21.48–23.0 mm) observed in the population studied was remarkably similar to the axial eye globe dimension of the adult Caucasian human being, which also ranges from 21 to 27 mm.<sup>58,59</sup> This proximity in axial length is an interesting feature considering the use of the capybara eye as a comparative model in the future. Conventional laboratory rodents have a much smaller axial globe length:  $5.15 \pm 0.23$  mm for the rat,<sup>60</sup>  $2.981 \pm 0.005$  mm for the mouse<sup>61</sup> and  $10.17 \pm 0.03$  mm for the guinea pig.<sup>62</sup>

The capybara's lens is thicker than that of adult human beings ( $4.24 \pm 0.06$ ),<sup>63</sup> but is similar to the dog ( $6.7 \pm 1.0$  mm).<sup>64</sup> The mouse and rat lens thicknesses are  $2.07 \pm 0.19$  mm and  $2.81 \pm 0.20$  mm, respectively.<sup>65</sup> The small numeric value for the lens thickness of both, mouse and rat, might be misleading. The fact is that the mouse lens for instance is proportionally massive due to its small sized eye.<sup>66</sup> A rodent with a larger eye and a proportionally thinner lens might be interesting for experimental intraocular manipulations such as subretinal injections, in future investigations.

Normal conjunctival bacterial flora has been studied in several wild mammals.<sup>6,7,67-70</sup> In the vast majority of these reports, Gram-positive bacteria were the most common isolates and the present report is no exception. It is important to mention that the investigators had only one chance to chemically restrain each animal and, thus, only one chance to measure all possible ocular parameters. We believe that in order to obtain STT values and conjunctival flora at the same ocular examination the best option was to perform STTs before conjunctival swabs. If microbiology swabs were performed before STTs, this would certainly affect the latter tests invalidating the results. Therefore, conjunctival swabs for bacterial cultures were collected after the eyelid margins have already been breached with a sterile STT strip. It would be safe to point out that even though each STT strip was sterile and maximum care was taken to avoid contamination during measurements, it is often hard to maintain complete sterility in field conditions. Therefore, the element of contamination is still a possibility. However, this order of tests has been followed in a previous investigation with no apparent contamination. For instance, results obtained for normal bacterial flora obtained in this manner for ferrets<sup>7</sup> were similar to those reported by other investigators.<sup>23</sup>

It was possible to conclude that the heavy brown appearance of the capybara conjunctiva is due to the large amount of melanin granules present at the deepest cell layer of the conjunctival epithelium. One hypothesis for the evolutionary development of conjunctival pigmentation in this species might be the amount of sun exposure it continually receives in their natural environment. Taking into account that capybaras evolved in tropical areas receiving a considerable amount of direct sun rays when grazing at open fields as well as direct plus water surface-reflected sun rays when swimming with its eyes constantly at the water level, it is plausible to consider that these cytoplasmic melanin granules of the deepest layers of the conjunctiva appeared as a protective mechanism for ultraviolet radiation. Furthermore, capybaras should be added to the list of Bowman's layer possessing species such as primates (including human beings), some species of deer, birds, the rat, and the giraffe.<sup>71,72</sup> The remaining capybara ocular histologic features follow the typical mammalian pattern, with some rodent morphologic trends, mainly concerning basic iris and lens histology.<sup>66</sup> The authors plan to perform more detailed investigations, including an anatomical description on the bony orbit and a histomorphometric study of the capybara eye globe in the future.

The normal anatomic features, clinical parameters, and test values obtained in this investigation will help veterinary ophthalmologists to more accurately diagnose discrete pathological changes and hopefully further the current understanding about the capybara eye.

Capybaras are very large rodents that are generally known to reproduce readily in captivity given the necessary space and the correct habitat.<sup>4</sup> The mean capybara's eye globe size and central corneal thickness (CCT) are almost identical to that of human beings. Moreover, capybaras possess a Bowman's layer at the corneal epithelium, an important feature shared with human beings. These shared characteristics suggest capybaras could be used as a biological model for ophthalmic research in the future, including refraction studies, clinical and/or surgical experiments.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr Gillian Shaw, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA, as well as Prof Felipe Caron and Prof Tilde Fróes, UFPR, Curitiba-PR, Brazil, for their invaluable help in this investigation and in the preparation of this manuscript.

#### REFERENCES

1. Redford KH, Eisenberg JF. *Mammals of the Neotropics. The Southern Cone*. The University of Chicago Press, Chicago, IL, 1992; 435.
2. Johnson GL. Contributions to the comparative anatomy of the mammalian eye, chiefly based on ophthalmoscopic examination. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B* 1901; **194**: 1-82.
3. Prince JH. *Comparative Anatomy of the Eye*. Charles C Thomas, Springfield, 1956; 418.
4. Burnie D, Wilson DE. *Animal*. Dorling Kindersley, London, 2001; 624.
5. Mullin GS, Rubinfeld RS. The antibacterial activity of topical anesthetics. *Cornea* 1997; **16**: 662-665.
6. Pinar CL, Brightman AH, Yeary TJ et al. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Disease* 2002; **38**: 851-855.
7. Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HHA. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 209-213.
8. Valladares-Padua C. Importance of knowledge-intensive economic development to conservation of biodiversity in developing countries. *Conservative Biology* 2006; **20**: 700-701.
9. Cullen CL. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6**: 279-284.
10. Walls GL. *The Vertebrate Eye*. Hafner Publishing Co, New York, 1963.
11. Ofri RIH, Horowitz S, Jacobson Kass PH. Tear production in lions (*Panthera leo*): the effect of two anesthetic protocols. *Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1997; **7**: 173-175.
12. Montiani-Ferreira F. Ophthalmology. In: *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. (eds Fowler ME, Cubas Z) Iowa State Press, Ames, IA, 2001; 437-456.
13. Ofri R, Horowitz I, Kass PH. Tear production in three captive wild herbivores in Israel. *Journal of Wildlife Disease* 1999; **35**: 134-136.



14. Ofri R, Horowitz IH, Raz D *et al.* Intraocular pressure and tear production in five herbivorous wildlife species. *Veterinary Record* 2002; **151**: 265–268.
15. Tuntivanich P, Soontornvipart K, Tuntivanich N *et al.* Schirmer tear test in clinically normal Asian elephants. *Veterinary Research Communications* 2002; **26**: 297–299.
16. Jaax GP, Graham RR, Rozmiarek H. The Schirmer tear test in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Laboratory Animal Science* 1984; **34**: 293–294.
17. Maitchouk DY, Beuerman RW, Ohta T *et al.* Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. *Archives of Ophthalmology* 2000; **118**: 246–252.
18. Hartley C, Williams DL, Adams VJ. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 53–57.
19. Coster ME, Stiles J, Khrone SG *et al.* Results of diagnostic ophthalmic testing in healthy guinea pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008; **232**(12): 1825–1833.
20. Ofri R, Horowitz IH, Kass PH. Tonometry in three herbivorous wildlife species. *Veterinary Ophthalmology* 1998; **1**: 21–24.
21. Ofri R, Horowitz IH, Kass PH. How low can we get? Tonometry in Thomson Gazelle (*Gazella thomsoni*). *Journal of Glaucoma* 2000; **9**: 187–189.
22. Sapienza JS, Porcher D, Collins BR *et al.* Tonometry in clinically normal ferrets (*Mustela putorius furo*). *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1991; **1**(291): 294.
23. Murcia MML, Guerra AH. Ocular findings in 22 adult ferrets (*Mustela putorius furo*) (abstract). International Veterinary Ophthalmology Meeting: European College of Veterinary Ophthalmologists, European Society of Veterinary Ophthalmologists. Dortmund Kreis (German Eye Panel) Munich, Germany 2004. *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**: 425–435.
24. Bito LZ, Merritt SQ, DeRousseau CJ. Intraocular pressure of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). I. An initial survey of two free-breeding colonies. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1979; **18**: 785–793.
25. Hahnenberger RW. Influence of various anesthetic drugs on the intraocular pressure of cats. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1976; **199**: 179–186.
26. Antal M, Mucsi G, Faludi A. Ketamine anesthesia and intraocular pressure. *Annals of Ophthalmology* 1978; **10**: 1281–1284.
27. Reitsamer HA, Kiel JW, Harrison JM *et al.* Tonopen measurement of intraocular pressure in mice. *Experimental Eye Research* 2004; **78**(4): 799–804.
28. Peiffer RL, Johnson PT. Clinical ocular findings in a colony of chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Laboratory Animal* 1980; **14**(4): 331–335.
29. Moore CG, Milne ST, Morrison JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1993; **34**(2): 363–369.
30. Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *American Journal of Veterinary Research* 1991; **10**: 1570–1572.
31. Korah S, Thomas R, Muliylil J. Comparison of optical and ultrasound pachymetry. *Indian Journal of Ophthalmology* 2000; **48**: 279–283.
32. Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *American Journal of Veterinary Research* 1991; **10**: 1570–1572.
33. Korah S, Thomas R, Muliylil J. Comparison of optical and ultrasound pachymetry. *Indian Journal of Ophthalmology* 2000; **48**: 279–283.
34. Stapleton S, Peiffer R. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research* 1979; **40**: 1803–1804.
35. Gwin RM, Lerner I, Warren JK *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1982; **22**: 267–271.
36. Montiani-Ferreira F, Petersen-Jones S, Cassotis N *et al.* Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6**: 19–22.
37. Montiani-Ferreira F, Cardoso F, Petersen-Jones S. Postnatal development of central corneal thickness in chicks of *Gallus gallus domesticus*. *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**: 37–39.
38. Ramsey DT, Hauptman JG, Petersen-Jones SM. Corneal thickness, intraocular pressure, and optical corneal diameter in Rocky Mountain Horses with cornea globosa or clinically normal corneas. *American Journal of Veterinary Research* 1999; **60**: 1317–1321.
39. Plummer CE, Ramsey DT, Hauptman JG. Assessment of corneal thickness, intraocular pressure, optical corneal diameter, and axial globe dimensions in Miniature Horses. *American Journal of Veterinary Research* 2003; **64**: 661–665.
40. Osuobeni EP, Hamidzada WA. Ultrasonographic determination of the dimensions of ocular components in enucleated eyes of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Research Veterinary Science* 1999; **67**: 125–129.
41. Ollivier FJ, Brooks DE, Komaromy AM *et al.* Corneal thickness and endothelial cell density measured by non-contact specular microscopy and pachymetry in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with laser-induced ocular hypertension. *Experimental Eye Research* 2003; **76**: 671–677.
42. Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 326–329.
43. Zagon IS, Sassani JW, McLaughlin PJ. Insulin treatment ameliorates impaired corneal reepithelialization in diabetic rats. *Diabetes* 2006; **55**(4): 1141–1147.
44. Kawana K, Tokunaga T, Miyata K *et al.* Comparison of corneal thickness measurements using Orbscan II, non-contact specular microscopy, and ultrasonic pachymetry in eyes after laser in situ keratomileusis. *British Journal of Ophthalmology* 2004; **88**: 466–468.
45. Ekestén B, Torrang I. Age-related changes in ocular distances in normal eyes of Samoyeds. *American Journal of Veterinary Research* 1995; **56**: 127–133.
46. Schiffer SP, Rantanen NW, Leary GA *et al.* Biometric study of the canine eye, using A-mode ultrasonography. *American Journal of Veterinary Research* 1982; **43**: 826–830.
47. Cottrill NB, Banks WJ, Pechman RD. Ultrasonographic and biometric evaluation of the eye and orbit of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1989; **50**: 898–903.
48. Gaiddon J, Rosolen SG, Steru L *et al.* Use of biometry and keratometry for determining optimal power for intraocular lens implants in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1991; **52**: 781–783.
49. Williams DL. Lens morphometry determined by B-mode ultrasonography of the normal and cataractous canine lens. *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**: 91–95.
50. Hamidzada WA, Osuobeni EP. Agreement between A-mode and B-mode ultrasonography in the measurement of ocular distances. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 1999; **40**: 502–507.
51. Rogers M, Cartee RE, Miller W *et al.* Evaluation of the extirpated equine eye using B-mode ultrasonography. *Veterinary Radiology* 1986; **27**: 24–29.
52. Plummer CE, Ramsey DT, Hauptman JG. Assessment of corneal thickness, intraocular pressure, optical corneal diameter, and axial globe dimensions in Miniature horses. *American Journal of Veterinary Research* 2003; **64**: 661–665.

53. Gilger BC, Davidson MG, Howard PB. Keratometry, ultrasonic biometry, and prediction of intraocular lens power in the feline eye. *American Journal of Veterinary Research* 1998; **59**: 131–134.
54. Fernandes A, Bradley DV, Tigges M *et al.* Ocular measurements throughout the adult life span of rhesus monkeys. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003; **44**: 2373–2380.
55. Kurtz D, Manny R, Hussein M. Variability of the ocular component measurements in children using A-scan ultrasonography. *Optometry and Vision Science* 2004; **81**: 35–43.
56. Hernández-Guerra AM, Rodilla V, López-Murcia MM. Ocular biometry in the adult anesthetized ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology* 2007; **10**: 50–52.
57. Tuntivanich N, Petersen-Jones SM, Steibel JP *et al.* Postnatal development of canine axial globe length measured by B-scan ultrasonography. *Veterinary Ophthalmology* 2007; **10**: 2–5.
58. Oliveira C, Harizman N, Girkin CA *et al.* Axial length and optic disc size in normal eyes. *British Journal of Ophthalmology* 2007; **91**: 37–39.
59. Ip JM, Huynh SC, Kifley A *et al.* Variation of the contribution from axial length and other oculometric parameters to refraction by age and ethnicity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2007; **48**: 4846–4853.
60. Mutti DO, Zadnik K, Murphy CJ. The effect of continuous light on refractive error and the ocular components of the rat. *Experimental Eye Research* 1998; **67**: 631–636.
61. Barathi VA, Boopathi VG, Yap EP, *et al.* Two models of experimental myopia in the mouse. *Vision Research* 2008; **48**: 904–916.
62. Bantseev V, Oriowo OM, Giblin FJ *et al.* Effect of hyperbaric oxygen on guinea pig lens optical quality and on the refractive state of the eye. *Experimental Eye Research* 2004; **78**: 925–931.
63. Dubbelman M, van der Heijde GL, Weeber HA. The thickness of the aging human lens obtained from corrected Scheimpflug images. *Optometry and Vision Science* 2001; **78**: 411–416.
64. Williams DL. Lens morphometry determined by B-mode ultrasonography of the normal and cataractous canine lens. *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**: 91–95.
65. Lei B, Yao G. Spectral attenuation of the mouse, rat, pig and human lenses from wavelengths 360 nm to 1020 nm. *Experimental Eye Research* 2006; **83**: 610–614.
66. Smith RS, John SWM, Nishina PM *et al.* *Systematic Evaluation of the Mouse Eye: Anatomy, Pathology, and Biometrics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001; 384.
67. Davidson HJ, Vestweber JG, Brightman AH *et al.* Ophthalmic examination and conjunctival bacteriologic culture results from a herd of North American bison. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; **215**: 1142–1144.
68. Dubay SA, Williams ES, Mills K *et al.* Bacteria and nematodes in the conjunctiva of mule deer from Wyoming and Utah. *Journal of Wildlife Diseases* 2000; **36**: 783–787.
69. Andrew SE, Nguyen A, Jones GL *et al.* Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6**: 45–50.
70. Tuntivanich P, Soontornvipart K, Tuntivanich N *et al.* Conjunctival microflora in clinically normal Asian elephants in Thailand. *Veterinary Research Communications* 2002; **26**: 251–254.
71. Merindano MD, Costa J, Canals M *et al.* A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationships with other constituent corneal structures. *European Journal of Anatomy* 2002; **6**: 133–139.
72. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *Journal of Morphology* 2002; **254**: 247–258.