SAMIRA COSTA-SILVA

**Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do
Brasil**

São Paulo

2016

SAMIRA COSTA-SILVA

**Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do
Brasil**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração

Patologia Experimental e Comparada

Orientador

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3300
FMVZ

Costa-Silva, Samira
Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do Brasil / Samira Costa-Silva. -- 2016.
77 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Toxoplasmose. 2. Cetáceos. 3. Imuno-histoquímica. 4. Lesões. I. Título.

São Paulo, 02 de março de 2016
CEUA N 2551070114

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: José Luiz Catão Dias

Área: Patologia Experimental E Comparada

José Luiz Catão Dias (orientador)

Título do projeto: "Pesquisa de Toxoplasma gondii em mamíferos marinhos do Brasil".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 26/fevereiro/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Adequação do título para maior objetividade e clareza do objeto do estudo.".

Comentário da CEUA: **.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45656-2	Data da Emissão: 03/02/2015 12:41	Data para Revalidação*: 04/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Samira Costa da Silva	CPF: 100.140.327-40
Título do Projeto: PESQUISA DE Toxoplasma gondii EM CETÁCEOS DA COSTA BRASILEIRA: ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	projeto de mestrado	08/2014	02/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	José Luiz Catão Dias	Orientador	029.597.888-00	8914397-8 SSP-SP-SP	Brasileira
2	Juliana Marigo	pesquisador	255.015.058-94	28136736x SSP-SP	Brasileira
3	Katia Regina Groch	Pesquisadora	739.751.419-72	9080491955 SSP POA-RS	Brasileira
4	Leonardo Liberali Wedekin	pesquisador	025.613.789-77	3617035 SSP-SC	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	LAGUNA	SC	laguna	Fora de UC Federal
2		SC	Florianópolis	Fora de UC Federal
3		BA	Caravelas	Fora de UC Federal
4		SP	Litoral de São Paulo	Fora de UC Federal
5		CE	todo litoral do ceará	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93213321

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: COSTA-SILVA, Samira

Título: Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do Brasil

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Às mulheres da minha vida,
Avós Zenila e Maria; a minha mãe e a minha
filha.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. José Luiz Catão Dias, por toda a ajuda, infinitas conversas, pela paciência e toda admiração que eu tenho por ter me orientado ao longo desses dois anos de forma tão atenciosa. Espero um dia ser como você.

À Professora Dra. Eliana Reiko Matushima quem me incentivou a tentar o mestrado na USP, e me mostrou um caminho no momento em que estava perdida.

Aos funcionários da biblioteca Virginie Buff D'Apice sempre dispostos em ajudar, em especial à Elza Faquim, que mesmo de longe me auxiliou para que tudo ocorresse bem durante a finalização desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório de histopatologia, Luciano e Cláudio, obrigado pela paciência, pela disponibilidade e pelos ensinamentos.

Aos amigos lapconianos: Pedro Navas, Pablo Felipe Cruz, Arícia Benvenuto, Eduardo Ferreira Machado, Camila Molina, Catia Dejuste, Cláudia Niemeyer, Fabíola Prioste, Jorge Oyakawa, Kátia Groch, Marco Gattamorta, Ralph Vanstreels, Silmara Rossi, Gilbert Alvarado, e Valéria Ruoppolo. É um orgulho poder fazer parte dessa equipe.

Aos amigos que fiz durante o mestrado aos quais tenho um enorme carinho: Carol Ewbank, Laura Reisfeld, Angélica Sarmiento, Luciana Torres, Carlos Sacristán, Marcelo Carvalho, Sândara Squario e Juliana Marigo, Vocês são muito queridos! Muito obrigada por fazerem dessa jornada um momento tão gratificante, pessoal e profissionalmente. Ter a oportunidade de trabalhar com vocês foi um privilégio e espero que se repita mais vezes.

A minha família que sempre me apoiou nos meus sonhos mais estranhos. Agradeço especialmente meu pai, pelo apoio financeiro e incentivo aos estudos, esse trabalho também é para você! A minha querida mãe que acreditava nos meus sonhos mais do que eu, você sempre estará perto de mim. A minhas tias Mariza e Marília que sempre fizeram o papel de tia e as vezes de mãe, ao longo dos anos a vocês meu amor e carinho.

Ao meu querido Leo, por ser assim tão especial e por todo companheirismo, incentivo, carinho e amor. Te amo!

Aos meus sogros, Arlete e Nelson, por todo carinho e apoio, nesse e em tantos outros momentos, sem a ajuda de vocês não teria conseguido. Muito obrigada!

As minhas queridas Camille, Nara e Lu pelas risadas, bom papo e carinho que sempre tiveram por mim. As minhas irmãs Mele e Nina por estarem sempre tão presentes mesmo a longas distâncias.

Aos meus cunhados Alessandro e Franco por estarem sempre presentes.

As amigas Dani Nunes, Dany Vasconcelos, de sempre e para sempre, que fazem parte de quem sou e sem vocês eu não seria nem um décimo de mim.

Aos amigos Andressa D'agostim, Milton Marcondes, Vavá, Adriana Colosio, Mari Neves, Letícia, Rafael Naval, Bianca Romeu, Rodrigo Gavini, Mayra Bandeira, Sérvulo Bernardo, Italo Florest, Franco Rosa, Renata Barreto, Paulo Rogério e Sofia, por tantas risadas e momentos de descontração fora da patologia e dos nomes científicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a conclusão desta dissertação. Muito obrigado!

RESUMO

COSTA-SILVA, S. **Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do Brasil.** [Survey of *Toxoplasma gondii* in marine mammals from Brazil]. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A toxoplasmose é causada pelo protozoário coccídio *Toxoplasma gondii* e consiste em um dos processos parasitários mais comuns entre os animais endotérmicos. A presença desse protozoário em cetáceos pode estar associada à exposição dos animais aos oocistos de *T. gondii* eliminados pelas fezes de felídeos e/ou contato com solo contaminado com o parasita, que tenham comprometido a água do mar a partir de drenagens fluviais e fluentes ou ainda pelo escoamento de água de navios. O objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência de *T. gondii* em cetáceos encalhados, ou provenientes de captura acidental, ou que vieram a óbito durante o processo de reabilitação ou cativeiro, ao longo da costa brasileira, valendo-se para tanto de avaliações histopatológicas e de técnicas imuno-histoquímicas (IHQ). Os principais órgãos examinados foram fígado, pulmão, linfonodos, baço e cérebro. Esse estudo avaliou tecidos de 186 exemplares de 21 espécies diferentes de cetáceos da costa brasileira entre 1988 e 2014, cujas amostras foram encaminhadas e encontram-se depositadas no Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos, do Laboratório de Patologia Comparada dos Animais Selvagens (LAPCOM) do Departamento de Patologia, FMVZ-USP. Dos mamíferos marinhos analisados, a ocorrência de *T. gondii* foi confirmada em 1,1% (2/186), justificada pela presença de pelo menos um cisto em pulmão e/ou fígado. Os animais positivos pertenciam a duas espécies diferentes, provenientes do sudeste do Brasil; um golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) encalhado vivo no Rio de Janeiro - RJ, e uma orca (*Orcinus orca*) proveniente de cativeiro. As principais observações histopatológicas encontradas foram hepatite necrotizante, broncopneumonia fibrinosa supurativa com presença de cistos compatíveis com *T. gondii*, pneumonia broncointersticial fibrinosa

com carneificação, glomerulonefrite membranosa e linfadenite necrótica. Devido à severidade das lesões suspeita-se que esse protozoário teve um importante papel no encalhe/óbito desses dois indivíduos. Esse estudo acrescentou duas novas espécies de cetáceos àquelas já reportadas como suscetíveis à infecção pelo protozoário, mas nunca antes descritos no Brasil. Os resultados ratificaram a ocorrência da infecção por *T. gondii* em cetáceos da costa brasileira e a sua importância em mamíferos marinhos em cativeiro e de vida livre.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Cetáceos. Imunohistoquímica. Lesões.

ABSTRACT

COSTA-SILVA, S. **Survey of *Toxoplasma gondii* in marine mammals from Brazil.** [Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos do Brasil]. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Toxoplasmosis is caused by the coccidian *Toxoplasma gondii* - phylum Apicomplexa, which is one of the most common parasites affecting endothermic animals. The presence of *T. gondii* in cetaceans may be associated with feline feces and/or soil contaminated with the parasite, which may reach water bodies through run-off. This study investigated the occurrence of *T. gondii* in cetaceans along the Brazilian coast. Tissue samples of 186 individuals stranded along the Brazilian coast between 1988 and 2014, belonging to 21 species of cetaceans and currently part of the Marine Mammal Tissue Bank of the Laboratory of Comparative Pathology, Pathology Department, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo. Immunohistochemistry (IHC) for *T. gondii* was performed using formalin-fixed, paraffin embedded tissue sections of liver, lung, lymph nodes, spleen and brain. Infected tissues of a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) were used as positive controls. A total of 1.1 % (2/186) of the animals evaluated were positive, which was justified by the presence of least one cyst in one of the evaluated organs/tissues. These specimens belong to two different species of cetaceans: Killer whale (*Orcinus orca*) and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), both from southeastern Brazil. One individual stranded alive in Rio de Janeiro (*T. truncatus*); and one was kept in captivity (*O. orca*) in São Paulo state. The most noteworthy lesions observed through microscopy included necrotizing hepatitis, fibrinous suppurative bronchopneumonia with cysts compatible with *T. gondii*, bronchointerstitial fibrinous pneumonia, membranous glomerulonephritis and necrotizing lymphadenitis. Due to the severity of lesions protozoan was suspected to have an important role in the stranding/death of the two wild individuals. This study added two new species of cetaceans to those already reported as susceptible to infection by *T. gondii*, never before described in Brazil. These results confirm the occurrence of *T. gondii* infection in cetaceans from

the Brazilian coast and the importance of this parasite to marine mammals kept in captivity and free ranging dolphins.

Keywords: Toxoplasmosis. Cetaceans. Immunohistochemistry. Lesions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principal diferença entre misticetos e odontocetos	24
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 3 - Mapa de distribuição das instituições de pesquisa onde foram realizadas as colheitas das amostras que contribuíram para a realização do presente trabalho	43
Figura 4 - Mapa da distribuição dos animais testados e respectivos resultados para o exame imuno-histoquímico	45
Figura 5 - Fotomicrografia de tecidos de <i>Orcinus orca</i> , caso MM#452, HE. A Rim: glomérulo nefrite membranosa, 40x; B: glomerulite 100x. C e D: Pulmão, broncopneumonia fibrinosupurativa hemorrágica, 40x e 100x	47
Figura 6 - Fotomicrografia de tecidos de <i>Orcinus orca</i> , caso MM#452 HE. A: Pulmão, broncopneumonia fibrinosupurativa hemorrágica com presença de cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> , (seta) 200x; B: detalhe do cisto e do exsudato inflamatório (seta), 400x. C e D: Fígado, hepatite necrotizante multifocal, 40x e 100x. E e F: Linfonodo, linfadenite necrótica multifocal supurativa, 100x e 200x.	48
Figura 7 - Fotomicrografia, IHQ. A: controle positivo da imuno-histoquímica para anticorpo policlonal anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , Adrenal 800x, <i>Sotalia guianensis</i> (caso originalmente descrito por Gonzales-Viera et al, 2012). B e C: <i>Orcinus orca</i> caso MM#452, contra-coloração com hematoxilina de meyer marcação positiva em fígado 200x e pulmão, 400x.....	50
Figura 8 - Fotomicrografia, <i>Tursiops truncatus</i> , caso MM#178, HE. A: Fígado, hepatite necrotizante multifocal, 40x; B: detalhe do infiltrado inflamatório, 100x. C: Pulmão, broncopneumonia fibrinosa, 40x; D: Pulmão, área de carneificação (asterisco), 100x	52
Figura 9 - Fotomicrografia, IHQ. A: <i>Sotalia guianensis</i> , caso MM#075, controle positivo da imuno-histoquímica para anticorpo policlonal anti- <i>Toxoplasma</i>	

<i>gondii</i> <i>Sotalia guianensis</i> (caso originalmente descrito por Gonzales-Viera et al, 2012)., Adrenal 1200x. <i>Tursiops truncatus</i> caso MM#178. B: Fígado 200; C: Fígado, 400x	53
---	----

Quadro 1 - Relatos de estudos e ocorrência de <i>Toxoplasma gondii</i> em cetáceos, distribuídos em função das espécies estudadas, método diagnóstico e preferência de habitat (quadro possui linhas na horizontal e vertical)	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Instituições que contribuíram com a cessão de material biológico, distribuídas em função da localização geográfica e número de amostras fornecidas.....	40
Tabela 2 - Nomes científicos, porcentagem e o total de cada espécie incluída nesse estudo.....	42

NOMES POPULARES E LISTA DE ESPÉCIES

Pinipedes

Arctocephalus australis..... Lobo-marinho-do sul

Misticetos

Megaptera novaeangliae..... Baleia-jubarte

Odontocetos

Cephalorhynchus hectori..... Golfinho-de-hector

Delphinus sp. Golfinho-comum

Globicephala macrorhynchus..... Baleia-piloto-de-nadadeira-curta

Grampus griseus..... Golfinho-de-risso

Inia geoffrensis..... Boto-rosa-da-Amazônia

Kogia breviceps..... Cachalote-pigmeu

Kogia sima..... Cachalote-anão

Lagenodelphis hosei..... Golfinho-de-Fraser

Mesoplodon europaeus Baleia-bicuda-de-gervais

Orcinus orca..... Orca

Peponocephala Electra..... Golfinho-cabeça-de-melão

Physeter macrocephalus..... Baleia-cachalote

Pontoporia blainvillei..... Toninha

Sotalia guianensis..... Boto-cinza

Stenella clymene Golfinho-de-clímene

Stenella coeruleoalba..... Golfinho-listrado

Stenella frontalis..... Golfinho-pintado-do Atlântico

Stenella longirostris..... Golfinho-rotador

Steno bredanensis..... Golfinho-de-dentes-rugosos

LISTA DE ABREVIATURAS

AQUASIS	Associação de Pesquisa e Conservação de Ecossistemas Aquáticos
IPEC	Instituto de Pesquisas de Cananéia
GEMARS	Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande
MO	Museu Oceanográfico da FURG
FURG	Universidade Federal de Rio Grande
BIOPESCA	Projeto BIOPESCA Praia grande
MAQUA	Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores Prof. Isabel Gurgel
IBJ	Instituto Baleia Jubarte
IHQ	Imuno-histoquímica
BTMM	Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos
PAS	Ácido periódico de Schiff
CGR	Centro Golfinho Rotador
PBF	Projeto Baleia Franca
CRAM	Centro de Recuperação de Animais Marinhos
UNIVILLE	Universidade de Joinville
MM	Mamíferos Marinhos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	MAMÍFEROS MARINHOS.....	23
2.1.1	Aspectos biológicos adaptativos e habitat	24
2.2	TOXOPLASMOSE E <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.3	TOXOPLASMOSE E <i>Toxoplasma gondii</i> EM MAMÍFEROS MARINHOS	28
3	OBJETIVO	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	CASOS SELECIONADOS.....	38
4.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
4.3	HISTOPATOLÓGICO	39
5	RESULTADOS.....	42
6	DISCUSSÃO	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO.....	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

Golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*)

Fonte: (COSTA-SILVA,S., 2014)

1 INTRODUÇÃO GERAL

A fragmentação e degradação de habitat tem sido um importante fator no aumento do contato entre animais domésticos, humanos e animais selvagens. Em alguns casos, o estreitamento desse contato pode levar a declínios populacionais de animais selvagens e um incremento da ocorrência de patógenos nas populações acometidas (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000, 2001; PATZ et al., 2000). Os estudos sobre doenças emergentes e patógenos no ambiente marinho, incluindo aqueles relacionados com os mamíferos marinhos, em especial os cetáceos, vem crescendo ao longo das últimas décadas no Brasil (NERY; ESPÉCIE; SIMÃO, 2008; DAURA-JORGE; SIMOES-LOPES, 2011; SANTOS et al., 2011; GROCH et al., 2012, 2014; GONZALES-VIERA et al., 2013, 2015). Essas informações são obtidas principalmente a partir de animais que encalharam mortos ou por avaliações dos bancos de imagens para foto-identificação.

Dentre as principais doenças emergentes reportadas em cetáceos, a toxoplasmose destaca-se e ganha atenção de pesquisadores em todo o mundo (SUNDAR et al., 2008; VAN BRESSEM et al., 2009; DI GUARDO et al., 2010, 2011; MAZZARIOL et al., 2012; GONZALES-VIERA et al., 2013).

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo protozoário coccídio do filo Apicomplexa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), relatado pela primeira vez no Brasil e na Tunísia em 1908 (MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009a,b). Essa doença é um dos processos parasitários mais comuns entre os animais endotérmicos (DUBEY et al., 2004) e calcula-se que esse parasita infecta aproximadamente 25% da população mundial humana (JONES; KRUSZON-MORAN; WILSON, 2003). Devido a sua importância tanto na medicina humana quanto veterinária, o *T. gondii* é, possivelmente, o coccídio mais bem estudado no mundo (DUBEY, 2010).

Nos mamíferos marinhos, em especial os exclusivamente aquáticos como, por exemplo, os cetáceos, a ocorrência de *T. gondii* requer uma avaliação especial e mais detalhada do que a efetuada para os mamíferos terrestres imunocompetentes, devido a três fatores principais: 1) esse patógeno pode levar espécies de cetáceos à

óbito (DUBEY, 2010), e ser uma importante causa primária de encalhe (GONZALES-VIERA et al., 2012); 2) a via de infecção ainda é desconhecida devido ao fato da maioria dos mamíferos marinhos beber pouca ou nenhuma água (GERACI, 1986; DUBEY, 2007); e 3) a infecção dos mamíferos marinhos por oocistos de *T. gondii* pode ser uma ferramenta para a avaliação da contaminação dos ecossistemas marinhos (DUBEY, 2010).

Acredita-se que a via de infecção pode estar associada a ambientes marinhos poluídos e geralmente próximos à costa. Desta forma, a presença do *T. gondii* nos cetáceos pode estar relacionada à fezes de gatos, ou solo contaminados com oocistos, que tenham comprometido a água do mar a partir de drenagens fluviais, efluentes contaminados e até mesmo a partir da água escoada de navios (VAN BRESSEM et al., 2009).

Alguns estudos mostram que a ocorrência de toxoplasmose em cetáceos poderia estar associada a coinfeção com outros agentes imunossupressores, tal como morbillivírus (DOMINGO et al., 1992; KENNEDY, 1998; MAZZARIOL et al., 2012). Porém, *T. gondii* já foi descrito como o agente causador da morte primária em três espécies de golfinhos: golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) (DI GUARDO et al., 2010), golfinho-de-hector (*Cephalorhynchus hectori*) na Nova Zelândia (ROE et al., 2013), e em um espécime de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na costa brasileira (GONZALES-VIEIRA et al., 2013), sendo assim um potencial fator de mortalidade e para o encalhe dessa infra-ordem em diversas localidades, incluindo o Brasil.

Apesar do avanço nas pesquisas relacionadas a esse patógeno em mamíferos marinhos, o conhecimento geral disponível ainda é limitado e sabe-se pouco a respeito de diversos aspectos da infecção por esse parasita e da correspondente enfermidade. Desta forma, investigações e estudos nestes temas são prementes e necessários para a melhor compreensão deste processo. Além disso, as informações a respeito de causas de mortalidade relacionadas a doenças infecciosas de etiologia parasitárias são consideradas como ação prioritária no Plano de Ação Nacional para a Conservação de Mamíferos Marinhos.

O presente trabalho teve o intuito de contribuir para o conhecimento existente à respeito desse patógeno nos animais encalhados na costa brasileira. Para tanto, foram utilizadas amostras do Banco de Tecido de Mamíferos Marinhos (BTMM) do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), do

Departamento de Patologia (VPT), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Ainda, estudou-se também amostras biológicas de cetáceos mantidos em cativeiro e oportunisticamente submetidos à necrópsia no VPT. Até onde podemos averiguar, esse é o primeiro estudo de investigação sistemática sobre a ocorrência desse patógeno em mamíferos marinhos no Brasil, assim como de sua correlação às causas de morte destes animais encalhados ao longo da costa brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Golfinho-comum (*Delphinus* sp)

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MAMÍFEROS MARINHOS

Os mamíferos marinhos são animais placentários (Classe Mammalia) que se adaptaram total ou parcialmente ao ambiente marinho (REYNOLDS III; ODELL; ROMMEL, 1999). Eles se dividem em três ordens, Carnívora, Sirenia e Certactiodactyla (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2014).

Dentro da ordem Carnívora existem cinco famílias que são consideradas mamíferos marinhos e se derivam evolutivamente dos ursídeos e mustelídeos terrestres (REYNOLDS III; ODELL; ROMMEL, 1999). As famílias Phocidae (focas, 18 espécies), Otariidae (lobos-marinhos e leões-marinhos, 15 espécies) e Odobenidae (morsas, três espécies) são as três famílias em que todos os espécimes são considerados carnívoros marinhos. Além dessas três famílias, a Ursidae tem uma espécie representante dentre os mamíferos marinhos (urso-polar), enquanto a Mustelidae possui quatro espécies que são consideradas mamíferos aquático e uma considerada marinha. A ordem Sirenia (dugongo e peixes-boi) é composta por quatro espécies (*Dugong dugong*, *Trichechus manatus*, *Trichechus inunguis* e *Trichechus senegalensis*), e uma espécie extinta na década de 1960 e conhecida como vaca-marinha-de-steller (*Hydrodamalis gigas*). A ordem Certactiodactyla (antiga ordem Cetacea) inclui cerca de 90 espécies de cetáceos em todo o mundo. Esta ordem é composta, graças à sua proximidade filogenética, os cetáceos e os artiodátilos (REYNOLDS III; ODELL; ROMMEL, 1999; COMMITTEE ON TAXONOMY, 2014). Os cetáceos, por sua vez são divididos em duas subordens: os mysticetos ou baleias verdadeiras, são as que possuem placas queratinizadas (barbatanas) na inserção da maxila; e os odontocetos, que são os cetáceos que possuem dentes (RICE, 2009) (Figura 1). Os odontocetos possuem todos os dentes iguais (homodontes) e podem variar a quantidade e o formato dos mesmos dentre as diferentes espécies (GERACI; LAUNDSBURY, 2005).

Figura 1 - Principal diferença entre misticetos e odontocetos

Fonte: <http://www.oocities.org/maquaticos/cetaceos.htm> e <http://www.noelife.it/dettaglio-articolo/169/lecolocalizzazione-degli-odontoceti.php>

Legenda: As placas queratinizadas (barbatanas) são característica da subordem dos misticetos entretanto a presença de dentes é característica nos odontocetos, que são homeodontes e podem variar a quantidade e o formato dos dentes entre as diferentes espécies. Fonte: Geraci e Loundsbury, 2005.

No Brasil já foram registradas 45 espécies de cetáceos, divididas em 36 espécies de odontocetos e 8 espécies de misticetos (LODI; BOROBIA, 2013). Com relação à ordem Carnívora, apesar do Brasil não ter colônias reprodutivas, existem relatos de aparecimento de pelo menos três espécies de focídeos: foca-leopardo-antártica (*Hydrurga leptonyx*); elefante-marinho-do-sul (*Mirounga leonina*); e foca-caranguejeira (*Lobodon carcinophagus*), além de quatro espécies de otarídeos: leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*); lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*); lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*); lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazela*) (ICMBIO, 2011). Registros da ordem Sirenia no Brasil incluem duas espécies, o peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus manatus*) e o peixe-boi-amazônico (*T. inginus*) (LUNA; PASSAVANTE, 2010).

2.1.1 Aspectos biológicos adaptativos e habitat

Os mamíferos marinhos passaram por uma série de adaptações ao ambiente aquático (ROMMEL e LOWENSTINE 2001). Segundo Reynolds III, Odell e Rommel (1999) e Rice (2009), os cetáceos e os sirênios, dentre os mamíferos, são aqueles totalmente adaptados ao ambiente aquático, devido ao fato de viverem todas as fases de vida nesse ambiente.

Os cetáceos, em especial, foram os que sofreram mais modificações, como perda da cintura pélvica e dos membros posteriores, ganhando uma estrutura que sustenta a nadadeira caudal, chamada de pedúnculo caudal; a presença de uma estrutura formada de gordura na parte rostral da cabeça, chamada de melão; nos odontocetos as narinas externas se juntaram formando uma abertura única localizada no topo da cabeça; a ausência de glândulas anexas na epiderme que, juntamente com a presença de uma espessa camada de gordura (*blubber*) fez com que a pele desses animais tivesse uma consistência macia. Alguns cetáceos possuem uma nadadeira dorsal situado na linha média da região dorsal formada com um tipo tecido conjuntivo flexível não muscular que ajuda na estabilização da hidrodinâmica (ROMMEL; LOWENSTINE, 2001; REIDENBERG, 2007).

Além das adaptações externas os mamíferos marinhos sofreram adaptações nos órgãos internos, como rins, pulmões, gônadas e ouvidos. Os rins desses animais são formados por uma série de rins pequenos e independentes chamados de renículos. O número destes varia de acordo com a espécie (PABST; ROMMEL; MCLELLAN, 1999). Os pulmões possuem cartilagem e esfíncteres musculares ao redor dos bronquíolos terminais (PISCITELLI et al., 2013). As gônadas ficam dentro da cavidade abdominal, porém ocorreu uma adaptação no tipo de circulação dessa região deixando os testículos 1 a 2 °C mais frio do que o resto do corpo, de forma semelhante ao que ocorre nos mamíferos terrestres (ROMMEL; PABST; MACLELLAN, 1998).

A maioria das espécies de mamíferos marinhos é gregária. Apenas algumas espécies vivem solitárias, enquanto outras vivem em grupos apenas durante períodos específicos, como o reprodutivo, e em agregações para alimentação (JEFFERSON; WEBBER; PITMAN, 2009). Particularmente, os estudos com cetáceos mostram que esses animais possuem comportamentos, distribuição e uso de habitats específicos que variam de acordo com cada espécie (WEDEKIN; DAURA-JORGE; SIMÕES-LOPES, 2004; ROSSI-SANTOS; WEDEKIN; MONTEIRO-FILHO, 2007; DAURA-JORGE; INGRAM; SIMÕES-LOPES, 2013; WEDEKIN et al., 2014).

Algumas populações de odontocetos possuem uma área de vida bem estudada, e devido a sua fidelidade àquela área são consideradas residentes desses locais. Caravelas (BA) (ROSSI-SANTOS; WEDEKIN; MONTEIRO-FILHO, 2007), baía de

Sepetiba (RJ), (NERY; ESPÉCIE; SIMÃO, 2008), baía de Guanabara (RJ) (AZEVEDO et al., 2004) e baía Norte (SC) (FLORES; BAZZALO, 2004; WEDEKIN, 2007), são exemplos de populações de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) que usam um ambiente restrito de habitat próximo à costa. Outro exemplo de população considerada residente é a de golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) de Laguna - SC (SIMÕES-LOPES; FABIAN, 1999).

2.2 TOXOPLASMOSE E *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma infecção que tem como agente etiológico o *Toxoplasma gondii*, um protozoário coccídio, do filo Apicomplexa. A primeira descrição desse parasita ocorreu em 1908 pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux (MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009 a) que descreveram a infecção por esse parasita em gundis (*Ctenodactylus gundi*) de vida livre. Duas semanas após essa descrição o pesquisador Splendore, no Brasil, descreveu a morfologia do parasita em coelhos de laboratório (MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009b). Acredita-se que a toxoplasmose seja um dos processos parasitários mais comum entre os animais endotérmicos (DUBEY et al., 2004). Calcula-se que esse parasita infecta aproximadamente 25% da população mundial humana (JONES; KRUSZON-MORAN; WILSON, 2003). Por conta de sua importância, tanto na medicina humana quanto veterinária, acredita-se que o *T. gondii* seja o coccídio mais bem estudado no mundo (DUBEY, 2008). Atualmente a toxoplasmose é reconhecida em humanos como a doença mais prevalente em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

O ciclo do *T. gondii* é bem conhecido e está bastante esclarecido, tanto nos hospedeiros definitivos quanto na maioria dos intermediários (DUBEY; JONES, 2008). O *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felinos domésticos e selvagens, que eliminam oocistos nas fezes, e acredita-se que todos os animais endotérmicos possam ser hospedeiros intermediários (ELMORE et al., 2010). O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo (Figura 2), sendo que existem três formas

infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (existentes nos oocistos) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998, DUBEY, 2010).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: (Adaptado de GARDINER; FAYER; DUBEY, 1998; CATÃO-DIAS, EPIPHANIO; KIERULFF, 2013).

Existem três principais vias de transmissão, que incluem: infecção congênita, ingestão de água ou alimentos contaminados pelo oocisto esporulado, e ingestão de tecidos infectados. Outras formas de infecções menos frequentes incluem transfusão sanguínea e transplantes de órgãos (DUBEY; JONES, 2008). Em algumas ordens animais, incluindo os mamíferos marinhos, a via de transmissão não está clara.

As principais lesões causadas pelo *T. gondii* estão associadas aos taquizoítos. Devido a sua rápida replicação dentro da célula hospedeira, os taquizoítos levam à ruptura da célula infectada ocasionando a necrose dos tecidos comprometidos (CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Em algumas espécies, por exemplo cães, gatos e porcos domésticos, as alterações patológicas estão presentes principalmente em filhotes ou em adultos com o sistema imune comprometido, visto que, na maioria dos animais adultos, a resposta ao parasita geralmente é efetiva e limita a multiplicação dos taquizoítos (ELMORE et al., 2010; CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Nestes casos, as alterações observadas geralmente são pneumonia intersticial difusa, miocardite, hepatite necrotizante, meningoencefalomielite, linfadenites e miosites (BROW; BARKER; BARKER, 2007; CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Ainda, a toxoplasmose é uma causa importante de abortos em animais de produção (ovelhas, porco e cabras) (KLEVAR, 2007; INNES, 2010).

2.3 TOXOPLASMOSE E *Toxoplasma gondii* EM MAMÍFEROS MARINHOS

Existem relatos de toxoplasmose ou infecção por *T. gondii*, em mamíferos marinhos desde a década de 70, com a primeira descrição em um espécime de boto-cinza (*Sotalia guianensis*), na baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (BANDOLI; OLIVEIRA, 1977). Nos mamíferos marinhos, a ocorrência de *T. gondii* requer uma avaliação especial, principalmente nos cetáceos e sirênios pois estes são exclusivamente aquáticos (REYNOLDS III; ODELL; ROMMEL, 1999). Diferente do que ocorre com os animais endotérmicos terrestres imunocompetentes, existem três principais fatores relevantes que merecem uma abordagem mais específica: 1) diversamente do que ocorre com a grande maioria dos mamíferos, esse patógeno pode levar algumas espécies de cetáceos à óbito (DUBEY, 2010) e ser uma importante causa primária de encalhe desses animais sem que haja outros fatores imunossupressores (DI GUARDO et al., 2010; GONZALES-VIEIRA et al., 2013); 2) a forma de infecção ainda é desconhecida devido ao fato da maioria dos mamíferos marinhos beber pouca ou nenhuma água e se alimentarem de animais ectodérmicos

(GERACI, 1986; DUBEY et al., 2007); e 3) a infecção por oocistos de *T. gondii*, nos mamíferos marinhos pode servir como uma importante ferramenta para avaliar os ecossistemas marinhos (DUBEY, 2010).

A infecção pelo *T. gondii* já foi diagnosticada em várias espécies de cetáceos, seja os mantidos em cativeiro ou de vida livre. O Quadro 1 apresenta as espécies para as quais existem relatos na literatura especializada.

Quadro 1 - Relatos de estudos e ocorrência de *Toxoplasma gondii* em cetáceos, distribuídos em função das espécies estudadas, método diagnóstico e preferência de habitat (quadro possui linhas na horizontal e vertical).

(Continua)

ESPÉCIES	NOME COMUM	MÉTODO DIAGNÓSTICO	PREFERÊNCIA DE HABITA □	REFERÊNCIAS
<i>Sotalia guianensis</i>	Boto-cinza	Histopatológico	Costeiros	BANDOLI; OLIVEIRA, 1977
<i>Stenela longirostris</i>	Golfinho-rotador	IHQ	Oceânicos	MIGAKI; SAWA; DUBEY, 1990
<i>Tursiops truncatus</i>	Golfinho-nariz-de-garrafa	M.E.; IHQ e sorologia	Oceânicos e costeiros	INSKEEP et al., 1990 CRUISKSHANK et al., 1990, DUBEY et al., 2009, e PROFETA, et al., 2015
<i>Delphinapterus leucas</i>	Baleia-beluga	Sorologia; IHQ	Oceânicos e costeiros	MIKAELIAN et al., 2000
<i>Grampus griseus</i>	Golfinho-de-risso	IHQ	Oceânico	RESENDES et al., 2002
<i>Tursiops aduncus</i>	Golfinho-nariz-de-garrafa	IHQ	Costeiro	JARDINE; DUBEY, 2002
<i>Sousa chinensis</i>	Golfinho-corcunda	IHQ	Costeiro	BOWATER, 2003
<i>Globicephala melas</i>	Golfinho-cabeça-de-melão	Sorologia	Oceânico	CABEZÓN et al., 2004
<i>Orcinus orca</i>	Baleia-orca	Sorologia	Oceânico e costeiros	MURATA et al., 2004 e OMATA, et al., 2006

(Conclusão)

Espécies	Nome comum	Método diagnóstico	Preferência de habitat ☐	Referências
<i>Delphinus delphis</i>	Golfinho-comum	Sorologia	Oceânico e costeiros	FORMAM et al., 2009
<i>Phocena phocena</i>	Toninha-dos-portos	Sorologia	Costeiro	FORMAM et al., 2009
<i>Megaptera novaenglie</i>	Baleia-jubarte	Sorologia	Oceânicos e costeiros	FORMAM et al., 2009
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Golfinho-listrado	Sorologia; IHQ	Oceânico	CABEZÓN et al., 2004 DI GUARDO et al., 2010 e PROFETA, et al., 2015
<i>Inia geoffrensis</i>	Boto-cor-de-rosa	Sorologia	Fluvial	SANTOS et al., 2011
<i>Balaenoptera physalus</i>	Baleia-fin	IHQ; PCR	Oceânico	MAZZARIOL et al., 2012
<i>Sotalia guianensis</i>	Boto-cinza	Histopatológico e IHQ	Costeiro	BANDOLI e OLIVEIRA, 1977 e GONZALES-VIEIRA et al. 2013
<i>Cephalorhynchus hectori</i>	Golfinho-de-hector	IHQ, PCR e histopatológico	Costeiro	ROE et al., 2013

Legenda: PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia); IHQ: Imuno-histoquímica; M.E.: Microscopia Eletrônica. Costeiro significa que a preferência de habitat é por áreas dentro da plataforma continental; fora desse trecho está sendo considerado oceânico. ☐ referência utilizada: Jefferson, Webber e Pitman, 2009.

Como mencionado acima, a primeira evidência histopatológica de *T. gondii* em um cetáceo de vida-livre ocorreu em 1977, em um *S. guianensis* que encalhou na baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (BANDOLI; OLIVEIRA, 1977). Estudos no Japão mostraram evidência de cetáceos em contato com esse parasita desde 1988, quando um filhote de orca (*Orcinus orca*), encalhada viva, apresentou sorologia positiva para esse agente (MURATA et al., 2004).

Com relação à epidemiologia, acredita-se que a via de infecção pode estar associada a ambientes marinhos poluídos e geralmente próximos à costa (VAN BRESSEM et al., 2009). Existem estudos com moluscos e lontras-marinhas (*Enhydra lutris nereis*) na Califórnia, Estados Unidos da América, que indicam que o uso de áreas próximas a rios ou água escoada da chuva pode favorecer a ocorrência desse patógeno (MILLER et al., 2002; SHAPIRO et al., 2014). A presença do *T. gondii* em animais oceânicos pode estar associada à fezes de gatos e/ou solo contaminados com presença de oocistos, que tenham comprometido a água do mar a partir de drenagens fluviais, efluentes e até mesmo a partir da água escoada de navios (VAN BRESSEM et al., 2009).

Outra forma importante de infecção é pela via placentária, que já foi descrita em duas espécies de cetáceos, incluindo golfinho-nariz-de-garrafa-do-Índico (*Tursiops aduncus*) em cativeiro (JARDINE; DUBEY, 2002) e golfinho-de-risso (*Grampus griseus*) em vida livre (RESENDES et al., 2002). Além disso a ocorrência de toxoplasmose em cetáceos poderia estar associada a infecções com outros agentes imunossupressores, tal como morbillivírus (DOMINGO et al., 1992; KENNEDY, 1998; MAZZARIOL et al., 2012). Porém, o *T. gondii* já foi descrita como o agente causador de morte primária em algumas espécies de golfinhos como, por exemplo, golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) (DI GUARDO et al., 2010), boto-cinza (*S. guianensis*) (GONZALES-VIEIRA et al., 2013), e golfinho-de-hector (*Cephaloryncus hector*) (ROE et al., 2013). De qualquer forma, além das possibilidades de via de infecção acima mencionadas, é importante ressaltar que não se sabe com precisão como isto ocorre na maioria dos casos estudados.

A infecção pelo *T. gondii* nos cetáceos tem sido descrita por meio de pesquisas sorológicas, histopatológicas, imuno-histoquímicas (IHQ), ultraestruturais e moleculares (reação em cadeia da polimerase – PCR) (Quadro 1). As prevalências descritas geralmente estão associadas a estudos sorológicos e são muito variáveis,

sendo em geral obtidas após os eventos de encalhes. Em águas britânicas, a prevalência de animais positivos para esse patógeno testado em oito espécies diferentes de cetáceos foi de 7,9% (FORMAN et al., 2009). Em animais encalhados na costa do Mediterrâneo, 54,4% dos indivíduos costeiros testados, pertencentes a duas espécies diferentes de golfinhos, *Tursiops truncatus* e *Delphinus delphis*, apresentavam anticorpos para *T. gondii* (CABEZÓN, 2004). Um estudo realizado na Nova Zelândia detectou a presença do *T. gondii* por meio de técnicas diversas (IHQ e PCR) em 17 animais (60,7%; n = 28) pertencente à mesma espécie (*Cephalorhynchus hectori*) sendo que 25% (7/28) dos casos foram considerados fatais (ROE et al., 2013).

No Brasil, além do citado trabalho de Bandoli e Oliveira (1977), a presença de anticorpos anti-*T. gondii* já foi reportada em botos-rosa (*Inia geoffrensis*) amazônicos (SANTOS et al., 2011). Além disso, foi confirmada a presença de *T. gondii* em um boto-cinza (*S. guianensis*), proveniente de Paranaguá, Paraná, valendo-se para tanto de análises histopatológicas e de técnicas de imuno-histoquímica (GONZALES-VIEIRA et al., 2013).

As alterações patológicas encontradas em cetáceos são semelhantes às encontradas em outras ordens de mamíferos (BROW; BARKER, 2007; CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Nos cetáceos, as principais lesões observadas foram linfadenites e necrose linfóide, necrose da adrenal, pneumonia intersticial, encefalite e meningoencefalite não supurativa, além de hepatite necrótica com infiltrado mononuclear associado com a presença de bradizoítos e taquizoítos livres (INSKEEP et al., 1990; MIKAELIAN et al., 2000; RESENDES et al., 2002; VAN BRESSEM et al., 2009; GONZALES-VIEIRA et al., 2013).

Porém, em que pese as informações já publicadas, ainda existem diversas incógnitas em relação à epidemiologia, achados histopatológicos e suscetibilidade das espécies de cetáceos em relação ao *T. gondii*. Omata et al. (2006) sugerem que as orcas que vivem no Japão podem ser resistentes ao *T. gondii*. Por outro lado, Di Guardo e Mazzariol (2013) sugerem que a cepa de *T. gondii* isolada nos golfinhos-listrados (*S. coeruleoalba*) têm um comportamento diferente daquelas isoladas dos demais mamíferos marinhos e mamíferos terrestres. Ainda, em algumas populações o protozoário pode ser considerado como um fator importante de ameaça e declínio

populacional, como sugerido para a população de golfinho-de-hector (*C. hector*) no norte da Nova Zelândia (ROE et al., 2013).

Devido, por um lado, à crescente importância desse parasita como um patógeno relevante para os mamíferos marinhos em diversas partes do mundo, e também como sinalizador de contaminação ambiental; e por outro à relativa carência de informações existentes sobre o tema em nosso meio, cremos ser de significativa importância abranger e expandir a investigação sobre a ocorrência deste coccídeo em cetáceos da costa brasileira.

3 OBJETIVO

Golfinho-de-hector (*Cephalorhynchus hectori*)

Fonte: (WEDEKIN, L. L., 2013)

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a ocorrência de *T. gondii* em órgãos selecionados (fígado, pulmão, baço, linfonodos e cérebro) de cetáceos mantidos no Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e diagnosticar, por meio de exames histopatológicos e imuno-histoquímicos, as alterações morfológicas microscópicas causadas *por T. gondii* nos animais estudados;
- Inferir sobre aspectos epidemiológicos e eventuais implicações da ocorrência de *T. gondii* para a conservação dos cetáceos no Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Golfinho-pintado-pan-tropical (*Stenella attenuata*)

Fonte: (WEDEKIN, L. L., 2009)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASOS SELECIONADOS

Foram usadas amostras provenientes do Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos (BTMM) do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Esse material encontra-se armazenadas em formol 10%, assim como congelados (-80°C e/ou -20°C) e/ou em blocos de parafina. As amostras foram fornecidas por diferentes instituições que trabalham com encalhe, reabilitação ou captura acidental de mamíferos marinhos ao longo da costa brasileira. As amostras usadas nesse estudo foram coletadas entre 1988 e 2014 pelas instituições parceiras e encaminhadas para o BTMM/LAPCOM. Dos 650 animais existentes no BTMM até julho de 2015, foram selecionados para este trabalho os casos de acordo com os seguintes critérios não excludentes: animais com histórico clínico e/ou relatos de necropsia; casos utilizados em estudos prévios desenvolvidos no LAPCOM e com existência de material histopatológico em condições apropriadas de análise. Para completar o esforço amostral (n) dos animais testados para *T. gondii*, foram incluídos nesse estudo três animais que estavam em cativeiro em parques de exibição pública no momento do óbito.

No total, e considerando os critérios de seleção adotados, foram analisados por meio de técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para *T. gondii* 186 animais de 21 espécies diferentes de mamíferos marinhos. A Tabela 1 discrimina os animais investigados, em função das instituições contribuintes e número de amostras fornecidas.

4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os principais órgãos examinados pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) em uma triagem prévia para investigação da presença do *T. gondii* foram fígado, pulmão, linfonodo, baço e cérebro. Esses órgãos foram escolhidos por estarem associados às principais lesões causadas por esse patógeno. As reações de imuno-histoquímicas foram realizadas no LAPCOM/FMVZ/USP. O anticorpo de detecção ou primário utilizado foi o anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* produzido em caprinos (VMRD Inc., Pullman, WA); seguido de anticorpo secundário policlonal biotinilado anti-caprino produzido em coelho, conforme o protocolo usado por Mazzariol et al. (2012), adaptado com diluição de anticorpo primário de 1/400 e de anticorpo secundário 1/600.

Para a coloração do antígeno foi usado o amino-etil-carbazol, que corou em avermelhado o *T. gondii*, e contra-coloração de hematoxilina de Mayer. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria (em solução tampão de citrato) a 90°C durante sete minutos. Para a revelação (anticorpo terciário) foi utilizado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit).

4.3 HISTOPATOLÓGICO

Os animais positivos ao exame de IHQ tiveram os órgãos/tecidos disponíveis avaliados ao exame histopatológico. As lâminas foram feitas por meio de técnicas histológicas rotineiras com cortes de 5µm de espessura dos tecidos embebidos em parafina, seguido pela coloração de hematoxilina-eosina.

Outras técnicas histoquímicas, incluindo Giemsa e prata metaminada de Grocott, também foram seletivamente empregadas para a procura de lesões associadas ou não à presença de *T. gondii* (POPPER; PARONETTO; BARKAR, 1960; LUNA, 1992).

Tabela 1 - Instituições que contribuíram com a cessão de material biológico, distribuídas em função da localização geográfica e número de amostras fornecidas

INSTITUIÇÃO	CIDADE	N DE AMOSTRAS
AQUASIS (Associação de Pesquisa e Conservação de Ecossistemas Aquáticos)	Caucaia-CE	38
Aquário de Santos	Santos-SP	2
BIOPESCA	Praia grande-SP	27
GEMARS	Imbé-RS	19
IPEC (Instituto de Pesquisas de Cananéia)	Cananéia-SP	23
Instituto Baleia Jubarte	Caravelas-BA	5
MAQUA	Rio de Janeiro-RJ	3
Museu Oceanográfico da FURG	Rio Grande-RS	42
Playcenter	São Paulo-SP	2
Outras Instituições		9

5 RESULTADOS

Cachalote (*Physeter macrocephalus*)

Fonte: (WEDEKIN, L. L., 2013)

5 RESULTADOS

As espécies de maior frequência nesse estudo foram a toninha (*P. blainvillei*) com 56,5% (105/186) dos casos, seguido do boto-cinza (*S. guianensis*), com 14% (26/186). A Tabela 2 discrimina os casos avaliados por espécie.

Tabela 2 - Nomes científicos, porcentagem e o total de cada espécie incluída nesse estudo. N total = 186 indivíduos

NOME CIENTÍFICO	NÚMERO DE ANIMAIS/ESPÉCIE	PORCENTAGEM (%)
<i>Arctocephalus australis</i>	5	2,8
<i>Delphinus sp</i>	1	0,5
<i>Globicephala macrorhyncus</i>	3	1,7
<i>Grampus griseus</i>	1	0,5
<i>Inia geoffrensis</i>	1	0,5
<i>Kogia breviceps</i>	2	1,1
<i>Kogia sima</i>	7	3,9
<i>Lagenodelphis hosei</i>	2	1,1
<i>Megaptera novaeangliae</i>	2	1,1
<i>Mesoplodon europeus</i>	1	0,5
<i>Orcinus orca</i>	2	1,1
<i>Peponocephala electra</i>	5	2,8
<i>Physeter macrocephalus</i>	3	1,7
<i>Pontoporia blainvillei</i>	105	56,5
<i>Sotalia guianensis</i>	26	13,7
<i>Stenella clymene</i>	6	3,3
<i>Stenella coeruleoalba</i>	2	1,1
<i>Stenella frontalis</i>	6	3,3
<i>Stenella longirostris</i>	6	3,3
<i>Steno bredanensis</i>	3	1,7
Total	186	100

Os animais estudados foram provenientes de toda a costa brasileira sendo sua maior concentração nas regiões sul (45,1%; 84/186), sudeste (29,5%; 55/186) e nordeste (25,2%; 47/186) respectivamente demonstrados na Figura 3. Dos animais testados, 54,8% (102/186) eram machos, 36 % (67/186) fêmeas e 9,1% (17/186) não foram identificados.

Figura 3 - Mapa de distribuição das instituições de pesquisa onde foram realizadas as colheitas das amostras que contribuíram para a realização do presente trabalho.

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

Legenda: Aquasis (Associação de Pesquisa e Conservação de Ecossistemas Aquáticos); BIOPESCA (Projeto Biopesca); CGR (Centro Golfinho Rotador); CRAM (Centro de Recuperação de Animais Marinhos); GEMARS (Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul); IBJ (Instituto Baleia Jubarte); IPEC (Instituto de Pesquisas Cananéia); MAQUA (Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores: Profa. Izabel Gurgel); MO-FURG (Museu Oceanográfico da Universidade Federal de Rio Grande); PBF (Projeto Baleia Franca); UNIVILLE (Universidade de Joinville).

Nesse estudo foram avaliados, a partir de 186 animais, material representativo de 179 fígados, 122 rins, 23 pulmões, 14 baços, 10 músculos esqueléticos, 6 linfonodos, 4 úteros, 4 adrenais, 4 cérebros, 3 intestinos e 3 corações. Os animais testados, correspondentes órgãos e os resultados para cada indivíduo estão discriminados no Anexo 1.

Foram identificados dois animais positivos para o *T. gondii* ao exame imuno-histoquímico e com lesões compatíveis à toxoplasmose: uma orca (*O. orca*), MM#452, mantida em cativeiro, e um golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) MM#178, de vida-livre, sua localização está representada na Figura 4.

Figura 4 - Mapa da distribuição dos animais testados e respectivos resultados para o exame imuno-histoquímico.

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

A orca (MM#452) se tratava de um animal macho, de cinco a seis anos de idade (aproximadamente) e conseqüentemente considerado um animal juvenil, com peso estimado em 2.500 kg no momento da necropsia. Esse animal foi capturado na Islândia em 1983 (GEMMLAGOS, 2015) e foi trazido a cidade de São Paulo, Brasil, um ano depois da sua captura. Aqui, foi mantido em cativeiro em um parque de entretenimento durante quatro anos ao longo da década de 80. O animal veio a óbito e o exame necroscópico foi realizado pelo Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP em 07/03/1988. Todo o material proveniente desse indivíduo ficou armazenado em blocos de cera de abelha, e no momento de realização do presente trabalho foi embebido em parafina para subsequente confecção de lâminas, valendo-se para tanto das técnicas histológicas rotineiras.

Os órgãos representados para este indivíduo foram fígado, rim, pulmão, intestino grosso, estômago glandular, músculo esquelético, tireoide, linfonodo e baço. À necropsia o único achado reportado foi a ocorrência de um cisto suprarrenal. Ao exame microscópico o animal apresentava as seguintes alterações: fígado, hepatite necrotizante multifocal a coalescente aleatória moderada com infiltrado linfoplasmocítico (Figura 6); rim, nefrite intersticial aguda multifocal com infiltrado misto discreto-moderado; glomerulo-nefrite membranosa discreta-moderada (Figura 5); pulmão, broncopneumonia fibrinossupurativa hemorrágica (Figura 5), moderada-severa, com presença de estruturas compatíveis com cistos de *T. gondii* (Figura 6) e presença de moderada quantidade de colônias bacterianas; estômago, gastrite granulocítica multifocal a coalescente discreta-moderada; músculo, rabdomiólise discreta; tireoide, tireoidite multifocal a coalescente linfoplasmocítica discreta; linfonodo, linfadenite necrótica supurativa severa associada a marcante linfocitólise difusa (Figura 6) e presença de estruturas compatíveis com taquizoítos de *T. gondii*. Um outro fragmento de linfonodo apresentava hipoplasia linfoide, vasculite fibrinóide aguda com infiltrado predominantemente mononuclear e linfadenite discreta-moderada granulocítica. O Intestino delgado exibia enterite mista discreta-moderada difusa com presença de microabscedação criptal. O pâncreas estava parcialmente autolizado, impossibilitando sua avaliação.

Figura 5 - Fotomicrografia de tecidos de *Orcinus orca*, caso MM#452, HE. A Rim: glomérulo nefrite membranosa, 40x; B: Rim: glomerulite 100x. C e D: Pulmão, broncopneumonia fibrinosupurativa hemorrágica, 40x e 100x.

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

Figura 6 - Fotomicrografia de tecidos de *Orcinus orca*, caso MM#452 HE. A: Pulmão, broncopneumonia fibrinossupurativa hemorrágica com presença de cisto de *Toxoplasma gondii*, (seta) 200x; B: Detalhe do cisto e do exsudato inflamatório (seta), 400x. Fígado, hepatite necrotizante multifocal, 40x (C) e 100x (D). Linfonodo, linfadenite necrótica multifocal supurativa, 100x (E) e 200x (F).

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

Ao exame de IHQ foram encontrados cistos compatíveis com *Toxoplasma gondii* em fígado, pulmão e linfonodo (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografia, IHQ. A: controle positivo da imuno-histoquímica para anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii*, Adrenal 800x, *Sotalia guianensis* (caso originalmente descrito por Gonzales-Viera et al, 2012). *Orcinus orca* caso MM#452, contra-coloração com hematoxilina de Mayer marcação positiva em fígado 200x (B) e pulmão, 400x. (C)

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

O indivíduo MM#178 se tratava de um golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*), macho, juvenil (2,43 m de comprimento total), que encalhou vivo no dia 29 de outubro de 2001 na Região dos Lagos, Saquarema, Rio de Janeiro (22°56' S / 42°19' W). O material colhido durante o exame necroscópico foi pulmão, fígado, rim e intestino grosso. Não há descrição necroscópica do caso.

Ao exame microscópico contatou-se as seguintes lesões: Pulmão: broncopneumonia fibrinosa moderada-severa, difusa com infiltrado mononuclear com discreta presença de neutrófilos; congestão e hemorragia difusa, discreta-moderada e edema moderado; carneificação multifocal discreta (Figura 8); Fígado: hepatite necrotizante multifocal a coalescente aleatória moderada-severa, com infiltrado predominantemente mononuclear; congestão e hemorragia discretas (Figura 8); Rim: doença glomerular cística primária, discreta; Cólon: parcialmente autolisado impossibilitando a avaliação histopatológica.

Figura 8 - Fotomicrografia, *Tursiops truncatus*, caso MM#178, HE. A: Fígado, hepatite necrotizante multifocal, 40x; B: detalhe do infiltrado inflamatório, 100x. C: Pulmão, broncopneumonia fibrinosa, 40x; D: Pulmão, área de carneificação (asterisco), 100x.

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

Ao exame de IHQ foram encontrados cistos de *Toxoplasma gondii* em fígado (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografia, IHQ. A: *Sotalia guianensis*, caso MM#075, controle positivo da imunohistoquímica para anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* *Sotalia guianensis* (caso originalmente descrito por Gonzales-Viera et al, 2012)., Adrenal 1200x. *Tursiops truncatus* caso MM#178. B: Fígado 200; C: Fígado, 400x.

Fonte: (COSTA-SILVA, S., 2015)

6 DISCUSSÃO

Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Fonte: (WEDEKIN, L. L., 2010)

6 DISCUSSÃO

Há, na literatura especializada, estudos da ocorrência de *T. gondii* em mamíferos marinhos na costa brasileira. Os relatos feitos com descrições histopatológicas foram realizados por Bandoli e Oliveira, 1977, que pesquisou este protozoário em um boto-cinza (*S. guianensis*) encalhado morto na baía de Guanabara, além de outro indivíduo da mesma espécie em Paranaguá (GONZALES-VIERA et al., 2013). Estudos sorológicos também foram realizados em boto-rosa-da-Amazônia (*Inia geoffrensis*), nos quais foi encontrado positividade em 86,3% dos animais testados (SANTOS et al., 2011).

Porém, a amplitude e abrangência da presente investigação, com mais de 180 animais estudados, é, até onde sabemos, inédita no país. As espécies golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) e baleia-orca (*O. orca*) nunca tinham sido descritas com a presença de *T. gondii* nas águas brasileiras, nem por meio de pesquisas sorológicas e nem com presença de cistos teciduais. Tais resultados acrescentam duas novas espécies as encontradas com toxoplasmose no Brasil.

No nosso trabalho, apesar da espécie *S. guianensis* (boto-cinza) ter sido a segunda com maior número de exemplares testados para *T. gondii*, não foi encontrado nenhum indivíduo desta espécie positivo para o agente. Algumas circunstâncias podem ser levantadas para explicar esta ausência de positividade, tais como a qualidade do material analisado tendo em conta o período de armazenamento em formalina, ou o fato de algum desses animais não possuírem dentre os tecidos disponíveis aqueles tidos como os mais representativos ou importantes para o diagnóstico histopatológico e/ou imuno-histoquímico da toxoplasmose (por exemplo, pulmão, fígado, encéfalo e/ou órgãos linfáticos). Vale salientar que, de acordo com a literatura, dentre as lesões mais comuns de se encontrar em cetáceos com *T. gondii* está a meningoencefalite não supurativa (DUBEY et al., 2003; DI GUARDO et al., 2010; SIERRA et al., 2014), porém somente em quatro casos o encéfalo estava disponível para avaliação.

A espécie com maior frequência de exemplares desse estudo foi a *P. blainvillei*, também conhecida no Brasil como toninha ou franciscana; semelhantemente ao observado com a *S. guianenses*, nenhum indivíduo desta espécie revelou-se positivo para o agente. Tal resultado, somado ao fato de não haver relato da existência de casos confirmados de toxoplasmose nestes animais, pode ter várias interpretações, incluindo desde a não exposição dos espécimes analisados ao protozoário ou até a possibilidade de se tratar de uma espécie que apresente uma resistência natural ao *T. gondii*. Estudos complementares são imprescindíveis para avançar-se na compreensão deste panorama.

As espécies golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) e orca (*O. orca*) já haviam sido reportadas com *T. gondii* em outros locais do mundo, como na Inglaterra e no Japão (CRUICKSHANK et al., 1990; MURATA et al., 2004). Porém, os relatos existentes em orcas não descrevem as alterações histopatológicas decorrentes da enfermidade, como aqueles apresentados aqui.

O nosso estudo descreve a primeira ocorrência de toxoplasmose em um cetáceo proveniente de cativeiro no Brasil, e trata-se do primeiro relato das alterações patológicas na espécie (*O. orca*). Os estudos disponíveis na literatura mostram a presença de *T. gondii* em um filhote de *O. orca* que encalhou viva no Japão em 1988 (MURATA et al., 2004). Em outro estudo realizado por Omata et al. (2006), oito espécimes foram testados para *T. gondii* e outros agentes, após um encalhe em massa no Japão, mas em nenhum indivíduo foi detectado a presença desse agente. No caso ora apresentado, além de o agente ter sido evidenciado microscopicamente e marcado por meio da IHQ, vários dos órgãos estudados exibiram alterações muito semelhantes às aquelas descritas como características desta protoparasitose em hospedeiros diversos, tais como esplenite e linfadenite necrotizantes e broncopneumonia (CRUICKSHANK et al., 1990; RESENDES et al., 2002; EPIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; MAZZARIOL et al., 2012; DI GUARDO; MAZZARIOL, 2013). Em virtude do histórico do animal, somado aos achados patológicos caracterizados por processos necro-inflamatórios generalizados em vários dos órgãos e tecidos avaliados, acreditamos que o agente pode ter sido determinante para a causa de morte deste animal. Ainda, por se tratar de um animal de vida livre e que foi capturado para manutenção em cativeiro (GEMLAGOS,

2015), apesar de pouco provável em virtude do que se conhece para fisiopatologia da toxoplasmose em hospedeiros pouco adaptados (CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013), não é possível descartar a possibilidade desta infecção ter ocorrido ainda quando em liberdade, com o estabelecimento de um estado de quiescência do agente cujo equilíbrio poderia ter sido rompido em decorrência do estresse de cativeiro e/ou outros fatores predisponentes (LINDSAY et al., 2003; AUBERT; VILLENA, 2009).

Por outro lado, e tendo em conta a história natural da toxoplasmose para a maioria dos hospedeiros pouco adaptados, é mais crível supor que a infecção tenha decorrido da contaminação da água do recinto por formas infectantes (oocistos esporulados) de *T. gondii*, visto que os mesmos podem ficar viáveis na água salgada por até dois anos (AUBERT; VILLENA, 2009). Finalmente, também é possível especular que a infecção tenha decorrido da contaminação do pescado que era fornecido para alimentação dos animais em cativeiro.

Os estudos sorológicos realizados a partir de material obtido de mamíferos marinhos mantidos em cativeiro revelam uma grande quantidade de cetáceos positivos. Trabalho conduzido no México mostrou que 83% dos golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) avaliados eram positivos para o agente (ALVARADO-ESQUIVEL; SÁNCHEZ-OKRUCKY; DUBEY, 2012). No Brasil não há trabalhos disponíveis uma vez que a legislação vigente não permite cetáceos em cativeiro desde 1992.

Com relação ao outro caso, o presente trabalho é o primeiro relato da ocorrência desse patógeno em golfinho-nariz-de-garrafa no Brasil. Porém estudos em outras partes do mundo descrevem a susceptibilidade dessa espécie ao *T. gondii*, tanto por técnicas sorológicas, IHQ e histopatológico (CRUICKSHANK et al., 1990; INSKEEP et al., 1990; PROFETA et al., 2015). Desta forma, nossos resultados corroboram os dados encontrados na literatura internacional para esta espécie.

Infelizmente, não foi possível elaborar inferências sobre a distribuição do patógeno nas águas territoriais brasileiras, pois o número de animais positivos, foi reduzido e impossibilitou esse tipo de análise. Porém estudos com bivalves e infecções em lontras marinhas mostram que áreas mais poluídas ou mais próximas

a costa podem contribuir para a presença desse protozoário (VAN BRESSEM et al., 2009; SHAPIRO et al., 2015). Com base nestas afirmações, e no fato de que os dois casos conhecidos de toxoplasmose em mamíferos marinhos de vida livre no Brasil (*S. guianensis* descrito por Gonzales-Viera (2012), e o *T. truncatus* apresentado no atual trabalho) ocorreram em animais encontrados em áreas costeiras urbanizadas, é crível supor que a mesma situação ocorra nas costas brasileiras. Trabalhos futuros são necessários para corroborar esta hipótese.

Ainda, julgamos importante salientar que dos nove animais com diagnóstico histopatológico de hepatite necrotizante descritos na dissertação de mestrado do Gonzales-Viera (2012), apenas um desses foi positivo na IHQ para *T. gondii* (MM#178) (Figura 2). O outro animal positivo apresentado no presente trabalho era proveniente de cativeiro e não havia sido descrito anteriormente por Gonzales-Viera, (2012).

A presença do *T. gondii* em mamíferos marinhos deve ter uma atenção especial, e acredita-se que em determinadas populações, como as do golfinhos-de-Maui (*Cephalorhyncus hector mauri*) que é considerada uma subespécie de golfinho-de-hector (*Cephalorhyncus hector*), a toxoplasmose seja tão importante que deveria ser usada como variável nos estudos populacionais para essa espécie, por causar lesões graves e levar os animais a óbito (ROE et al., 2013). No Brasil mais pesquisas serão necessárias para tentar entender melhor a atuação do agente e sua distribuição e implicações para a conservação das espécies que ocorrem na costa brasileira.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*)

Fonte: (WEDEKIN, L. L., 2010)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo abrangente realizado no Brasil referente a pesquisa de *T. gondii* em mamíferos marinhos, que encalharam mortos e/ou vieram a óbito em cativeiro, ou durante o processo de reabilitação. O trabalho envolveu amostras de toda costa brasileira, com dados desde 1988 até 2014, correspondendo a mais de quatro décadas de colheita de material e parceria entre várias instituições em colaboração com o nosso laboratório, o que possibilitou resultados importantes para tentar ampliar o nosso conhecimento em relação ao agente e os cetáceos.

O fato de um dos animais positivos ser proveniente de um parque temático vem salientar a importância para a adoção de rígidas medidas preventivas e controle naqueles países que ainda permitem a manutenção em cativeiro destes animais (que não é mais o caso do Brasil), seja no tratamento da água dos recintos e alimentos ofertados, assim como na mitigação do estresse decorrente do tipo manutenção.

Por outro lado, as lesões encontradas no *T. truncatus* de vida livre sugerem que a infecção causada pelo protozoário teria importante contribuição com o óbito deste indivíduo, sendo provavelmente um importante fator para encalhe/óbito dessa ordem animal.

Infelizmente não foi possível fazer inferências consistentes em relação a epidemiologia do parasita por ausência de um número maior animais comprometidos pelo o agente.

A abrangência do atual trabalho e os resultados alcançados claramente indicam que ainda são necessários mais estudos referentes a ocorrência desse parasita nos cetáceos e a sua real importância para a conservação destes animais. Pesquisas no Brasil e no mundo estão em processo de desenvolvimento para entender melhor esse agente e suas implicações ecológicas nas diferentes espécies de cetáceos.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; SÁNCHEZ-OKRUCKY, R.; DUBEY, J. P. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 321–324, 2012.
- AUBERT, D.; VILLENA, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 290–295, 2009.
- BANDOLI, J. G.; OLIVEIRA, C. A. B. Toxoplasmose em *Sotalia guianensis* (Van Beneden, 1963, Cetacea-Delphinidae). **Folha Médica**, v.75, p. 459-458, 1977.
- BOWATER, R. O., NORTON, J., JOHNSON, S., HILL, B., O'DONOGHUE, P., PRIOR, H. Toxoplasmosis in indo-pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*), from Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 10; p. 627-632, 2003.
- BROWN, C. C., BAKER, D. C., BARKER, K., Alimentary system. In: JUBB, KENNEDY, AND PALMER **Pathology of domestic animals**, ed. Maxie MG, pp. 3–296. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA. 2007.
- CABEZÓN, O.; RESENDES, a R.; DOMINGO, M.; RAGA, J. a; AGUSTÍ, C.; ALEGRE, F.; MONS, J. L.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 3, p. 643–644, 2004.
- CATÃO-DIAS, Z. L.; EPIPHANIO, S.; KIERULFF, M. C. M. Neotropical primates and their susceptibility to *Toxoplasma gondii*: new insights of an old problem. In BRINKWORTH, J. F.; PECHENKINA, K. **Primates, pathogens, and evolution**. New York: Springer Press, 2013. p. 253-290.
- COMMITTEE ON TAXONOMY. List of marine mammals species and subspecies. Society for Marine Mammalogy.2014. Disponível em::<www.marinemammalscience.org>. Acesso em: 15 dez 2014
- CRUICKSHANK, J. J.; HAINES, D. M.; PALMER, N. C.; AUBIN, D. J. S. Cysts of a *Toxoplasma*-like organism in an Atlantic bottlenose dolphin. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 213–215, 1990.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emerge of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 78, p. 103–116, 2001.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. **Science's Compass**, v. 443, n. 2000, 2000.

DAURA-JORGE, F. G.; INGRAM, S. N.; SIMÕES-LOPES, P. C. Seasonal abundance and adult survival of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a community that cooperatively forages with fishermen in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 29, n. 2, p. 293–311, 2013.

DAURA-JORGE, F. G.; SIMOES-LOPES, P. C. Lobomycosis-Like disease in wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* of Laguna, southern Brazil: monitoring of a progressive case. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 93, n. 2, p. 163–170, 2011.

DI GUARDO, G.; DI CESARE, A.; OTRANTO, D.; CASALONE, C.; IULINI, B.; MIGNONE, W.; TITTARELLI, C.; MELONI, S.; CASTAGNA, G.; FORSTER, F.; KENNEDY, S.; TRAVERSA, D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 31–36, 2011.

DI GUARDO, G.; MAZZARIOL, S. *Toxoplasma gondii*: clues from stranded dolphins. **Veterinary Pathology**, v. 50, p. 737, 2013.

DI GUARDO, G.; PROIETTO, U.; DI FRANCESCO, C. E.; MARSILIO, F.; ZACCARONI, A.; SCARAVELLI, D.; MIGNONE, W.; GARIBALDI, F.; KENNEDY, S.; FORSTER, F.; IULINI, B.; BOZZETTA, E.; CASALONE, C. Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. **Veterinary Pathology**, v. 47, p. 245–253, 2010.

DOMINGO, M.; VISA, J.; PUMAROLA, M.; MARCO, A. J.; RABANAL, R.; KENNEDY, S. Pathology and immunocytochemical studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 1-10, 1992..

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

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

DUBEY, J. P.; LIPSCOMB, T. P.; MENSE, M.; PARASITIC, A. Toxoplasmosis in an Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*) Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 410–411, 2004.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 275–296, 2003.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in

captive new world primates. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 196–204, 2003.

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

GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues**. Agriculture handbook Unites States.Washngton DC. 1998.

GEMMLAGOS. Grupo de estudos da região dos lagos. Disponível em: <www.gemmlagos.com.br/2013/05/por-onde-andam-as-orcas-do-playcenter>. Acesso em: 15 ago 2015.

GERACI, J. R. Introduction and identification. Marine mammals (Cetacea, Pinnipedia and Sirenia). In: FOWLER, M. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Sauders. 1986. cap. 47, p. 751-756.

GERACI, J. R.; LOUNSBURY, V. J. **Marine Mammal Ashore: a field guide for strandings**. Baltimore, MD: National Aquarium in Baltimore, 2005. 371 p.

GONZALES-VIERA, O. **Patologia comparada das hepatopatias e nefropatias em cetáceos do Brasil**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GONZALES-VIERA, O.; MARIGO, J.; RUOPPOLO, V.; ROSAS, F. C. W.; KANAMURA, C. T.; TAKAKURA, C.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 358–362, 2013.

GONZALES-VIERA, O.; RUOPPOLO, V.; MARIGO, J.; CARVALHO, V. L.; GROCH, K. R.; BERTOZZI, C. P.; TAKAKURA, C.; NAMİYAMA, G.; VANSTREELS, R. E. T.; CATÃO-DIAS, J. L. Renal Lesions in cetaceans from Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 152, p. 345–354, 2015.

GROCH, K. R.; COLOSIO, A. C.; MARCONDES, M. C. C.; ZUCCA, D.; DÍAZ-DELGADO, J.; NIEMEYER, C.; MARIGO, J.; BRANDÃO, P. E.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J. L. Novel cetacean morbillivirus in Guiana Dolphin, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 511–513, 2014.

GROCH, K. R.; MARCONDES, M. C. C.; COLOSIO, A. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Skeletal abnormalities in humpback whales *Megaptera novaeangliae* stranded in the Brazilian breeding ground. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 2, p. 145–158, 2012.

ICMBIO. **Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes: versão III**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011.

INNES, E. a. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 1–7, 2010.

INSKEEP, W.; GARDINER, C. H.; HARRIS, R. K.; DUBEY, J. P.; GOLDSTON, R. T. Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 3, p. 377–382, 1990.

JEFFERSON; T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. **Marine mammals of the world**. Canadá, Elsevier, 2008.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 1999-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1371–1374, 2003.

KENNEDY, S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 201–225, 1998.

KLEVAR, S. Perinatal death in domestic animals. Abstracts of the 20th Symposium of the Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation (NKVet). Reykjavik, Iceland. April 26-27, 2007. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49 Suppl 1, p. S1–S17, 2007.

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M.; COLE, R. A.; FLICK, G. J.; WETCH, C. N.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Sporulation and Survival of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Seawater. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 687–688, 2003.

LODI, L.; BOROBIA, M. **Baleias botos e golfinhos do Brasil, guia de identificação**. Technical books editora, Rio de Janeiro, 2013.

LUNA, L. G. **Histopathology methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Downers Grove: America Histolabs, 1992.

MAZZARIOL, S.; MARCER, F.; MIGNONE, W.; SERRACCA, L.; GORIA, M.; MARSILI, L.; DI GUARDO, G.; CASALONE, C. Dolphin morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). **BMC: Veterinary Research**, v. 8, p. 20, jan. 2012.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, v. 104, n. 2, p. 1–3, 2009a. Tradução do artigo original em francês, publicado no Arch Inst Pasteur Tunis, 1: 96-103, 1909, gentilmente cedido pela Sociedade Francesa de Parasitologia. Título traduzido: NICOLLE, M. C.; MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen).

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, v. 104, n. 2, p. 1–2, 2009b. Traduzido por Wilma Buffolano, A new protozoan parasite of rabbit found in histological lesions similar to human Kala-Azar. do artigo original em Italiano e publicado na Rev Soc Sci S Paulo 3: 109-112, 1909.

MIGAKI, G.; SAWA, T. R.; DUBEY, J. P. Fatal disseminated toxoplasmosis in a Spinner dolphin (*Stenella longirostris*). **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 463-464, 1990.

MIKAELIAN, I.; BOISCLAIR, J.; DUBEY, J. P.; KENNEDY, S.; MARTINEU, D.

Toxoplasmosis in Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from St Lawrence Estuary: two case reports and a serological survey. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p. 73-76, 2000.

MILLER, M. A.; GARDNER, I. A.; KREUDER, C.; PARADIES, D. M.; WORCESTER, K. R.; JESSUP, D. A.; DODD, E.; HARRIS, M. D.; AMES, J. A.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Costal freshwater runoff is a risk for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 997-1006, 2002.

MURATA, K.; MIZUTA, K.; IMAZU, K.; TERASAWA, F.; TAKI, M.; ENDOH, T. The prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and captive cetaceans from Japan. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 896–8, ago. 2004.

NERY, M. F.; ESPÉCIE, M. D. A.; SIMÃO, S. M. Marine tucuxi dolphin (*Sotalia guianensis*) injuries as a possible indicator of fisheries interaction in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 56, n. 4, p. 313–316, 2008.

OMATA, Y.; UMESHITA, Y.; WATARAI, M.; TACHIBANA, M.; SASAKI, M.; MURATA, K.; YAMADA, T. K. Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 68, p. 523–526, 2006.

PBST, D. A.; ROMMEL, S. A.; MACLELLAN, W. A. The Functional morphology of marine mammals. In REINOLDS III, J. E.; ROMMEL, S. A. **Biology of Marine Mammals**. Washington: Smithsonian Institution, 1999. p.1-14.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395–1405, 2000.

PISCITELLI, M. A.; RAVERTY, S. A.; LILLIE, M. A.; SHADWICK, R. E. A review of cetacean lung morphology and mechanics. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 12, p. 1425–1440, 2013.

POPPER, H.; PARONETTO, F.; BARKA, T. PAS-positive structures of nonglycogenic character in normal and abnormal liver. **Archives of Pathology**, v.70, p.300-313, 1960.

PROFETA, F.; DI FRANCESCO, C. E.; MARSILIO, F.; MIGNONE, W.; DI NOCERA, F.; DE CARLO, E.; LUCIFORA, G.; PIETROLUONGO, G.; BAFFONI, M.; COCUMELLI, C.; ELEN, C.; TERRACCIANO, G.; FERRI, N.; DI FRANCESCO, G.; CASALONE, C.; PAUTASSO, A.; MAZZARIOL, S.; CENTELLEGHE, C.; DI GUARDO, G. Retrospective seroepidemiological investigations against morbillivirus, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* spp. in cetaceans stranded along the Italian coastline (1998–2014). **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 89–92, 2015.

REIDENBERG, J. S. Anatomical adaptations of aquatic mammals. **Anatomical Record**, v. 290, n. 6, p. 507–513, 2007.

REINOLDS III, J. E.; ODELL, D. K.; ROMMEL, A. S. Marine mammal of the world. In REINOLDS III, J. E.; ROMMEL, S. A. **Biology of Marine Mammals**. Washington: Smithsonian Institution, 1999. p.1-14.

RESENDES, A. R.; ALMERÍA, S.; DUBEY, J. P.; OBÓN, E.; JUAN-SALLÉS, C.; DEGOLLADA, E.; ALEGRE, F.; CABEZÓN, O.; PONT, S.; DOMINGO, M. Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 1029–1032, 2002.

RICE, D. W. Baleen. In PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. **Encyclopedia of Marine Mammals**. 2. ed. Canadá: Elsevier, 2009. p. 78-80.

ROE, W. D.; HOWE, L.; BAKER, E. J.; BURROWS, L.; HUNTER, S. A. An atypical genotype of *Toxoplasma gondii* as a cause of mortality in Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 67–74, 18 fev. 2013.

ROMMEL, S. A.; LOWENSTINE, L. J. Gross and microscopic anatomy. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, 2001. p. 129-164.

ROSSI-SANTOS, M. R.; WEDEKIN, L. L.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Residence and site fidelity of *Sotalia guianensis* in the Caravelas River Estuary, eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 87, n. 01, p. 207, 2007.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; MARVULO, M. F. V.; SOUZA, S. L. P.; RAGOZO, A. M. A.; NASCIMENTO, C. C.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 171–173, 2011.

SHAPIRO, K.; VANWORMER, E.; AGUILAR, B.; CONRAD, P. A. Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4177-4188, 2015.

SIERRA, E.; SÁNCHEZ, S.; SALIKI, J. T.; BLAS-MACHADO, U.; ARBELO, M.; ZUCCA, D.; FERNÁNDEZ, A. Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2390–2397, jul. 2014.

SUNDAR, N.; COLE, R. A.; THOMAS, N. J.; MAJUMDAR, D.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 125–132, 2008.

VAN BRESSEM, M.-F.; RAGA, J. A.; DI GUARDO, G.; JEPSON, P. D.; DUIGNAN, P. J.; SIEBERT, U.; BARRETT, T.; SANTOS, M. C. de O.; MORENO, I. B.; SICILIANO, S.; AGUILAR, A.; VAN WAEREDEEK, K. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, n. 2, p. 143–57, 23 set. 2009.

WEDEKIN, L. L.; DAURA-JORGE, F. G.; SIMÕES-LOPES, P. C. An aggressive interaction between bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and estuarine Dolphins (*Sotalia guianensis*) in southern Brazil. **Aquatic Mammals**, v. 30, n. 3, p. 391–397, 2004.

WEDEKIN, L. L.; ROSSI,-SANTOS, M. R.; BARACHO, C.; CYPRIANO-SOUZA, A. L.; SIMÕES-LOPES, P. C. Cetacean records along a coastal-offshore gradient in the Vitória- Trindade Chain, western south Atlantic Ocean. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 137–144, 2014.

ANEXO A: Lista dos animais avaliados por meio de ensaios imuno-histoquímicos, distribuídos em função do número de registro, espécie, resultado e órgãos analisados.

Registro MM	Nome científico	IHQ Toxo	Órgãos testados
2	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
5	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado, rim e baço
7	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
8	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
10	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
11	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
14	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
15	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
18	<i>Arctocephalus australis</i>	Negativo	Pulmão e coração
20	<i>Arctocephalus australis</i>	Negativo	Intestino, fígado, pulmão e baço
21	<i>Arctocephalus australis</i>	Negativo	pulmão
24	<i>Arctocephalus australis</i>	Negativo	pulmão
25	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
26	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
30	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
31	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
32	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim

35	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado e rim
43	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Útero, fígado e rim
61	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
63	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
65	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
66	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Adrenal
69	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
72	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Baço e linfonodo
80	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
81	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
82	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado, Linfonodo, músculo e rim
83	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
84	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
85	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
86	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
87	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
88	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
90	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
92	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
93	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
95	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Pulmão e músculo

96	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
97	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
109	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
116	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
120	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
122	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado, baço e rim
123	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
125	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
127	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
128	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
129	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
130	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
131	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
134	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
135	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
136	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
137	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
138	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
139	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
141	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
142	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim

143	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
144	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
145	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
146	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
149	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
150	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
151	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
152	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
153	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
154	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
155	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
156	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
158	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
159	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
160	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
161	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
166	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
167	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
168	<i>Tursiops truncatus</i>	Negativo	Fígado e rim
169	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Fígado e rim
170	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Fígado e rim

173	<i>Steno bredanensis</i>	Negativo	Fígado, baço e rim
177	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado e pulmão
178	<i>Tursiops truncatus</i>	Positivo	Fígado, rim, intestino delgado e pulmão
179	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
205	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
207	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
208	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Fígado e rim
218	<i>Tursiops truncatus</i>	Negativo	Fígado e rim
219	<i>Steno bredanensis</i>	Negativo	Fígado e rim
220	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
227	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
230	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
231	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
232	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado, músculo e pulmão
250	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
252	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
259	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
260	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
261	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
262	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
263	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim

281	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
284	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
285	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
311	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
313	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
323	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Negativo	Fígado e rim
324	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Negativo	Fígado e rim
325	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Negativo	Fígado
326	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Negativo	Baço, estômago e músculo
327	<i>Peponocephala electra</i>	Negativo	Fígado, ovário, pulmão e rim
328	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Fígado e rim
329	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
330	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Negativo	Fígado
332	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
335	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
338	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
339	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
340	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
341	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
345	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim

348	<i>Delphinus sp</i>	Negativo	Fígado
349	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
353	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
357	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
358	<i>Steno bredanensis</i>	Negativo	Fígado e cérebro
361	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
364	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
367	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado, rim, linfonodo, pele, e músculo
371	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
374	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Fígado e rim
375	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Negativo	Fígado e rim
376	<i>Kogia breviceps</i>	Negativo	Fígado e rim
377	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Pulmão, esôfago, fígado, cerebelo e baço
378	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado, pulmão e rim
379	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado e rim
380	<i>Physeter macrocephalus</i>	Negativo	Fígado, pulmão, olho e rim
381	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Negativo	Fígado e pulmão
382	<i>Mesoplodon europeus</i>	Negativo	Fígado, pâncreas e rim
383	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado, músculo cardíaco, pâncreas, músculo esquelético, adrenal e rim
385	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado e rim
386	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Pulmão

387	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Pulmão
389	<i>Stenella longirostris</i>	Negativo	Pulmão e músculo
391	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
392	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
394	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
396	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
403	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
405	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
406	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
407	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado e rim
422	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Linfonodo, fígado e pulmão
435	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Fígado, baço e adrenal
450	<i>Inia geofrensis</i>	Negativo	Pulmão, intestino grosso, estômago, linfonodo, pâncreas, útero, rim, traqueia, adrenal, coração e fígado
451	<i>Tursiops truncatus</i>	Negativo	Pulmão e fígado
452	<i>Orcinus orca</i>	Positivo	Fígado, baço, intestino delgado, pâncreas, tireoide, músculo, linfonodo, pulmão e rim
464	<i>Stenella frontalis</i>	Negativo	Pulmão e medula
478	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Pulmão e rim
479	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim
480	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado e rim

481	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado
482	<i>Physeter macrocephalus</i>	Negativo	Fígado e baço
483	<i>Kogia breviceps</i>	Negativo	Pulmão
484	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Baço
485	<i>Stenella clymene</i>	Negativo	Fígado
486	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Cérebro
519	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Negativo	Músculo, estômago e baço
520	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Negativo	Músculo, rim e fígado
521	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado, baço, músculo e pâncreas
522	<i>Peponocephala electra</i>	Negativo	Fígado, baço e rim
556	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Cérebro
557	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado
558	<i>Peponocephala electra</i>	Negativo	Fígado
559	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado
560	<i>Peponocephala electra</i>	Negativo	Fígado e rim
561	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado
562	<i>Peponocephala electra</i>	Negativo	Pulmão
563	<i>Grampus griseus</i>	Negativo	Fígado e rim
579	<i>Kogia sima</i>	Negativo	Fígado e cérebro

600	<i>Arctocephalus australis</i>	Negativo	Fígado
643	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado
644	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado
647	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Negativo	Fígado
OC 325	<i>Orcinus orca</i>	Negativo	Fígado e cerebelo
OC 132	<i>Sotalia guianensis</i>	Negativo	Fígado, cérebro, pulmão,