

ALESSANDRA LOUREIRO MORALES DOS SANTOS

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

São Paulo

2022

ALESSANDRA LOUREIRO MORALES DOS SANTOS

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

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

**Departamento:**

Patologia

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias

São Paulo

2022

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. 4163  
FMVZ

Santos, Alessandra Loureiro Morales dos  
Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre:  
análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular / Alessandra Loureiro Morales  
dos Santos. – 2022.  
198 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Platirrinos. 2. Patologia. 3. Zoonoses. 4. Protozoários. 5. Saúde Única. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 4<sup>th</sup> February 2022

### CERTIFIED

We certify that the Research "Retrospective study of toxoplasmosis in free-ranging neotropical primates: histopathological, immunohistochemical and molecular analysis", protocol number CEUAX 4796040222 (ID 002068), under the responsibility José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day February 04, 2022.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo retrospectivo da toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre: análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular", protocolado sob o CEUAX nº 4796040222, sob a responsabilidade de José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 04 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Alessandra Loureiro Morales dos

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

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

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

### Banca Examinadora

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

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

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

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

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

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

## DEDICATÓRIA

*Aos animais que me brilharam os olhos para seguir a profissão de médica-veterinária.*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 88887.374652/2019-00.

Agradecimento especial à **Natália Fernandes** que participou ativamente desde a idealização do estudo, avaliação histopatológica e imuno-histoquímica; e “de quebra”, me acolheu no Instituto Adolfo Lutz e na vida. À **Juliana Guerra**, que me auxiliou em toda a parte teórica que engloba a biologia molecular, e que me auxiliou também no diagnóstico mais inesperado ao longo desses dois anos... do meu próprio cachorro. Ambas se tornaram amigas e atuaram, de fato, como co-orientadoras deste trabalho – sem elas, nada seria possível.

Ao professor **José Luiz Catão-Dias**, que sempre me inspirou com sua paixão pelo ensino, pesquisa, animais e pessoas. Obrigada por acreditar na minha competência para desenvolver esse projeto. Agradeço imensuravelmente seu tempo e conhecimento dedicado para ajudar no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao **Rodrigo Ressio** e à **Cinthy Cirqueira**, que colaboraram com toda a parte da prática e teórica da imuno-histoquímica. À **Isis de Jesus** e **Júlia de Carvalho**, que dividiram tantos momentos “lutzianos” comigo. Às diretoras **Cristina Kanamura** e **Sônia Oliveira**, que permitiram a realização desse projeto. Aos demais amigos e colegas do Instituto Adolfo Lutz, de diferentes hierarquias, **Camila, Vinícius, Anderson, Leonardo, Magda, Paloma, Filipe, David, Sandra, Daniela, Ketlyn, Carola** e **Ana Rita**.

Outros grandes nomes assumiram enorme importância ao longo dessa trajetória, especialmente biomolecular, que me auxiliaram analisando os dados em conjunto ou cedendo amostras. Agradeço ao **Chunlei Su**, pelo suporte e gentileza tamanha ao analisar os meus dados de eletroforese. À **Mariana Sequetin**, que gentilmente cedeu material extraído de tecidos congelados, utilizados para a genotipagem. À **Hilda Pena**, pela colaboração ao ceder amostras das cepas-padrão. Ao **Roberto Hiramoto**, por ceder uma alíquota de material extraído de camundongos inoculados com *T. gondii*, sendo esta amostra utilizada para os controles positivos para a PCR em Tempo Real. À **Vera-Chioccola**, pelo acolhimento e direcionamento em relação à genotipagem.

Ao amigo **Pedro Suárez**, que desde a residência me incentivou para o ingresso no LAPCOM, e que muito me auxiliou com a análise estatística e a minha formação científica como um todo. À **Priscilla Costa**, que se tornou uma grande amiga. Ao **Eduardo Machado**, amigo e vizinho. À **Kátia Groch**, que me apresentou a técnica de imuno-histoquímica para *T. gondii*. Ao **Josué Delgado**, que me auxiliou na escolha do tema desta pesquisa. Aos demais amigos e colegas do LAPCOM.

À amiga **Isabela Silva**, que me ajudou no preparo para a prova de seleção e ingresso no programa de mestrado. À **Marina Landi**, que me auxiliou com o envio do protocolo ao CEUA. À **Mariana Aranha** que desde a residência se faz presente na minha vida “vpteniana”. Agui agradeço também à **Letícia** e **Gabriela**, colegas do VPT e à **Milena**, secretária da pós-graduação do programa e que sempre esteve disposta a me ajudar de prontidão nas questões relacionadas à pós.

À **Luciana Torres**, que me forneceu importante parte da base de diagnóstico, auxiliando indiretamente para o desenvolvimento desse projeto. Assim como os professores da graduação, **Silvia Kleeb**, **José Xavier** e **Celso Pinto**.

Aos amigos da patologia diagnóstica **Cícero Costa, Ticiane Ervedosa, Jamile Garcia, Luiz Silva, e Diogo Tosi**. À todos os amigos das outras áreas da medicina veterinária. Aos amigos e amigas, em especial à **Juliana, Beatriz, Wendy, Renata, João, Valdez e Nicole**.

E por fim, aos meus familiares. Meus pais **Norberto e Ivanilde**, que sempre me ofereceram toda a base para a vida, com carinho e amor desmedido, e me formaram uma pessoa com princípios dos quais muito me orgulho. Ao meu irmão **Leandro**, que tem a habilidade incrível de tornar tudo mais divertido. À minha cunhada **Monique** e sobrinhos **Bernardo e Manuela**. Às minhas avós **Tereza e Célia**, e ao meu avô **Oswaldo** (em memória).

A todos os animais que já tive a oportunidade de conviver, cuidar e ser cuidada. Em especial aos cães **Mussum** (que muito me acompanhou no desenvolvimento desta dissertação) e **Liza** (em memória).

À vida. À morte. Ao universo. Às energias. A tudo que não conheço mas que de alguma forma habita em mim, pois acredito.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

Odes de Ricardo Reis. Fernando Pessoa. (Notas de João Gaspar Simões e Luiz de Montalvor). Lisboa: Ática, 1946 (imp.1994).

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida “enteroepitelial”, também conhecido como “coccidiano” do <i>T. gondii</i> , e patogenia da doença .....	31
Figura 2 - Ciclo de vida “extra intestinal” do <i>T. gondii</i> e patogenia da doença.....	33
Figura 3 - Classificação taxonômica dos primatas neotropicais .....	43
Figura 4 - História natural dos primatas neotropicais relacionada com a teoria da deriva continental e o grande intercâmbio americano .....	48
Figura 5 - Representação ilustrativa dos métodos empregados .....	53
Figura 6 - Fotomicrografias exemplificativas da gradação das imunomarcações hepática e esplênica .....	58
Figura 7 - Imagens dos géis de eletroforese dos genótipos-padrão de <i>T. gondii</i> .....	64
Figura 8 - Distribuição geográfica municipal dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, oriundos do estado de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	69
Figura 9 - Distribuição geográfica municipal dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, em função do local de origem externo ao estado de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	70
Figura 10 - Aspectos histomorfológicos hepáticos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	72
Figura 11 - Aspectos histomorfológicos esplênicos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	76
Figura 12 - Aspectos histomorfológicos renais de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	79
Figura 13 - Aspectos histomorfológicos pulmonares de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	82
Figura 14 - Aspectos histomorfológicos cardíacos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	85
Figura 15 - Aspectos histomorfológicos encefálicos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	88
Figura 16 - Representação fotomicrográfica da positividade da imunomarcação para <i>T. gondii</i> nos diferentes órgãos/tecidos avaliados de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica do <i>T. gondii</i> .....	29
Tabela 2 - Definição resumida das formas envolvidas nos ciclos do <i>T. gondii</i> .....	30
Tabela 3 - Genótipos-padrão utilizados comumente em trabalhos científicos com caracterização genotípica de <i>T. gondii</i> .....	39
Tabela 4 - Relação de genótipos relatados em catarrinos.....	41
Tabela 5 - Relação de genótipos relatados em platirrinos.....	41
Tabela 6 - Divisão dos gêneros, distribuição no dossel florestal e alimentação dos primatas neotropicais.....	43
Tabela 7 - Marcadores utilizados para genotipagem por PCR-RFLP e seus respectivos genes, cromossomos e sequência de oligonucleotídeos.....	60
Tabela 8 - Distribuição da frequência de diagnósticos de toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre de acordo com o gênero. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	65
Tabela 9 - Características epidemiológicas de primatas neotropicais recebidos e diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	66
Tabela 10 - Distribuição dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, em função do tipo de ocorrência (individual ou em surtos). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	68
Tabela 11 - Distribuição dos órgãos/tecidos de primatas neotropicais avaliados, em função da quantidade de casos recebidos, casos com presença de parasitos compatíveis com <i>T. gondii</i> , casos excluídos por autólise e casos com avaliação histopatológica completa. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	71
Tabela 12 - Distribuição dos primatas neotropicais analisados em função dos órgãos/tecidos avaliados e a frequência de observação de formas parasitárias de <i>T. gondii</i> analisadas em HE nas famílias Atelidae e Cebidae. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	71
Tabela 13 - Distribuição das alterações histopatológicas hepáticas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	73
Tabela 14 - Distribuição das alterações histopatológicas esplênicas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo	

de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	77
Tabela 15 - Distribuição das alterações histopatológicas renais avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	80
Tabela 16 - Distribuição das alterações histopatológicas pulmonares avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	83
Tabela 17 - Distribuição das alterações histopatológicas cardíacas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	86
Tabela 18 - Distribuição das alterações histopatológicas encefálicas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	89
Tabela 19 - Distribuição do número absoluto dos órgãos/tecidos de primatas neotropicais avaliados com toxoplasmose, em função da quantidade total de recebidos, total incluídos na análise IHQ e total de imunomarcados. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	91
Tabela 20 - Distribuição de casos conforme a intensidade das imunomarcações hepática e esplênica para <i>T. gondii</i> em primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	92
Tabela 21 - Resultado dos alelos amplificados de cada um dos marcadores utilizados para genotipagem de <i>T. gondii</i> das amostras extraídas a partir de material em parafina de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	92
Tabela 22 - Resultado dos alelos amplificados de cada um dos marcadores utilizados para genotipagem de <i>T. gondii</i> das amostras extraídas a partir de material congelado de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	94
Tabela 23 - Associação entre a determinação de um novo genótipo de <i>T. gondii</i> e a família de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020 .....	95

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Boxplot de associação entre a intensidade da imunomarcção hepática para <i>T. gondii</i> e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real (qPCR) em primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	95
Gráfico 2 - Boxplot de associação entre determinação de um novo genótipo e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real (qPCR) para <i>T. gondii</i> das amostras de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.....	96

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros analisados conforme os achados histopatológicos de cada um dos órgãos .....	56
Quadro 2 - Graduação da imunomarcção hepática e esplênica .....	58
Quadro 3 - Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores e da sonda empregados na PCR em tempo real, juntamente com o nome adotado no NPQ/IAL .....	60

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Dados epidemiológicos, descrições anatomopatológicas e resultados moleculares de cada um dos casos estudados.....	132
Anexo B - Imagens dos géis de eletroforese da genotipagem por PCR-RFLP referente às amostras completamente genotipadas.....	195
Anexo C - Outros achados histopatológicos.....	196
Anexo D - ANOVA de fator único referente à associação entre o grau de imunomarcção hepática para <i>T. gondii</i> e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real.....	197
Anexo E - ANOVA de fator único referente à associação entre o sucesso da genotipagem os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real .....	198

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CEMACAS	Centro de manejo e conservação de animais silvestres
CETAS	Centros de triagem de animais silvestres
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CITES	Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção
cPCR	Reação em cadeia de polimerase convencional
CPRJ	Centro de primatologia do Rio de Janeiro
Cq	Quantidade de ciclos
CT	Valor de threshold
DAB	3,3' tetrahidrocloreto diaminobenzidina
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FA	Fosfatase alcalina
FI	Forma infectante
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HD	Hospedeiro definitivo
HE	Hematoxilina e eosina
HI	Hospedeiro intermediário
HRP	Horseshoe peroxidase
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
LAPCOM	Laboratório de patologia comparada
MK	Marcador
MLST	Sequenciamento de multilocus
NA	Não-amplificado
NAP	Núcleo de Anatomia Patológica
nested-PCR	Reação em cadeia de polimerase aninhada
NI	Não informado
NPQ	Núcleo de Patologia Quantitativa

OBS	Observação
PAS	Ácido periódico de Schiff
PB	Paraíba
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia de polimerase associada com o polimorfismo de fragmentos de DNA
PNH	Primata não-humano
PNT	Primata neotropical
PPP	Período pré-patente
PR	Paraná
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
ROP	Roptrias
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SP	São Paulo
TGF	Fator de transformação do crescimento
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ToxoDB	Banco de dados virtual com informações concernentes ao parasita <i>Toxoplasma gondii</i>
UF	Unidade federativa
USP	Universidade de São Paulo
VP	Vacúolo parasitóforo
WGST	Sequenciamento completo do genoma

## LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
*	Asterisco
$\beta$	Beta
g	Gramas
°C	Graus Celsius
kg	Kilogramas
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
™	Marca comercial
®	Marca registrada
<	Menor
$\leq$	Menor ou igual
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
mg	Miligramas
mm	Milímetro
$\text{mm}^2$	Milímetro quadrado
mM	Milimolar
N	Número absoluto de animais
pb	Pares de bases
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
p	Probabilidade de significância
km	Quilômetro
→	Seta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO DA ETIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE.....	27
2.2 OS CICLOS DE VIDA DO PARASITA <i>TOXOPLASMA GONDII</i> , PATOGENIA E CURSO CLÍNICO DA TOXOPLASMOSE .....	28
2.3 TOXOPLASMOSE E O ESTUDO DAS ZOONOSES .....	35
2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	37
2.5 OS PRIMATAS NEOTROPICAIS .....	42
2.6 TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS NEOTROPICAIS E A IMPORTÂNCIA DA VIGILÂNCIA PASSIVA DE FAUNA SELVAGEM.....	46
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS .....	54
4.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS.....	54
4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E HISTOPATOLOGIA.....	54
<b>4.3.1 Processamento histológico.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.2 Histopatologia .....</b>	<b>55</b>
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	57
<b>4.4.1 Processamento imuno-histoquímico.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.2 Avaliação da marcação imuno-histoquímica .....</b>	<b>57</b>
4.5 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR .....	59
<b>4.5.1 Extração de DNA .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2 PCR em tempo real .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.3 Genotipagem por Nested-PCR-RFLP.....</b>	<b>60</b>
4.6 ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	64
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>

5.1 ANIMAIS ESTUDADOS .....	65
5.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS .....	65
5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	70
<b>5.3.1 Achados hepáticos .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.2 Achados esplênicos.....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.3 Achados renais .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3.4 Achados pulmonares.....</b>	<b>82</b>
<b>5.3.5 Achados cardíacos .....</b>	<b>85</b>
<b>5.3.6 Achados encefálicos.....</b>	<b>88</b>
5.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	91
5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR .....	92
<b>5.5.1 PCR em tempo real .....</b>	<b>92</b>
<b>5.5.2 Genotipagem por PCR-RFLP.....</b>	<b>92</b>
5.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS DIFERENTES ABORDAGENS EMPREGADAS .....	94
<b>5.6.1 Características epidemiológicas e genotipagem por PCR-RFLP .....</b>	<b>94</b>
<b>5.6.2 Características imuno-histoquímicas e PCR em tempo real.....</b>	<b>95</b>
<b>5.6.3 PCR em tempo real e genotipagem por PCR-RFLP .....</b>	<b>96</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA .....	97
6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	100
6.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	103
6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR .....	104
<b>6.4.1 PCR em tempo real .....</b>	<b>104</b>
<b>6.4.2 Genotipagem por PCR-RFLP.....</b>	<b>107</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ordem Primates, sendo composta por indivíduos que apresentam características fisiológicas, anatômicas e genéticas entre si, compartilha uma ampla gama de patógenos (GARDNER; LUCIW, 2008), fazendo com que esses animais sirvam como modelo de estudo para muitas doenças infecciosas de interesse para a saúde humana.

O Brasil é território ocupado pela mais rica fauna primatológica mundial, compondo aproximadamente 20% de todas as espécies e subespécies de primatas existentes (VIDAL, 2012); porém, pouco ainda se conhece sobre as doenças que acometem os primatas neotropicais (VERONA; PISSINATTI, 2014).

Dentre as doenças zoonóticas compartilhadas entre os/as humanos/as e os demais indivíduos da ordem Primates, a toxoplasmose ganha destaque, com estimativa de que 30 a 50% da população humana atue como hospedeira assintomática (FLEGR et al., 2014). A toxoplasmose é caracterizada como uma doença clássica no escopo da “Saúde Única”, interferindo no equilíbrio das esferas humana, animal e do ecossistema (AGUIRRE et al., 2019) e tem como agente etiológico o protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Especialmente tratando-se de primatas neotropicais (PNT), classicamente essa enfermidade cursa, para a maioria dos gêneros, com um desfecho agudo e fatal (EIPHANIO, 2001; EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; CASAGRANDE et al., 2013). No entanto, os estudos acerca da toxoplasmose em PNTs baseiam-se quase que exclusivamente em amostragens oriundas de indivíduos mantidos sob cuidado humano em cativeiro (ASSUNÇÃO, 2020), sendo que para esta população a toxoplasmose é uma das mais impactantes enfermidades infecciosas conhecida (CATÃO-DIAS; EIPANHIO; KIERULFF, 2013). Por outro lado, pouco se sabe sobre o desenrolar e características epidemio-patológicas dessa enfermidade em PNTs de vida livre (DUBEY, 2022).

Apesar de ser um protozoário monoespecífico, o *T. gondii* se subdivide em genótipos; e, estudos apontam para uma alta diversidade genética deste parasita centrada na América do Sul (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No entanto, os inquéritos acerca dos genótipos presentes em PNTs ainda são escassos (DUBEY, 2022).

Considerando o impacto que a toxoplasmose apresenta para distintos grupos de PNTs mantidos sob cuidados humanos em cativeiro, a escassez de informações sobre esta enfermidade em populações de PNTs em vida livre, e a expressiva diversidade genética que este parasita exhibe na América do Sul, o presente trabalho investigou a ocorrência da toxoplasmose e suas características epidemiológicas, histopatológicas, imuno-histoquímicas e moleculares em amostras de PNTs encaminhadas para diagnóstico de febre amarela ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, tendo como objetivo contribuir para o conhecimento acerca desta importantíssima enfermidade nestes animais, especialmente aqueles em vida livre.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, estão compiladas informações relevantes e atualizadas encontradas na literatura científica sobre toxoplasmose, PNTs, e também acerca da intersecção 'toxoplasmose em primatas', com o objetivo de contribuir para o entendimento dos resultados e da discussão expostas neste trabalho.

### 2.1 CONTEXTO HISTÓRICO DA ETIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

A primeira descrição de toxoplasmose ocorreu de forma simultânea (WEISS; DUBEY, 2009), no ano de 1908, em animais, em dois pontos distintos do globo: no Brasil, por Alfonso Splendore (1871-1953), e na Tunísia, por Charles Nicolle (1866-1936) e Louis Manceaux (1865-1934). Ambas as equipes imaginaram inicialmente estarem diante de animais infectados por *Leishmania* spp. (DUBEY, 2008; CATÃO-DIAS; EIPHANIO; KIERULFF, 2013).

O relato da Tunísia se deu a partir de tecidos de um gundi comum/gundi norte-africano (*Ctenodactylus gundi*), animal que era objeto de pesquisa de leishmaniose no laboratório de Charles Nicolle, então sediado no Instituto Pasteur, na Tunísia. Com a ideia de tratar-se de corpos de *Leishmania* spp., os autores publicaram em 26 de outubro de 1908, essa primeira descrição (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). Em 1909, os pesquisadores então perceberam diferenças morfológicas, e decidiram nomear tal recém-descoberto parasita com o nome *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909), sendo a etimologia a seguinte:

- toxo = de origem grega, *toxon*, curvo/em forma de arco;
- plasma = do grego, *plasma*, vida/criatura;
- gondii = referência ao hospedeiro em que o parasita foi encontrado [assim, acredita-se que a divergência entre o nome da espécie do hospedeiro/roedor e do parasita decorreu de um erro de grafia - (DUBEY, 2008; FERGUSON, 2009)].

Alfonso Splendore, italiano de nascença, era médico e atuou como clínico, cirurgião e diretor no Hospital Humberto Primo (onde também fundou o laboratório bacteriológico) e no Hospital da Real Sociedade de Beneficência Portuguesa de São Paulo (MEIRA, 2010; VITALIANO, 2012). Foi colega do Adolpho Lutz e atuou em

estudos realizados no Instituto Bacteriológico do Estado de São Paulo [denominado Instituto Adolfo Lutz três meses após a morte de Adolpho Lutz – nome mantido até os tempos atuais (BENCHIMOL; SÁ, 2005)]. O relato brasileiro decorreu de tecidos de um coelho necropsiado por ele, que evoluiu para óbito em decorrência de um quadro infeccioso agudo (SPLENDORE, 1908). O exame microscópico de diferentes tecidos e órgãos mostrou a presença do que ele chamou de *speciali corpuscoli*. Os mesmos tecidos foram enviados para reanálise ao Dr. Stanislaus von Prowazek (SPLENDORE, 1908), protozoologista, que naquele momento estava trabalhando no Instituto de Manguinhos - atual Instituto Oswaldo Cruz (SOUZA; BELFORT, 2014). Essa observação foi publicada como comunicação em 16 de julho de 1908.

Inicialmente, devido às evidências da época, os pesquisadores mantiveram a existência de *T. gondii* - em referência ao gundi comum - e *T. cunicula* ou grafado em alguns trabalhos *T. cuniculli* - em referência ao coelho (MEIRA, 2010; SOUZA; BELFORT, 2014). Posteriormente, novos estudos mostraram tratar-se de um parasita monoespecífico - isto é, gênero com apenas uma espécie - e que afeta diferentes tecidos de variados animais (mamíferos e aves), mantendo-se então a escolha pelo nome *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 2008; SILVA, 2016b).

Esse parasita foi classificado como coccídeo somente ao longo das décadas de 1960 e 1970 (FERGUSON, 2009). Em contraponto, coccídeos foram os primeiros protozoários descobertos e atualmente representam o grupo de parasitas mais importante em animais (DUBEY, 2010).

## 2.2 OS CICLOS DE VIDA DO PARASITA *Toxoplasma gondii*, PATOGENIA E CURSO CLÍNICO DA TOXOPLASMOSE

Não à toa o *T. gondii* foi descoberto simultaneamente em dois pontos distintos do globo; hoje, sabe-se que este é um parasita cosmopolita (FERREIRA et al., 2011) e um coccídeo intracelular (CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Além de ser monoespecífico (DUBEY, 2008; SILVA, 2016b), este patógeno também engloba outras exclusividades: apresenta como hospedeiro definitivo (HD) somente os felídeos - selvagens ou domésticos (DUBEY, 2009a) e, apesar de apresentar ciclo de vida heteróximo (teoricamente dependendo obrigatoriamente de dois hospedeiros), a ingestão de cistos teciduais por hospedeiros intermediários (HI's) de

hábitos carnívoros/onívoros/saprofágicos permite que o ciclo infeccioso se complete, anulando a obrigatoriedade de recombinação – sendo então considerada a existência de um ciclo heterógeno facultativo, e este agente um protozoário polixeno (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; FERREIRA; VITOR, 2014).

Em contraponto aos seus traços de exclusividade, virtualmente, este parasita apresenta o poder de infectar todos os animais de sangue quente/endotérmicos (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; HOSSEINI et al., 2019): mamíferos e aves. Ainda, em mamíferos, este agente é capaz de infectar todas as células nucleadas (o que exclui a possibilidade da infecção de hemácias). No entanto, devido ao fato das hemácias serem nucleadas nas aves, todas as células dos animais que compõem essa classe são passíveis de serem infectadas pelo *T. gondii* (WOLFSON, 1941; MANWELL et al., 1945; VITALIANO, 2012). No entanto, alguns autores relatam o encontro de formas parasitárias de *T. gondii* em eritrócitos imaturos de mamíferos (EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003).

A classificação taxonômica (Tabela 1) completa do *T. gondii* só foi finalizada cerca de meio século depois da sua descoberta, no terço distal do século XX (DUBEY, 2010).

Tabela 1 - Classificação taxonômica do *T. gondii*.

Classificação	
Filo	Apicomplexa (Levine, 1970)
Classe	Sporozoasida (Leukart, 1879)
Subclasse	Coccidiasina (Leukart, 1879)
Ordem	Eimeriorina (Leger, 1911)
Família	Toxoplasmatidae (Biocca, 1956)
Gênero	Toxoplasma (Nicolle and Manceaux, 1909)

Fonte: Dubey (2010).

Legenda: As citações entre parênteses indicam o detalhamento dos pontos históricos da determinação da taxonomia do *Toxoplasma gondii*.

O *T. gondii* apresenta diferentes nomes conforme a fase do ciclo em que está/é observado. Podemos resumir as formas envolvidas nos ciclos conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Definição resumida das formas envolvidas nos ciclos do *T. gondii*.

Forma	Definição
Esporocisto	Cisto observado no interior de oocistos maduros
Esporozoíto	Forma infectante (FI) presente nos esporocistos de oocistos maduros
Taquizoíto	De origem grega, onde <i>tachos</i> significa rápido. FI vista em fluidos corporais e na transmissão transplacentária [estes ultrapassam barreira feto-placentária e proliferam-se nos tecidos do feto que não possuem maturidade imunológica (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005), resultando em lesões oculares, neurológicas ou aborto, dependendo da fase de desenvolvimento]
Bradizoíto	Do grego <i>brady</i> , lento. FI encontrada em cistos teciduais
Cisto tecidual	Presente em órgãos e tecidos de HD's e HI's cronicamente infectados. Representa a FI responsável pela infecção através da ingestão de órgãos/tecidos crus ou malcozidos
Oocisto imaturo	Forma eliminada nas fezes dos felídeos
Oocisto maduro	Oocisto que foi eliminado nas fezes de felídeos e que esteve esporulando no meio ambiente de um a cinco dias (HILL; DUBEY, 2002); apresenta dois esporocistos em seu interior, cada um deles com quatro esporozoítos. É uma FI que pode contaminar o ambiente e a superfície de alimentos consumidos crus, fômites, animais invertebrados, água ou aerossóis
Esquizonte	Forma parasitária intra-enterocitária. Tipo A: encontrado de 12 a 18 horas após a ingestão da FI, na lâmina basal ou logo abaixo dela, sendo negativo para ácido periódico de Schiff (PAS) e Giemsa positivo Tipo B: surge de 12 a 54 horas após a ingestão da FI, sendo PAS positivo e localizado em um grande vacúolo parasitóforo (VP) intra-enterocitário. É o único tipo de esquizonte que apresenta divisão celular por endodiogenia, os demais esquizontes (A, C, D e E) se multiplicam por endopoligenia Tipo C: aparece de 24 a 32 horas após a ingestão da FI, sendo PAS positivo Tipo D: surge de 32 horas a 15 dias após a ingestão da FI, que se situam em enterócitos presentes na base dos vilos, e após 40 horas dividem-se, por divisão nuclear assimétrica, em múltiplos núcleos Tipo E: pode ser observado de três a 15 dias após a ingestão da FI, sendo um estágio pré-gametogênese
Microgameta	Gameta masculino
Macrogameta	Gameta feminino

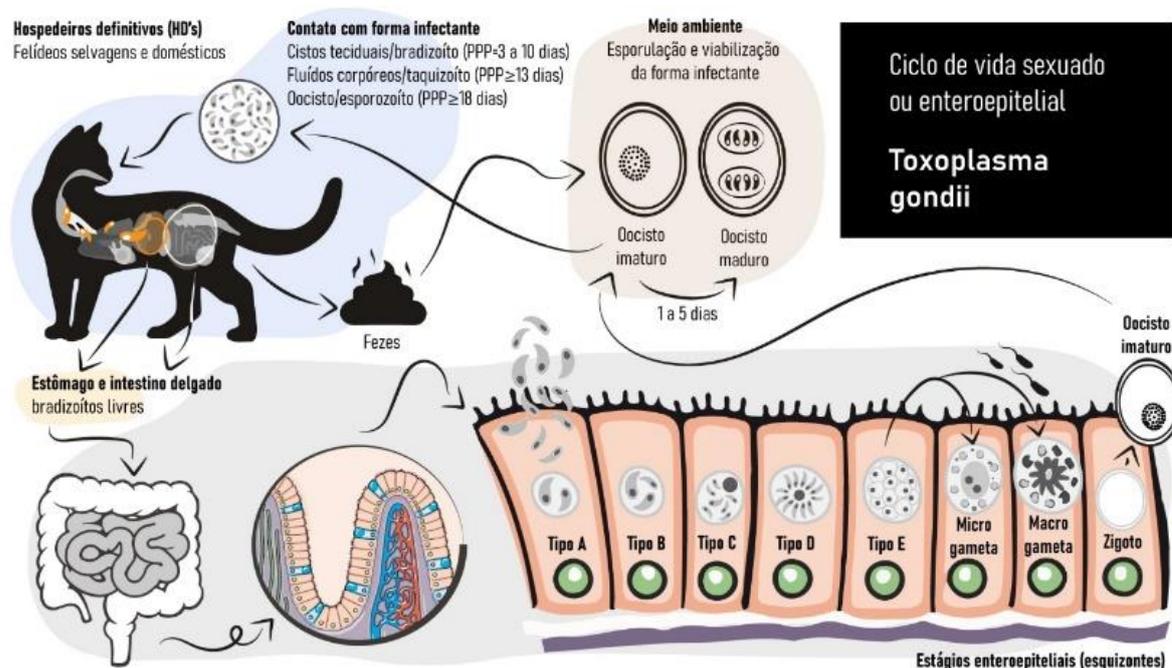
Fonte: arquivo pessoal. FI = Forma infectante; HD = Hospedeiro definitivo; HI = Hospedeiro intermediário; VP = Vacúolo parasitóforo.

Os felídeos são considerados hospedeiros completos ou definitivos por apresentarem o ciclo “enteroepitelial” (DUBEY, 1997) ou também chamado “coccidiano” (SILVA, 2016b), no qual ocorre a fase sexuada no citoplasma de enterócitos (Figura 1). Os felídeos podem apresentar também o ciclo “extra intestinal” (Figura 2), isto é, ciclo assexuado, que pode ser observado em todas as células nucleadas, além de enterócitos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O ciclo sexuada pode iniciar-se por qualquer FI: taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos, variando o período pré-patente (PPP) de acordo com a FI (ASSUNÇÃO, 2020). Após a ingestão de cistos teciduais, bradizoítos são liberados no estômago e no intestino delgado por conta da ação de enzimas proteolíticas (DUBEY, 2004). Os bradizoítos adentram os enterócitos e desencadeiam o

desenvolvimento dos estágios enteroepiteliais/esquizogonia, com formação de cinco tipos distintos de esquizontes, que são exclusivos deste agente (BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014). Durante a gametogênese, ocorre a formação do microgameta (gameta masculino), estruturas flageladas com núcleo pequeno, que quando saem dos enterócitos e alcançam a luz intestinal, migram por quimiotaxia até o macrogameta, sucedendo com a fecundação, e o zigoto/ovo - que se diferencia para oocisto imaturo e rompe o enterócito, sendo liberado junto ao bolo fecal dos felídeos (BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014). Felinos domésticos (*Felis catus*), após a ingestão de um único cisto tecidual, apresentam a capacidade de excreção de milhões de oocistos imaturos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os oocistos são excretados por no máximo três semanas, tendo o pico da eliminação de oocistos imaturos na primeira semana (JONES; DUBEY, 2010), podendo estes animais reeliminar os oocistos por até seis dias quando alimentados com carne contendo cistos teciduais (DUBEY, 1995). Desnutrição, imunossupressão ou infecções concomitantes podem induzir a uma nova liberação de oocistos imaturos (DUBEY, 1995; DUBEY; LINDSAY; LAPPIN, 2009). No entanto, estatisticamente, os oocistos foram encontrados nas fezes de menos de 1% da população de *F. catus* (DUBEY, 1994 *apud* LUCAS et al., 1999).

Figura 1 - Ciclo de vida “enteroepitelial”, também conhecido como “coccidiano” do *T. gondii*, e patogenia da doença. \*Obs.



Fonte: arquivo pessoal, adaptada de DUBEY (2010) e BARBOSA; MUNO; MOURA (2014). Feita com o software Adobe Illustrator™.

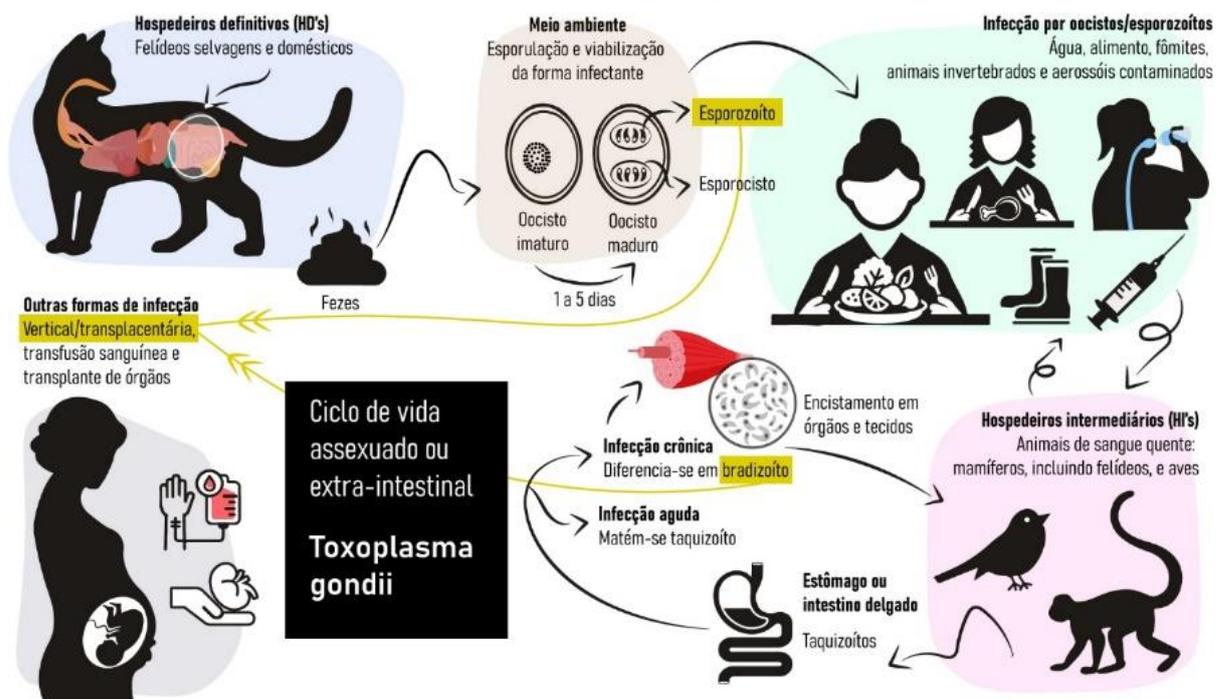
Legenda: PPP = período de pré-patência; FI = forma infectante.

Os/as humanos/as, outros mamíferos, além das aves, são considerados os hospedeiros incompletos ou intermediários, uma vez que o ciclo do *T. gondii* nestes animais restringe-se à reprodução assexuada do agente (Figura 2). Em outras palavras, o ciclo é obrigatoriamente “extra intestinal”, isto é, o ciclo não envolve os enterócitos como sítio de reprodução sexuada do parasita (FERREIRA et al., 2018).

A infecção no ciclo assexuado pode ocorrer por via horizontal (ingestão de cistos teciduais ou de oocistos maduros); por via vertical/transplacentária; ou por meio do leite, aerossóis, acidentes laboratoriais com diferentes FI; além de infecção por transplantes de órgãos e tecidos, transfusões sanguíneas, secreções corpóreas e ar (HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). O agente infecta aves e mamíferos (HI's), e reproduz-se de maneira assexuada. Assim, o parasita dá continuidade ao seu ciclo de vida com a transmissão de cistos teciduais entre os HI's (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No estômago e no intestino delgado, enzimas proteolíticas liberam esporozoítos na luz, os quais invadem os enterócitos por processo ativo e formam os VP's, onde se convertem para taquizoítos dando início a endodiogenia (FERGUSON, 2009). Como taquizoíto, o agente se dissemina focalmente, acessando o linfonodo mesentérico, a linfa, o sangue e se espalhando para outras células e tecidos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A endodiogenia diminui a velocidade após modulação imunológica que induz as citocinas IL-10, IL-12, IL-27 e TGF- $\beta$ , e pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup>; resposta essa que leva à conversão dos taquizoítos em bradizoítos e formação de cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; GADDI; YAP, 2007); deste modo, na infecção crônica há predomínio de cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY; JONES, 2008). Quando a FI é um bradizoíto, este percorre o mesmo caminho para atingir o leito sanguíneo/linfático, ou pode ser fagocitado e converter-se em taquizoíto, novamente alcançando o sangue ou a linfa e formando cistos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A transmissão vertical se dá pela infecção da mãe durante a gestação (MONTOYA; LIESENFELD, 2004), por meio da ingestão de oocistos maduros ou cistos teciduais, e conversão em taquizoítos.

Figura 2 - Ciclo de vida “extra intestinal” do *T. gondii* e patogenia da doença. \*Obs



Fonte: arquivo pessoal. Feita com o software Adobe Illustrator™.

Legenda: FI = forma infectante; HI = hospedeiro intermediário; VP = vacúolo parasitóforo; IL = interleucina; TGF = fator de transformação do crescimento.

A transmissão pode ser congênita/vertical/transplacentária, oro-fecal (seja pelo consumo de carne crua/mal passada de HI ou de HD, água ou alimentos habitualmente consumidos crus contaminados). Também há a possibilidade de transmissão por leite não pasteurizado, fômites, transfusão sanguínea ou por transplante de órgãos (DUBEY, 1986; S.VAZ et al., 2011). Ainda, na toxoplasmose aguda, taquizoítos podem ser encontrados em diversos tipos de secreções corpóreas como sêmen, urina, fezes, secreção vaginal, saliva, leite, secreções nasais e lágrimas (SAARI; RAISANEN, 1974); também há a possibilidade de infecção a partir da inalação de oocistos presentes no ar (RIZZO, 2000 *apud* EPIPHANIO, 2001).

No contexto do estudo da fauna selvagem como assunto central na toxoplasmose, alguns autores optam em dividir os ciclos da toxoplasmose de outra maneira, havendo um “ciclo doméstico”, caracterizado pelos gatos domésticos e um “ciclo selvagem”, caracterizado pelos felídeos selvagens, e elegendo os oocistos com um papel central, como elo de interligação entre estes dois ciclos (SHWAB et al., 2018) – pois acredita-se que esta forma infectante possa ser a mais importante na manutenção do ciclo, uma vez que essa pode contaminar o ambiente

(VANWORMER et al., 2013) e manter-se viável e infectante por mais de um ano em condições favoráveis (MARCIANO et al., 2020; HATAM-NAHAVANDI et al., 2021).

A infecção por *T. gondii* por meio de água contaminada têm ganhado importância principalmente no cenário nacional, uma vez que 49,1% dos brasileiros não têm acesso à rede de tratamento de esgoto (BRASIL, 2020); ainda as regiões com menores índices de saneamento básico exibem estreita relação com toxoplasmose endêmica (GARCIA BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Além disso, o Brasil possui uma ampla costa litorânea, que infelizmente também é agredida pela ausência de saneamento básico, recebendo o esgoto sem tratamento diretamente despejado em suas águas; interligado a isso, a cada ano cresce o número de relatos de mamíferos aquáticos, inclusive cetáceos brasileiros, infectados por *T. gondii*, indicando a viabilidade do agente em água marinha (DUBEY; JONES, 2008; GONZALES-VIERA et al., 2013; COSTA-SILVA et al., 2019).

O tipo e a severidade da doença vinculam-se ao local e intensidade da lesão, além do genótipo do parasita, e fatores como o estado imunológico do hospedeiro e a susceptibilidade do mesmo a desenvolver quadros graves da doença (DUBEY, 2010). Clinicamente, a toxoplasmose compreende quadros agudos ou crônicos. Na toxoplasmose aguda, as lesões predominantes são secundárias à necrose tecidual, que não é causada por toxinas e sim decorrente do reprodução intracelular de taquizoítos que acabam por romper as células hospedeiras (DUBEY, 2010). Na toxoplasmose crônica, que ocorre no hospedeiro que desenvolveu algum tipo de imunidade prévia, observa-se cistos teciduais predominantemente na musculatura esquelética e cardíaca, retina, cérebro, e mais raramente em fígado, pulmão e rins (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY, 2004; DUBEY; JONES, 2008).

Os tratamentos tem como cerne o uso de pirimetamina e sulfonamidas, que exercem ação sinérgica, bloqueando o ciclo do ácido folínico e a via metabólica envolvendo o ácido 4-aminobenzóico, respectivamente. Como a pirimetamina é tóxica, alguns autores preconizam uma combinação de trimetoprima e sulfametoxazol como possíveis alternativas à pirimetamina e sulfadiazina. Outras drogas como espiramicina, piritrexina, roxitromicina, clindamicina, ciclosporina A, ponazuril e atovaquona, também têm apresentado bons resultados em estudos experimentais, sendo esta última, a única efetiva para a destruição de cistos teciduais (DUBEY, 2010). Há ainda uma vacina disponível para ovinos composta por

taquizoítos livres, que é comercializada na Nova Zelândia e em alguns países do continente europeu (OIE, 2017).

### 2.3 TOXOPLASMOSE E O ESTUDO DAS ZOONOSES

Cerca de 75% dos agentes causadores de doenças zoonóticas em humanos/as circulam também em animais de vida livre (NAKAYIMA et al., 2014), ao passo que as doenças zoonóticas representam 58% (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005) de todos os 1407 patógenos catalogados causadores de doenças na espécie humana (GROGAN et al., 2014), lista esta que está em constante atualização.

A prevalência das zoonoses emergentes e reemergentes é mundialmente crescente, e os fatores incluem principalmente as modificações populacionais, demográficas e ambientais antrópicas sobre o meio ambiente e o aumento da interação do homem com animais selvagens (NAKAYIMA et al., 2014). Como exemplo, temos a recente pandemia de Covid-19, ainda de origem incerta, mas propensa como fruto da interação entre o homem e pangolins ou morcegos (WACHARAPLUESADEE et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Com o conhecimento dessa interligação das saúdes do homem, do meio ambiente e da fauna, vem ganhando destaque a chamada “*One Health*”, ou Saúde Única (RABINOWITZ et al., 2013; CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017). Assim, tanto o estudo das zoonoses quanto da fauna selvagem é fundamental para a saúde pública, em um contexto e abordagem em Saúde Única (SANTOS et al., 2021a), e a toxoplasmose está estritamente relacionada a este cenário.

O Brasil ainda é o país com a maior biodiversidade do mundo, albergando uma fauna selvagem diversa com mais de cem mil espécies conhecidas, compreendendo 70% das espécies animais e vegetais conhecidas no mundo (UNEP, 2021) sendo também o país com uma ampla diversidade genética de *T. gondii* (PENA et al., 2011). A toxoplasmose é uma anfixenose protozoótica cosmopolita, ou seja, é uma doença causada por um protozoário e que pode ser transmitida tanto das pessoas para os animais quanto dos animais para o ser humano, em todo o globo terrestre. Assim, dentre as doenças zoonóticas e

antropozoonoses envolvendo especificamente os primatas neotropicais, a toxoplasmose destaca-se por estar envolvida no contexto da saúde pública global.

Estima-se que aproximadamente 30-50% dos/as humanos/as sejam hospedeiros assintomáticos do *T. gondii* (FLEGR et al., 2014). No homem, quando sintomática, esta doença caracteriza-se por distúrbios neurológicos e oftálmicos (DUBEY, 2004), em imunossuprimidos e neonatos, respectivamente (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; FERREIRA et al., 2011a; CARNEIRO et al., 2013). Outro fator relevante para a nossa sociedade atual é a perda econômica que essa doença gera para a agroindústria - que inclusive é uma das principais atividades que contribuem para a economia brasileira, representando 27,9% do produto interno bruto (BRASIL, 2007), sendo o Brasil o maior produtor mundial de carne (GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L, 2017) - uma vez que doenças, em geral, são as mais temidas ameaças à estabilidade dos sistemas de produção animal, impactando perda de cerca de 20% em todo o mundo (ZANELLA, 2016); no contexto da toxoplasmose, as fêmeas das espécies de produção, como suínos e ovinos, frequentemente abortam quando desenvolvem a doença (DUBEY, 2008, 2009b; PAN et al., 2017), além de que, obviamente, muitas carcaças de animais assintomáticos são destinadas para o consumo humano ou outros HI's, servindo de fonte de infecção e representando risco à saúde pública (DUBEY, 2010).

Estudos apontam que o Brasil, especificamente a Amazônia brasileira, exibe forte tendência a ser um epicentro em alguma próxima pandemia (CASTRO et al., 2019; ELLWANGER et al., 2020), devido à grande devastação que este bioma tem sofrido, especialmente nos últimos anos, havendo inclusive uma correlação desse apontamento de um possível “hotspot” amazônico com a diversidade de PNT existente em nosso território nacional (PEDERSEN; DAVIES, 2009). Ainda se tratando de Amazônia, o bioma amazônico alberga genótipos altamente virulentos de *T. gondii*, que têm a capacidade de irem na contramão do curso natural da toxoplasmose em humanos, tornando doentes homens imunocompetentes – processo esse chamado de “toxoplasmose aguda severa” (DEMAR et al., 2012; BLAIZOT et al., 2020).

## 2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Toxoplasma gondii*

Apesar de ser um agente parasitário monoespecífico, o *T. gondii* divide-se em centenas de genótipos ou cepas (SU et al., 2012). Com a disponibilidade de técnicas biomoleculares para análise de material genético, foi possível uma melhor compreensão das diferenças e o processo evolutivo do parasita (CHIEBAO, 2016). A técnica mais amplamente utilizada para genotipagem de *T. gondii* é a Reação em Cadeia da Polimerase associada com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA (sigla em inglês: PCR-RFLP), devido ao baixo custo quando comparada com outras técnicas utilizadas, como microssatélites e sequenciamento (tipagem molecular por sequenciamento de multilocus – MLST, e tipagem por sequenciamento completo do genoma – WGST). A PCR-RFLP emprega enzimas bacterianas de restrição que reconhecem e clivam pequenas sequências específicas do DNA, de quatro a oito bases, que quando analisadas por eletroforese em gel de agarose, apontam bandas de diferentes pesos moleculares, sendo que com estas informações é possível caracterizar o genótipo do parasita (CLARK; RUSSELL, 1997).

Com os primeiros estudos moleculares, embasados em amostras provenientes de ocorrências no hemisfério Norte, essencialmente na América do Norte e na Europa, foi proposta a existência de 3 linhagens comuns: I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995). Os genótipos de linhagens comuns, presentes no hemisfério Norte, também chamados de genótipos clonais ou arquétipos, exibem idênticas combinações de alelos em seus 10 marcadores utilizados na PCR-RFLP [SAG1, SAG2 (5' + 3' SAG2 + alt. SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico], devido ao predomínio de reprodução assexuada nessas regiões, dando origem a três diferentes genótipos, havendo recentemente autores que consideram a existência de um quarto genótipo clonal (tipo 12) na América do Norte (KHAN et al., 2011)]. A partir da descoberta dessas três linhagens iniciais, estudos de virulência foram realizados, por meio de bioensaios/estudos experimentais, em camundongos, sendo as 3 linhagens classificadas da seguinte forma, conforme as respectivas virulências observadas (APPLEFORD; SMITH, 2000; DARDÉ, 2008; SULLIVAN; SMITH; JOYCE, 2009; SHWAB et al., 2018):

- Tipo I: muito patogênicas, resultando na morte rápida de camundongos (intervalo de 2 a 3 semanas), após a inoculação com apenas um parasita viável;

- Tipo II: moderadamente virulentas, causando infecção crônica e formação de cistos teciduais (cistogenia), sendo a dose letal de 102 a 104 parasitas;
- Tipo III: patogenicidade baixa, também considerada cistogênica, e relacionada à infecção crônica, com dose letal maior que 105 parasitas inoculados.

A modulação da interconversão e replicação do *T. gondii* parece estar relacionada a uma base genética para a virulência não só do próprio parasita, mas também ao hospedeiro; como exemplo, estudos em ratos Lewis (uma variação dos ratos Wistar) inoculados com genótipos tipo I (RH), apontaram uma refratariedade inata, inesperada, desses animais a esse genótipo, que é o mais virulento em camundongos. A resistência foi avaliada por sorologia (ELISA), PCR e análise histopatológica *post-mortem* (sem cistos teciduais observados). Ainda, os animais híbridos (F1) LEW/F344 e LEW/BROWN NORWAY também apresentaram resistência completa. Os autores ainda sugerem que a resistência, nesses animais, é dependente de células hematopoiéticas e parcialmente anulada pela neutralização do interferon gama endógeno (SERGENT et al., 2005).

Atualmente, existem alternativas para o estudo da virulência, que excluem a necessidade de bioensaios em camundongos, principalmente a partir das mensurações das proteínas de roptrias (proteínas do complexo apical formadas por diversas organelas, dentre elas, as roptrias - ROP) como ROP5, ROP16, ROP17 e ROP18 (HAMILTON et al., 2019). Alguns estudos também indicam que um marcador adicional, conhecido como CS3, quando presente na PCR-RFLP indica a virulência do genótipo (PENA et al., 2008; SILVA et al., 2014).

O cenário da diversidade genética de *T. gondii* mudou a partir de estudos realizados com amostras do hemisfério Sul, onde descobriu-se uma ampla variedade de genótipos. Atualmente, são consideradas 6 clades (de “A” a “F”), das quais originam 15 haplogrupos (SU et al., 2012), dos quais originam 282 genótipos (DUBEY, 2022). Esta variedade de diferentes recombinações de alelos está vinculada possivelmente à maior recombinação sexuada nos hospedeiros definitivos (KHAN et al., 2007; MINOT et al., 2012); assim, os chamados genótipos atípicos recombinam diferentes alelos em cada marcador, inclusive havendo alelos atípicos (u-1, u-2, u-3) os quais também podem ser diferenciados pela técnica da PCR-RFLP (SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

Assim, tem-se os genótipos-padrão utilizados frequentemente em ensaios biomoleculares, conforme a tabela 3:

Tabela 3 - Genótipos-padrão utilizados comumente em trabalhos científicos com caracterização genotípica de *T. gondii*.

Alelo	Genótipo	Marcador(es)
I	#10: RH	Todos
II	#1: PTG	Todos
III	#2: CTG	Todos
u-1	#19: TgCatBr5	PK1
u-1	#17: MAS	c22-8 e SAG1
u-1	#66: COUGAR (TgCgCa1)	c29-2
u-2	#66: COUGAR (TgCgCa1)	PK1
u-3	#44: TgCkBr205	PK1

Fonte: arquivo pessoal, adaptada de Dubey (2022).

Dessa forma, em conjunto com as análises genotípicas presentes na literatura científica, tem-se atualmente que os continentes com a maior gama de genótipos são a Ásia e a América do Sul, sendo esta variedade ainda maior no continente sul-americano (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Na América Latina, o Brasil mostra ser o país com o maior número de genótipos conhecidos de *T. gondii*; atrelado a isso, o Brasil também é o país com a maior diversidade de espécies de felídeos selvagens neotropicais, albergando dez das 12 espécies que ocorrem do continente Sul-americano (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013). São propostas algumas outras hipóteses por SHWAB e colaboradores (2014), além da relação com a diversidade de HD's, a respeito da divergência da quantidade genótipos na América do Sul e nos demais continentes:

- Há aproximadamente 11 mil anos, houve a ascensão da agricultura, na Mesopotâmia, e essa prática pode ter levado a uma queda na diversidade genética de hospedeiros parasitários (devido à domesticação) e de agentes parasitários animais (ROSENTHAL, 2009), o que pode ter ocasionado o predomínio da expansão dos arquétipos. No entanto, não há dados suficientes acerca dos genótipos predominantes no Oriente Médio;
- Os genótipos podem ter sido introduzidos na América do Sul a partir do comércio marítimo, sendo que essas populações de *T. gondii* podem ter se expandido com pouca recombinação ou competição (LEHMANN et al., 2006).

Além disso, o ambiente dos navios, habitados por roedores, gatos domésticos e escravos, pode ter favorecido a ocorrência de repetidos ciclos com recombinação sexual, levando à diversas 'hiperendemias' dentro dos navios, que desembarcaram no continente Sulamericano (LEHMANN et al., 2006).

- O clima tropical, úmido e quente, pode favorecer que os oocistos sobrevivam por um tempo maior no meio ambiente (FRENKEL; RUIZ, 1981).

A linhagem clonal tipo II é predominante em todo o mundo (no ambiente doméstico e selvagem na Europa, na Ásia e na África). As exceções são: ambiente selvagem norte-americano, com predomínio de genótipos tipo 12 (KHAN et al., 2011; SHWAB et al., 2014); e a América do Sul, com predomínio de genótipos atípicos (MINOT et al., 2012). Ainda, vale ressaltar que no território continental do Brasil, nunca foi reportada a ocorrência da linhagem clonal tipo II (CHIEBAO, 2016), havendo relatos dessa linhagem somente na ilha de Fernando de Noronha (SILVA et al., 2017).

Essa maior diversidade de genótipos na América Latina tem sido apresentado como um desafio profilático, uma vez que existem relatos de brasileiros/as infectados/as por genótipos resistentes ao tratamento convencional com sulfadiazina e pirimetamina (BESSA et al., 2021); e de sul-americanos/as imunocompetentes desenvolvendo quadros pulmonares graves tipicamente conhecidos como "toxoplasmose aguda severa"; desta forma, atualmente a toxoplasmose é considerada uma doença negligenciada e emergente em países tropicais (CARME et al., 2002; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; NUNURA et al., 2010).

Trabalhos com gatos brasileiros apontam que os genótipos mais comuns no Brasil são: BrI (#6), BrII (#11), BrIII (#8) e BrIV (#17), sendo especialmente a BrI o mais encontrado em diferentes animais (PENA et al., 2008). Na população humana residente no estado de São Paulo, o genótipo #65 parece ser o mais prevalente (FERREIRA et al., 2011). Além de gatos, no Brasil já foram relatadas diversos genótipos em outras espécies animais, domésticas e selvagens, incluindo: galinhas, galinhas d'Angola, porcos, ovelhas, cabras, pombos, capivaras, ovelhas, cavalos, ratos ferais, coelhos, cães, ouriços, cetáceos, primatas não humanos do Velho Mundo (catarrinos), e especialmente, há diversos relatos em primatas neotropicais mantidos em cativeiro (DUBEY et al., 2012).

Em primatas não-humanos (PNHs), são relatados somente 16 genótipos, sendo somente dois de catarrinos (Tabela 4) e 10 destes genótipos oriundos de PNTs brasileiros (Tabela 5). Ainda, dois macacos sul-africanos genotipados (#3) não tiveram reportadas a espécie (SHWAB et al., 2018; DUBEY et al., 2021).

Tabela 4 - Relação de genótipos relatados em catarrinos.

Trabalho	Espécie	Quantidade de animais	Genótipo	Técnica	País	Referência
1	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulata</i> )	1	Novo	PCR-RFLP	China	(XIN et al., 2021)
2	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulata</i> )	1	#4	PCR-RFLP	Japão	(NISHIMURA et al., 2019)

Fonte: adaptada de Dubey (2021).

Legenda: detalhamento dos dois casos de catarrinos, ambos estudos asiáticos com macacos Rhesus, em que foram tipificados os genótipos de *Toxoplasma gondii*.

Tabela 5 - Relação de genótipos relatados em platirrininos.

Trabalho	Espécie	Quantidade de animais	Genótipo	Técnica	País	Referência
1	Guariba-de-mãos-ruivas ( <i>Alouatta belzebul</i> )	1	#13	PCR-RFLP	Brasil	(PENA et al., 2011; SHWAB et al., 2014)
2	Sauá ( <i>Callicebus</i> sp)	1	#36	PCR-RFLP	Brasil	(SANTANA et al., 2020)
3	Bugios ( <i>Alouatta</i> sp)	7	#11	PCR-RFLP e microsatélites	Brasil	(SANTANA et al., 2020)
4	Muriqui-do-Sul ( <i>Brachyteles arachnoides</i> )	1	#21	PCR-RFLP	Brasil	(SANTOS et al., 2018)
5	Macaco-de-Cheiro Boliviano ( <i>Saimiri boliviensis</i> )	1	#163	PCR-RFLP	Argentina	(PARDINI et al., 2015)
6	Macaco-de-cheiro-de-cabeça-preta ( <i>Saimiri vanzolinii</i> )	1	Novo	PCR-RFLP	China	(HUANG et al., 2018)
7	Macaco-de-cheiro-comum ( <i>Saimiri sciureus</i> )	6	3 amostras tipo II e 5 amostras não-tipo II	Microsatélites	Guiana Francesa	(CARME et al., 2009)
8	Macaco-de-cheiro (espécie não-informada)	4	#3	Microsatélites	África do Sul	(SHWAB et al., 2018)
9	Macaco-de-cheiro-comum ( <i>Saimiri sciureus</i> )	7	Tipo II	PCR-RFLP	Coréia do Sul	(OH et al., 2018)
10	Macaco-prego ( <i>Cebus apella</i> )	1	#9	PCR-RFLP	China	(CHEN et al., 2015)

Fonte: adaptada de Dubey (2021).

Legenda: ao todo, existem dez trabalhos com 30 platirrininos cujo genótipo foi estabelecido em platirrininos acometidos com toxoplasmose, sendo quatro destes trabalhos e um terço (10/30) do total de platirrininos genotipados provenientes do Brasil.

Há um banco de dados internacional que elenca os genótipos relatados nas mais diversas espécies, chamado ToxoDB, o qual indica a sequência de cada um dos genótipos conhecidos no seu conjunto específico de alelos com seus respectivos marcadores, em números ordinais previamente acompanhado de *hashtags*, alguns com nomes adicionais, frequentemente relacionados a estudos de virulência, hospedeiro ou cidade de origem do genótipo. Porém, este banco de dados encontra-se desatualizado, sendo o documento mais completo atualmente disponível na terceira edição do livro “*Toxoplasmosis of animals and humans*”, recém publicado, neste ano de 2022, pelo Dr. Dubey.

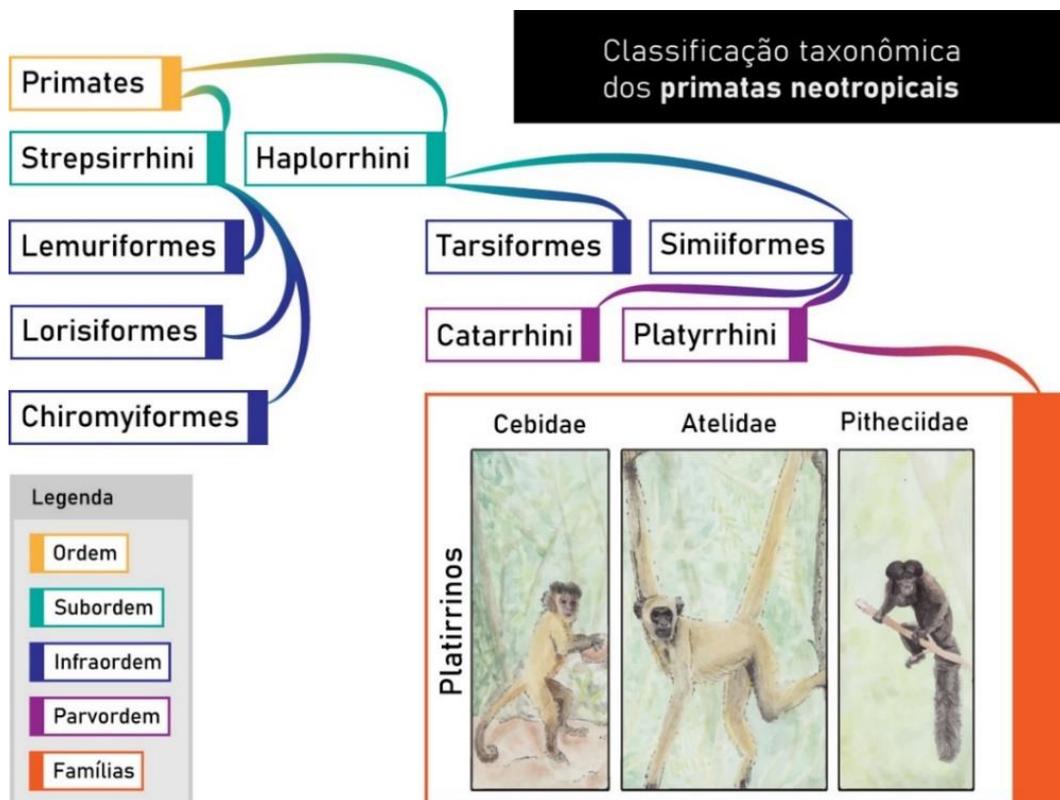
## 2.5 OS PRIMATAS NEOTROPICAIS

Os primatas neotropicais (PNTs) são mamíferos que se distribuem na região neotropical do sul do México (Trópico de Câncer) ao norte da Argentina (cerca de 10° ao sul do Trópico de Capricórnio) (HIRSCH et al., 2002). A ordem “Primates” ramifica-se em subordens, infraordens e parvordens, nas quais estão inseridos os PNTs. A classificação taxonômica dos PNTs está detalhada na figura 3. De acordo com um levantamento realizado em 2009, os PNTs dividem-se em 19 gêneros, 199 espécies e 5 famílias (RYLANDS, A. B. MITTERMEIER, 2009) – representando 31% dos primatas não humanos existentes (RYLANDS, A. B. MITTERMEIER, 2009 *apud* FUZESSY, 2013) e 10% das espécies de mamíferos encontradas na América do Sul (ALFARO, 2017). No entanto, existem algumas discrepâncias com relação à taxonomia dos PNTs, como, por exemplo, Perelman e colaboradores (2011) considerando a existência de 17 gêneros e 3 famílias, sendo esta última classificação a adotada neste presente estudo.

Os PNTs caracterizam-se morfologicamente pelos focinhos curtos e narinas voltadas para as laterais – que inclusive é o significado do nome do táxon, platirrino, onde “*platis*” significa achatado, e “*rhino*” significa nariz (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2006). Outras características morfológicas comuns aos PNTs incluem cauda longa, a qual muitas vezes é maior que o corpo – variando entre preênsil, semi-preênsil ou não-preênsil, dependendo do gênero; estes animais também compartilham o hábito de vida predominantemente arborícola (BICCA-MARQUES;

SILVA; GOMES, 2006; BRASIL, 2014a; VERONA; PISSINATTI, 2014; MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018).

Figura 3 - Classificação taxonômica dos primatas neotropicais.



Fonte: adaptada de Alfaro (2017) e Perelman et al., (2011).

Legenda: a Ordem “Primates” divide-se em duas subordens: “Strepsirrhinis” (da qual estão presentes os Lemuriformes, Lorisiformes e Chiromyiformes) e “Haplorrhini”. A subordem “Haplorrhini”, por sua vez, divide-se em duas infraordens: “Tarsiformes” e “Simiiformes”. A infraordem “Simiiformes” deriva duas parvordens: “Catarrhini” e “Platyrrhini”. Os primatas neotropicais são os animais da parvordem “Platyrrhini”. Os PNTs dão origem a três diferentes famílias: Atelidae, Cebidae e Pitheciidae.

Ainda, cada família pode ou não se ramificar em subfamílias, e depois, obrigatoriamente, ramificam-se em gêneros (conforme a tabela 6) e espécies. Os hábitos alimentares e a preferência de ocupação do estrato de dossel florestal são diversos dentre os PNTs, e estão elencados na tabela 6.

Tabela 6 - Divisão dos gêneros, distribuição no dossel florestal e alimentação dos primatas neotropicais.

Família	Gênero	Nome popular	Dieta	Estrato florestal de preferência	Referência
<b>Cebidae (9 gêneros)</b>	<i>Mico</i>	sagui da amazônia	Frutas, artrópodes, flores e exsudatos	Do dossel médio ao solo,	(FLEAGLE, 1999; BICCA-MARQUES;

	<i>Cebuella</i>	sagui-pigmeu	Exsudatos, artrópodes, frutas e pequenos vertebrados	níveis mais baixos da floresta	SILVA; GOMES, 2011) (SOINI, 1988; FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Callithrix</i>	sagui	Exsudatos, artrópodes, frutas, pequenos vertebrados, ovos, sementes e moluscos		(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Callimico</i>	mico-de-goeldi	Artrópodes, frutas, fungos e exsudatos		(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009)
	<i>Leontopithecus</i>	mico-leão	Frutas, artrópodes, exsudatos, flores e pequenos vertebrados		(FLEAGLE, 1999; KIERULFF et al., 2002; NORCONK et al., 2009)
	<i>Saguinus</i>	sagui-de-bigode	Artrópodes, frutas, exsudatos, folhas jovens e pequenos vertebrados		(SNOWDON; SOINI, 1988; FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Aotus</i>	macaco-da-noite	Frutas, folhas jovens, flores e artrópodes	Sem preferência por um determinado nível de dossel	(FLEAGLE, 1999; CUNHA, 2008; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Saimiri</i>	macaco-de-cheiro	Artrópodes, frutas, folhas jovens, flores, sementes, pequenos vertebrados e ovos	Níveis intermediários e mais baixos da floresta, eventualmente descendo ao solo	(BALDWIN; BALDWIN, 1981; BOINSKI, 1987; FLEAGLE, 1999; DEFLER, 2005; INGBERMAN; STONE; CHEIDA, 2008; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Cebus</i>	macaco-prego	Frutas, artrópodes, folhas jovens, sementes, flores, pequenos vertebrados e ovos	Dossel principal, descendo frequentemente para o sub-bosque ou para o solo durante a locomoção e/ou alimentação	(IZAWA, 1979; FREESE; OPPEHHEIMER, 1981; FRAGASZY; VISALBERGHI; FEDIGAN, 2004; NORCONK et al., 2009)
<b>Atelidae (4 gêneros)</b>	<i>Lagothrix</i>	macaco-barrigudo	Frutas, insetos, folhas jovens, flores, sementes	Níveis superiores do dossel principal, raramente descendo ao solo	(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Brachyteles</i>	muriqui	Folhas jovens e maduras, polpa de frutas, flores e sementes		(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; MENDES; SILVA; STRIER, 2010)
	<i>Ateles</i>	macaco-aranha	Polpa de frutas, folhas jovens e flores	Níveis mais altos da floresta, descendo ao solo eventualmente	(FLEAGLE, 1999; ZANON; REIS; FILHO, 2008; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Alouatta</i>	bugio	Folhas jovens e maduras, polpa de frutas e flores	A maioria das espécies preferem o dossel principal e níveis emergentes;	(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)

<b>Pitheciidae (4 gêneros)</b>	<i>Cacajao</i>	uacari	Sementes, polpa de frutas e flores	algumas espécies de áreas secas descem regularmente ao solo Partes superiores da floresta, eventualmente descendo ao solo para forragear	(RICKLI; REIS, 2008; NORCONK et al., 2009)
	<i>Chiropotes</i>	cuxiú	Sementes, polpa de frutas, artrópodes e flores	Níveis intermediários e superiores do dossel principal, raramente descendo ao solo	(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)
	<i>Pithecia</i>	parauacú	Sementes, frutas (inteiras, polpa ou arilos), folhas jovens, artrópodes e flores	Dossel médio e superior, eventualmente descendo ao solo para forragear	(FLEAGLE, 1999; NORCONK et al., 2009)
	<i>Callicebus</i>	sauá	Polpa de frutas, sementes, folhas jovens, flores e artrópodes	Dossel principal para o sub-bosque e raramente descendo para o solo	(FLEAGLE, 1999; BORDIGNON; SETZ; CASELLI, 2008; NORCONK et al., 2009; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011)

Fonte: adaptada de Catão-Dias et al. (2013). com classificação taxonômica de Perelman et al., (2011).

Socialmente, esses animais formam organizações que variam de pares, grupos com múltiplas fêmeas e um único macho, ou ainda grupos de 50 a 100 indivíduos com múltiplas fêmeas e múltiplos machos (ALFARO, 2017). O peso dos PNTs varia de aproximadamente 100g (sagui pigmeu) até mais de 10kg (atélídeos machos) (MITTERMEIER; RYLANDS; WILSON, 2014 *apud* ALFARO, 2017). Caracteristicamente, distribuem-se em diferentes biomas brasileiros, desde florestas tropicais e subtropicais (Amazônia, Mata atlântica) até os habitats secos (Caatinga) ou pantaneiros (Pantanal) (ALFARO, 2017). O Brasil é o país com a mais rica fauna primatológica mundial, compondo aproximadamente 20% de todas as espécies e subespécies de primatas existentes, de acordo com dados do ICMBio coletados em 2012 (VIDAL, 2012).

Apesar de nem todas as espécies de PNTs estarem diretamente ameaçadas de extinção, todos os PNTs apresentam algum grau de vulnerabilidade, uma vez que

estão listados na “Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção” (CITES), em seu apêndice II (VERONA; PISSINATTI, 2014). Ainda, atualmente, há uma queda no número populacional destes animais, devido a causas multifatoriais. Uma das causas recentemente relacionadas foi o último surto de febre amarela, concentrado principalmente no ano de 2017 (CAVALCANTE; TAUIL, 2017; FERNANDES et al., 2017).

Biologicamente, estes animais são importantes dispersores de sementes, inclusive podendo promover a regeneração natural de áreas perturbadas por ação antrópica (HEYMANN et al., 2019). Em contrapartida, os PNTs vêm sofrendo diretamente com o avanço dos/as humanos/as em seu habitat - e padecem as consequências desta expansão no ambiente (MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018). Além das consequências diretas e indiretas da antropização na vida, no habitat e nas populações desses animais, muitas vezes estes são alvo de tráfico (SANTOS et al., 2021b).

Para finalizar, no território brasileiro, tanto o óbito de primatas quanto a observação de PNHS adoecidos, estão listados na portaria ministerial MS/GM nº 104 de 25 de janeiro de 2011, como doença, agravo ou evento em saúde pública de notificação compulsória; podendo essa notificação ser realizada por qualquer indivíduo para secretaria municipal de saúde (BRASIL, 2014a).

## 2.6 TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS NEOTROPICAIS E A IMPORTÂNCIA DA VIGILÂNCIA PASSIVA DE FAUNA SELVAGEM

Apesar do Brasil ser o país com a mais rica fauna primatológica do mundo, pouco ainda se conhece sobre as doenças que acometem os PNTs (VERONA; PISSINATTI, 2014). O que é sabido é que PNTs podem ser acometidos por uma série de doenças, de diferentes causas: metabólicas, nutricionais, neoplásicas, ou infecciosas [bacterinas, virais, parasitárias (causadas por metazoários ou protozoários)] (MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018); estando dentro deste último grupo a toxoplasmose.

Historicamente, em relação aos PNHS, o primeiro relato de toxoplasmose ocorreu em um PNT, *Stentor seniculus* (conhecido atualmente como *Alouatta*

*senicula*), na Guiana Francesa, em 1916 (THEZÉ, 1916); revisto em 1971, por pesquisadores brasileiros (NERY-GUIMARÃES; FRANKEN; CHAGAS, 1971).

Os PNTs constituem um dos grupos animais altamente susceptíveis à quadros agudos e fatais de toxoplasmose; assim como lebres europeias, marsupiais da Oceania e os primatas de Madagascar da subordem Strepsirrhini (CATÃO-DIAS; EPIPANHIO; KIERULFF, 2013), especialmente quando se trata de PNTs mantidos em cativeiro (MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018).

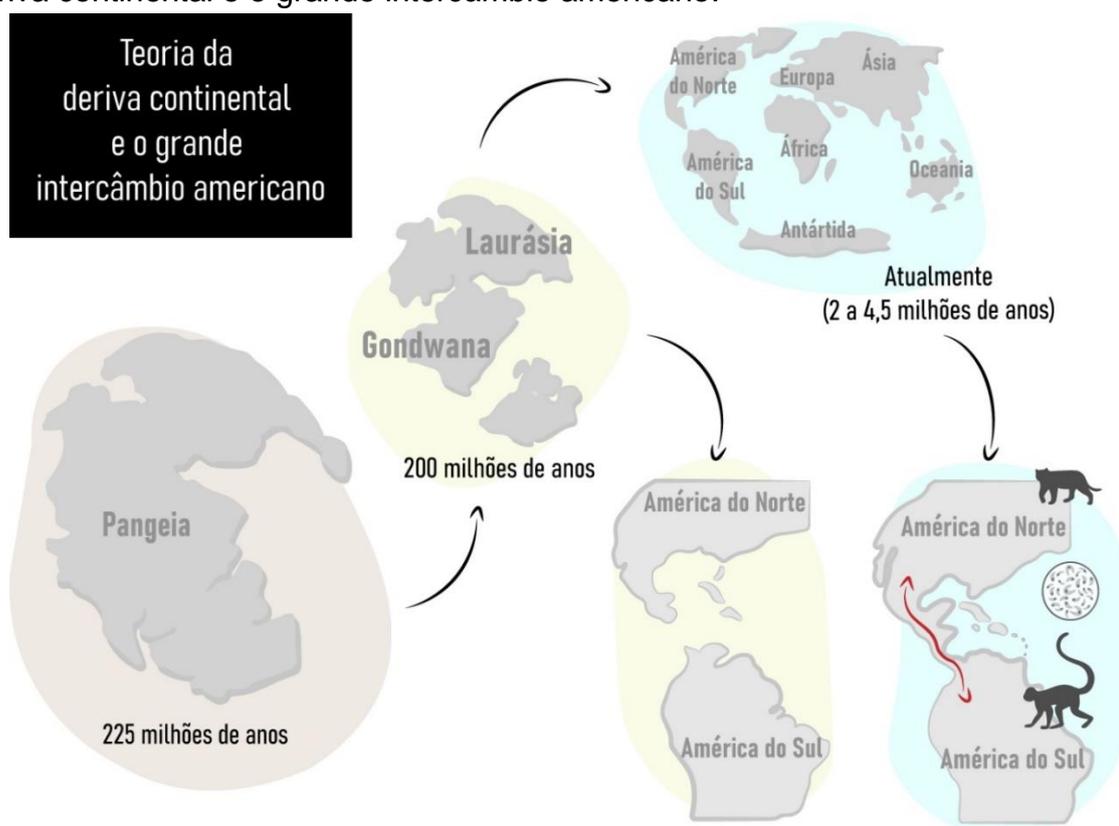
As razões para essa maior susceptibilidade dos PNTs são incertas. A baixa prevalência anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, especialmente em membros da subfamília Callitrichinae, pode ser um fator determinante para a alta susceptibilidade desses animais. Outras variáveis incluem a variabilidade dos genótipos (DUBEY, 2009a; DUBEY; SU, 2009), dose de infecção, e a possibilidade de recrudescência dos cistos (CATÃO-DIAS; EPIPANHIO; KIERULFF, 2013). Outra razão suposta, corroborando a hipótese da introdução do *T. gondii* no continente Sul-americano, baseia-se nas datas dos fósseis mais antigos destes animais, para recontar a história natural dos PNTs. Essa hipótese parte do pressuposto de que mamíferos [existentes há 220 milhões anos (REIS et al., 2006)], teriam aumentado a sua diversificação após a extinção dos dinossauros [há 66 milhões de anos (BRUSATTE et al., 2015; CONDAMINE et al., 2021)], em conjunto com o aumento de florestas devido à elevação da temperatura do planeta (GORE, 2003 *apud* REIS et al., 2006); surgindo há cerca de 50 milhões de anos, na África, os primeiros primatas (REIS et al., 2006), dos quais, alguns, há cerca de 45 milhões de anos, teriam feito a travessia do antigo atlântico sul – a qual apresentava um terço da extensão atual – em embarcações formadas por vegetação flutuante, dando origem aos que vieram a ser os PNTs (ARISTIDE et al., 2019), sendo os registros fósseis consistentes mais antigos de PNTs datando aproximadamente 20 a 25 milhões de anos atrás (PEREZ et al., 2013).

Em relação à história natural do planeta Terra, no que tange a teoria da deriva continental, ressalta-se a Pangeia, uma única massa continental que existiu há 225 milhões de anos; esta partiu-se para a formação de dois supercontinentes: Laurásia e Gondwana – período em que a América do Sul deixou de ser interligada com a América do Norte (há 200 milhões de anos) (GOIN et al., 2013). Há cerca de 2 a 4,5

milhões de anos atrás, houve a formação dos continentes que conhecemos atualmente, e o retorno da comunicação terrestre entre a América do Sul e a América do Norte, fenômeno este que causou o conhecido “grande intercâmbio biótico americano” (WEBB, 2006; GOIN et al., 2013).

O grande intercâmbio biótico americano resultou em eventos sucessivos de migração norte-sul de animais, e vice-versa, dispersando e compartilhando também patógenos (VICENTE; VERCAUTEREN; GORTÁZAR, 2021), sendo hipotetizado que uma forma ancestral de *T. gondii* tenha sido introduzida na América do Sul por meio da migração de carnívoros, como os felídeos, após o surgimento do istmo do Panamá, permitindo que um novo genótipo superasse a linhagem ancestral e sofresse uma dispersão pandêmica (WEBB, 2006; BERTRANPETIT et al., 2017). Assim, os PNTs teriam evoluído na América do Sul sem o contato com felídeos, os únicos HDs da toxoplasmose. A figura 4 ilustra a associação da história natural dos primatas neotropicais com a teoria da deriva continental e o grande intercâmbio biótico americano.

Figura 4 - História natural dos primatas neotropicais relacionada com a teoria da deriva continental e o grande intercâmbio americano.



Fonte: arquivo pessoal.

De acordo com CATÃO-DIAS, EPIPHANIO e KIERULFF (2013), as diferentes famílias de PNTs respondem de maneira distinta à infecção do *T. gondii*, conforme seus diferentes hábitos alimentares e preferência pela ocupação dos diferentes estratos florestais. Assim, são descritos três padrões de toxoplasmose em primatas neotropicais, cuja casuística é baseada em animais mantidos sob cuidados humanos em cativeiro:

- O padrão I é observado principalmente em indivíduos da subfamília Callitrichinae, caracterizado por um quadro severo com taxa de mortalidade próxima a 100%;
- O padrão II envolve animais das famílias Cebidae e Atelidae, sendo caracterizada pela ocorrência de surtos com quadros agudos e severos, com mortalidade variável (20-80%), havendo inquéritos sorológicos apontando a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em numa faixa de ~20-65% desses animais;
- O padrão tipo III é observado nos animais do gênero *Cebus*, sendo que esses indivíduos, diferentemente dos demais primatas neotropicais, apresentam frequentemente (~80%) titulação sorológica para *T. gondii*, com quadros cujo padrão morfológico é inespecífico, sendo raros os quadros fatais nesses animais (BOUER et al., 1999).

Os sinais clínicos são inespecíficos, frequentemente sendo observada dispneia (MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018), além de prostração, exsudato nasal espumoso, anorexia, hipotermia e vômitos (CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013). Quanto às lesões *post-mortem*, macroscopicamente, os PNTs apresentam (EPIPHANIO, 2001; EPIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018):

- Frequentemente (>70% dos casos): congestão e edema pulmonar;
- Achados comuns (~50% dos casos): esplenomegalia, linfadenite mesentérica, hepatomegalia, congestão cerebral e icterícia;
- Achados menos frequentes (<35% dos casos): congestão hepática.

Microscopicamente, os achados mais comuns são (EIPHANIO, 2001; MÄTZ-RENSING; LOWENSTINE, 2018): miocardite discreta, pneumonia intersticial necrotizante discreta a moderada ou pneumonia necrotizante fibrino-hemorrágica (CATÃO-DIAS; EIPHANIO; KIERULFF, 2013), edema e hemorragia pulmonares, linfadenite, hepatite necrotizante multifocal moderada, esplenite necrotizante moderada, nefrite intersticial discreta, adrenalite discreta, encefalite e gliose discretas. O infiltrado inflamatório presente nos órgãos é misto, e frequentemente observam-se formas parasitárias em meio às lesões necróticas.

Testes complementares podem ser empregados para a confirmação diagnóstica *post-mortem*, tais como imuno-histoquímica e PCR, além de cultura de tecido, isolamento ou inoculação em animal de experimentação (DUBEY, 2010; SOUZA; BELFORT, 2014).

Quando se trata de animais em vida livre, há poucos relatos de toxoplasmose nos PNTs (SANTOS et al., 2018); acredita-se que isso se dá pelos casos sub-documentados e sub-notificados, somados à dificuldade de obtenção de amostras viáveis e a falha para diagnósticos precisos (ASSUNÇÃO, 2020). Apesar dos poucos estudos, há evidências que favorecem fontes de infecção semelhantes às de cativeiro, além da predação de animais sinantrópicos infectados, como ratos (CASAGRANDE et al., 2013; SANTOS et al., 2018). Sabe-se que a soroprevalência em PNTs em vida livre tende a ser inferior àquela observada em animais mantidos sob cuidados humanos em cativeiro. Estudos de soroprevalência em *Cebus* spp. em vida livre apontou 30,2% de positividade (GARCIA et al., 2005). Um estudo na Costa Rica envolvendo os gêneros *Alouatta*, *Ateles*, *Saimiri* e *Cebus* relatou uma marcante discrepância na soroprevalência entre PNTs em vida livre (11.6%; 23/198) e PNTs mantidos em cativeiro (60%; 28/47) (NIEHAUS et al., 2020). Em um estudo brasileiro com 126 *Leontopithecus chrysomelas* em vida livre, nenhum apresentou soroprevalência (MOLINA et al., 2016). Um recente trabalho realizou e caracterizou o óbito de PNTs de vida livre, sendo: 18 *Callithrix penicillata* encontrados no Distrito Federal, 7 *C. penicillata* oriundos de Goiás e quatro de Tocantins, além de dois *Aotus azarae* do estado de Mato Grosso, com características histológicas e imuno-histoquímicas descritas em conjunto com outros quatro animais provenientes de cativeiro que também foram englobados no estudo (ASSUNÇÃO, 2020). Ainda, outro estudo, realizado em Pernambuco, a partir de

amostras de coração PNTs que evoluíram para óbito na região metropolitana de Recife, enviadas para a vigilância de raiva e de febre amarela, detectou a partir de PCR, 39 *Callithrix jacchus* de vida livre com toxoplasmose fatal (MELO et al., 2020).

É compromisso ético e moral da humanidade a manutenção da diversidade biológica e o conhecimento do estado sanitário dos animais (OIE, 2021). Para tal, a estruturação de uma vigilância laboratorial, com diagnóstico ágil e preciso dos patógenos nas amostras animais torna-se imperiosa (SANTOS et al., 2021a). Os resultados acerca do presente trabalho, que teve como base material fruto de vigilância passiva de fauna, cujas amostras foram enviadas para confirmação ou exclusão diagnóstica de febre amarela estabelecida no Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2017), serão expostos e discutidos ao longo desta dissertação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a compreensão da assinatura morfológica microscópica da toxoplasmose em PNTs de vida livre, assim como a epidemiologia e os genótipos envolvidos.

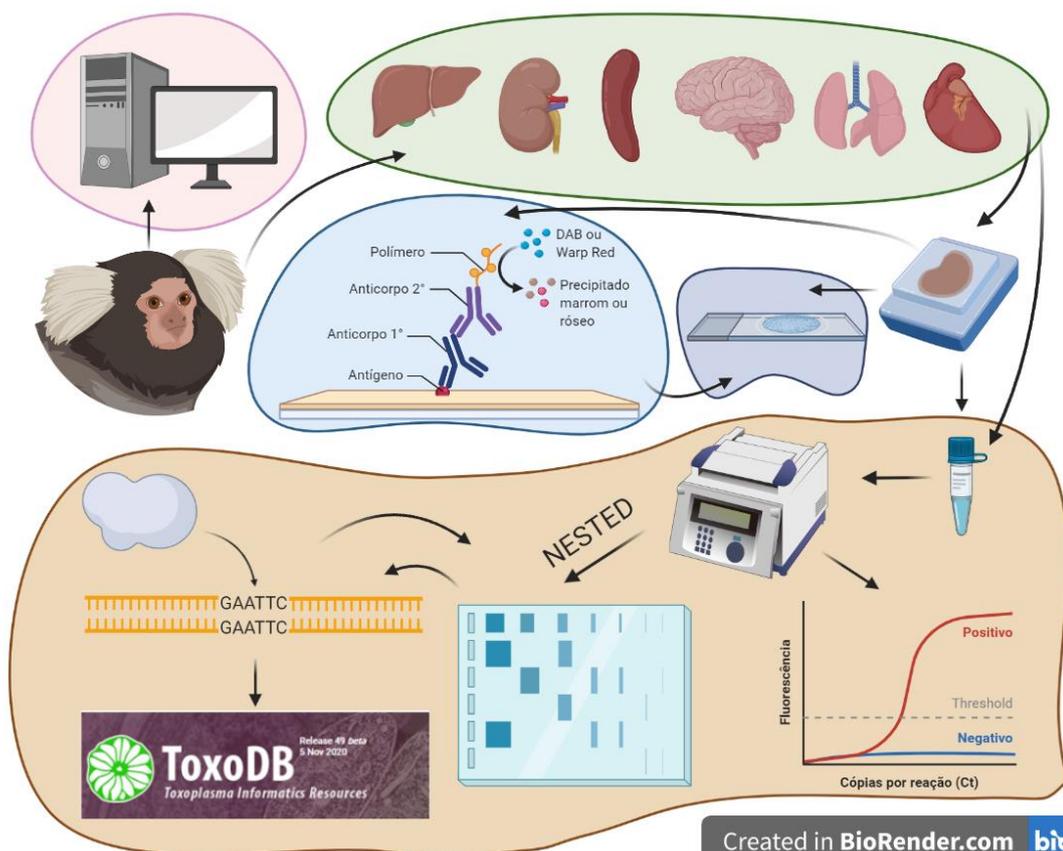
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar histopatologicamente as lesões toxoplasmose em PNTs dos gêneros *Alouatta* spp, *Callithrix* spp e *Brachyteles arachnoides*;
- b) Detectar a presença de *T. gondii*, por meio das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em tempo real;
- c) Relacionar os achados histopatológicos, imuno-histoquímicos e de PCR com dados epidemiológicos disponíveis nas fichas dos animais encaminhados para o Instituto Adolfo Lutz;
- d) Determinar a frequência de diagnóstico de toxoplasmose dentre os casos de PNTs encaminhados para o Instituto Adolfo Lutz;
- e) Mapear a distribuição geográfica dos casos diagnosticados;
- f) Determinar os genótipos de *T. gondii* circulantes em espécies de PNTs por técnicas moleculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os primatas neotropicais encontrados mortos em diferentes estados brasileiros foram necropsiados nas instituições parceiras do Instituto Adolfo Lutz (IAL), e tiveram os órgãos e tecidos frescos congelados e fixados em solução tamponada de formalina a 10% e enviados para o IAL juntamente com a ficha SINAN (a qual designa espaços para serem preenchidos dados epidemiológicos, clínicos e de macroscopia). A partir das amostras formolizadas recebidas no IAL, deu-se a confecção dos blocos parafinados, os quais permitiram a realização de lâminas histológicas e imuno-histoquímicas, além de extração de material para análise biomolecular. A análise biomolecular também se deu a partir de órgãos e tecidos frescos congelados naqueles animais cujas amostras emblocadas não estavam disponíveis; tal análise englobou PCR em tempo real e também PCR-RFLP, cujos resultados foram comparados com dados presentes no banco de dados ToxoDB e outras bases de dados que constam os genótipos. O esquema ilustrativo dos métodos empregados está representado na figura 5.

Figura 5 - Representação ilustrativa dos métodos empregados.



Fonte: arquivo pessoal – criado com auxílio do sítio [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

Legenda: a partir dos animais foram compilados dados epidemiológicos (em rosa) e coletadas amostras biológicas (em verde) em solução tamponada de formalina a 10% e/ou congeladas, que permitiram diferentes análises: histopatologia (em roxo), imuno-histoquímica (em azul), PCR em tempo real e genotipagem por PCR-RFLP (em amarelo).

#### 4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS

A seleção dos animais deu-se a partir do estudo de dados previamente tabulados em planilha Microsoft Excel™, cujo diagnóstico histopatológico e/ou imuno-histoquímico fosse sugestivo ou compatível com quadro de toxoplasmose pela análise de médicas/os veterinárias/os patologistas do Instituto Adolfo Lutz. Ainda, todos os casos contemplados no presente estudo foram revisados histopatologicamente pela autora e pela médica veterinária Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes, pesquisadora científica do IAL, previamente aos demais passos do estudo.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS

Foram tabulados em planilhas elaboradas por meio de Microsoft Excel™ os seguintes dados contidos nas fichas de encaminhamento: família, gênero, data de óbito, sexo, faixa etária, tipo de manutenção (cativeiro ou vida livre), tipo de ocorrência (surto ou individual), e local de morte (cidade e estado).

#### 4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E HISTOPATOLOGIA

##### 4.3.1 Processamento histológico

Todos os tecidos foram recebidos fixados em solução de formalina a 10%, por pelo menos 24 horas; posteriormente, foram submetidos ao processamento histológico convencional, com cortes de 5 µm, e corados pelas técnicas histoquímicas de Hematoxilina e eosina (HE), conforme processamento de rotina solidamente estabelecido no Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz

(NAP-IAL). O número de amostras avaliadas varia tecido a tecido, de acordo como foi enviada a amostra para o NAP-IAL.

#### **4.3.2 Histopatologia**

Foram selecionados seis órgãos: fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo. Cada lâmina foi avaliada pela autora e por outros médicos veterinários patologistas que já foram responsáveis pelo diagnóstico anatomopatológico do NAP-IAL: Danilo Gouveia Wasques, Josué Díaz Delgado, Juliana Mariotti Guerra e Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes. Os casos foram reanalisados e as dúvidas foram esclarecidas com a colaboração da médica veterinária e pesquisadora científica do IAL Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes. Ainda, todos os resultados foram comparados com resultados previamente emitidos. Excepcionalmente, critérios de avaliação de lesão hepática solidamente consensualizados, foram incorporados pela autora à lista de diagnósticos emitidos. Depois, os resultados foram indexados em planilhas elaboradas por meio de Microsoft Excel™, sendo avaliados diferentes parâmetros para cada órgão, conforme exposto no quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros analisados conforme os achados histopatológicos de cada um dos órgãos.

Parâmetro analisado x tecido	Fígado	Baço	Rim	Pulmão	Coração	Encéfalo
Intensidade	Balonização; esteatose; destrabeculação; dilatação sinusoidal; leucocitose sinusoidal	Esplenite aguda; esplenite necrotizante; depleção linfoide; hiperplasia linfoide; congestão	Fibrose; proteinose tubular; necrose tubular aguda	Edema intralveolar; hemorragia intralveolar; congestão	Necrose; hemorragia; congestão	Gliose; hemorragia
Intensidade e distribuição	Necrose intersticial; fibrose					
Intensidade, distribuição e tipo celular	Infiltrado inflamatório			Pneumonia	Infiltrado inflamatório	Meningite; encefalite
Intensidade e tipo celular			Nefrite intersticial.			
Presença/Ausência	Apoptose; multinucleação; deposição de pigmento acastanhado; degeneração nuclear glicogênica; trombose; hemorragia; ectasia ductal; obliteração ductal; mineralização; trematódeos; megacariócitos; amiloidose	Hematopoiese extramedular; trombose; amiloidose; microfilárias	Tubulite; mineralização; tireoidização tubular; regeneração tubular; glomeruloesclerose; glomerulopatia membranosa; amiloidose	Megacariócitos; macrófagos alveolares; hiperplasia de BALT; ossificação; metazoários; trombose; pigmento castanho intracitoplasmático	Trombose	

Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: parâmetros analisados conforme os achados histológicos de cada um dos órgãos e tecidos analisados.

## 4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

### 4.4.1 Processamento imuno-histoquímico

Foi feita a pesquisa de antígeno para toxoplasmose em fragmentos de diferentes tecidos, onde a análise histopatológica foi sugestiva da presença de formas parasitária de *T. gondii*. Em resumo, primeiramente, foi realizada a desparafinização das lâminas e a hidratação dos cortes, seguida por recuperação antigênica com auxílio de panela de pressão contendo solução ácido cítrico 10mM pH6,0. Posteriormente, foi feito bloqueio de peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6%, por meio de dois banhos de 20 minutos, o primeiro a 37°C e o segundo a temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários overnight anti-*T.gondii* (policlonal, Dako, coelho), lavadas e depois incubadas com anticorpos secundários com o sistema de amplificação do sinal Picture Max<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguida por amplificação com polímeros conjugados horseradish peroxidase (HRP) e fosfatase alcalina (FA). O sistema de revelação se deu por 3,3' tetrahidrocloreto diaminobenzidina (DAB) ou fast red. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula e Entellan<sup>®</sup> (Merck, Alemanha).

### 4.4.2 Avaliação da marcação imuno-histoquímica

Foi considerado positivo o depósito de pigmento castanho dourado (quando utilizado DAB) ou róseo (quando utilizado fast red) nos tecidos. A positividade foi comparada aos controles positivos e negativos realizados com tecidos das mesmas espécies/gêneros avaliados. Em baço e fígado foram adotados critérios de avaliação da intensidade parasitária, por meio da quantificação de formas parasitárias imunomarcadas, conforme o quadro 2 e figura 6.

Quadro 2 - Graduação da imunomarcção hepática e esplênica. \*Obs

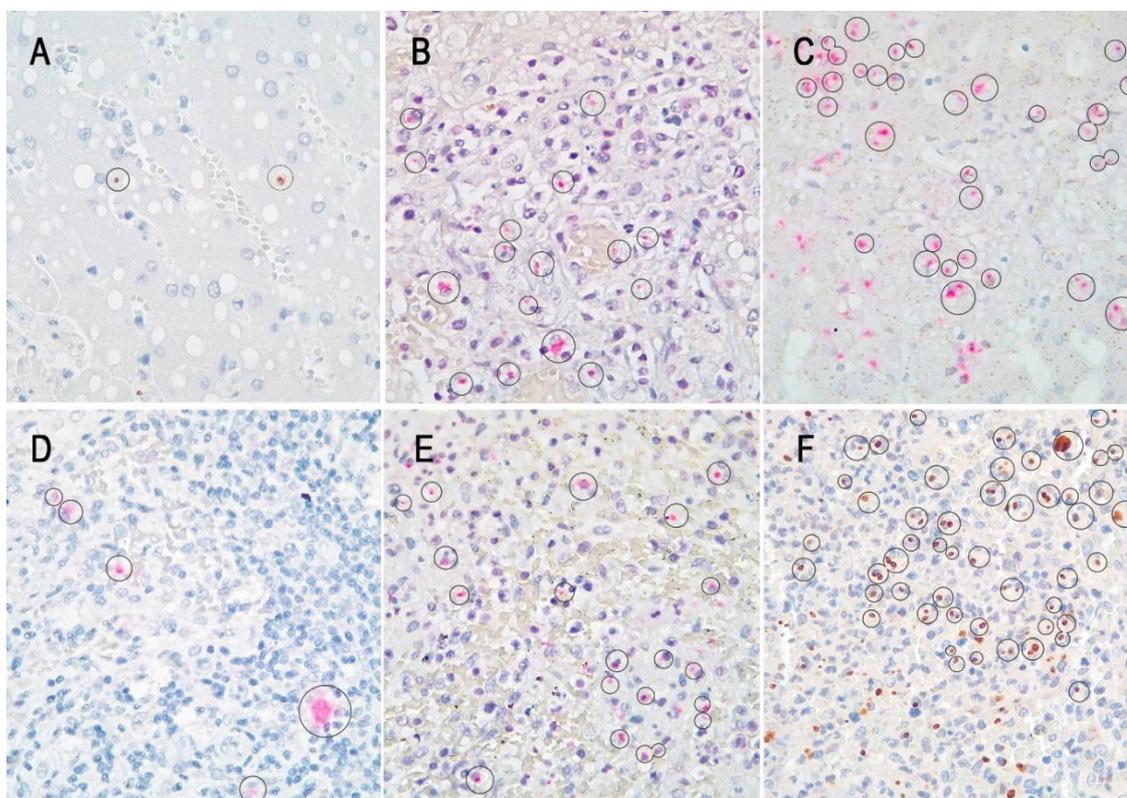
Intensidade órgão	x	Fígado	Baço
Baixa		<10/campo40x/ <i>hotspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)	<10/campo/10x/ <i>hostspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)
Moderada		>15/campo40x/ <i>hotspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)	>20/campo40x/ <i>hotspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)
Alta		>30/campo40x/ <i>hotspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)	>50/campo40x/ <i>hotspot</i> (área de 2.37 mm <sup>2</sup> – lente ocular de 22mm)

Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: *hotspot* = campo referente à maior quantidade observável dentre os demais campos do fragmento; 40x = referente à objetiva de 40x; mm<sup>2</sup> = milímetros quadrados; mm = milímetros.

Observação: foram estabelecidos critérios de acordo com o número máximo, médio e mínimo mais frequentemente observados. Nenhum caso exibiu uma quantidade de parasitos que ficasse no intervalo entre os critérios estabelecidos.

Figura 6 - Fotomicrografias exemplificativas da graduação das imunomarcções hepática e esplênica.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: os círculos destacam a quantidade de formas parasitárias imunomarcadas em campos de 40x sob observação em microscópio com lente ocular de 22mm. A – Fígado, baixa quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (DAB,40x). B – Fígado, moderada quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (fosfatase,40x). C – Fígado, alta quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (fosfatase,40x). D – Baço, baixa quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (fosfatase,40x). E – Baço, moderada quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (fosfatase,40x). F – Baço, alta quantidade de parasitos imunomarcados em *hotspot* (DAB,40x).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR

### 4.5.1 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído a partir de blocos de parafina; ou, quando na ausência de material emblocado, fragmentos de tecido congelado; sendo priorizadas amostras que continham fragmento de fígado. Para tanto, os blocos de parafina, contendo múltiplos órgãos, foram aparados em um micrótomo locado no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz (NPQ-IAL), dando origem a duas fitas de 9µm, as quais foram armazenadas em microtubo estéril. Durante este processo, o micrótomo foi limpo diversas vezes com álcool 70% e a navalha foi trocada a cada bloco. As fitas foram desparafinizadas a partir de óleo mineral, seguindo as instruções do kit Promega - ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep. O tampão de lise e a proteinase K foram adicionados a 20 mg de tecidos e incubados a 56°C durante a noite. O lisado foi transferido para a coluna de sílica, lavado e eluído com o tampão de eluição em um volume final de 60uL. Para a extração de DNA dos tecidos, foi utilizado o kit Bio Gene - Bioclin Quibasa - Extração de DNA/RNA Viral; conforme as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

### 4.5.2 PCR em tempo real

Os ensaios de qPCR para *T. gondii* foram realizados usando pares de iniciadores e sonda Taqman™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ThermoScientific™, Warrington, Reino Unido), em um volume final de 25 µL, conforme quadro 3. O tamanho de produto buscado foi de 98 pb (LIN et al., 2000). O valor de *threshold* (CT), indicativo da quantidade do gene alvo no qual a fluorescência excede um limite predefinido foi determinado. Para cada reação, líquido ascítico de camundongos inoculados com *T. gondii* foram utilizados como controles positivos, gentilmente cedido pelo Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto (Centro de Parasitologia e Micologia-IAL); e como controle negativo, foi empregada a água ultrapura (EmbryoMax™ Ultra Pure Water - Sigma-Aldrich).

Quadro 3 - Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores e da sonda empregados na PCR em tempo real, juntamente com o nome adotado no NPQ/IAL. \*Obs

Primer ou sonda	Nome utilizado no NPQ/IAL	Sequência de oligonucleotídeos
Primer forward	TOXO-F Pato	TCC CCT CTG CTG GCG AAA AGT
Primer reverse	TOXO-R Pato	AGC GTT CGT GGT CAA CTA TCG ATT G
Sonda	TOXO-P Pato	FAM - TCT GTG CAA CTT TGG TGT ATT CGC AG - BHQ1

Fonte: arquivo pessoal, adaptada de LIN et al., (2000).

Observação: a PCR em tempo real para detecção de *T. gondii* foi realizada seguindo os métodos de LIN et al., (2000), com a exceção de que o volume final da reação foi de 25 µl ao invés de 50 µl, conforme SANTORO et al., (2019). Em resumo, 5 µl de amostra de DNA foi adicionado a uma mistura de reação contendo 25 µl (10 µl de master mix, 5 µl de primer TOXO-F, 5 µl de primer TOXO-R e 5 µl de sonda TaqMan™). Após um ciclo inicial a 95°C por 10 min, foram realizados 40 ciclos de PCR de 95°C por 15 segundos e um ciclo de 60°C por 1 min.

#### 4.5.3 Genotipagem por Nested-PCR-RFLP

A genotipagem foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP em *mitilocus*, utilizando 10 marcadores moleculares (Invitrogen™), e sua(s) respectiva(s) enzima(s), detalhados na tabela 7:

Tabela 7 - Marcadores utilizados para genotipagem por PCR-RFLP e seus respectivos genes, cromossomos e sequência de oligonucleotídeos.

Marcadores e genes	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Enzima(s) de restrição	Tamanho de banda (Nested)	Referência
SAG1	EF: GTTCTAACCCACGCACCCTGAG ER: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA IF: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC IR: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Dupla digestão enzimática: Sau96I (ThermoScientific™) + HaeII (ThermoScientific™)	390	(GRIGG et al., 2001)
SAG 2 (5'SAG)	5'EF: GCTACCTCGAACAGGAACAC 5'ER: GCATCAACAGTCTTCGTTGC 5'IR: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 5'IF: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Mbol (ThermoScientific™)	242	(HOWE et al., 1997; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>SAG 2 (3'SAG2)</b>	3'EF: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC 3'ER: TCAAAGCGTGCATTATCGC 3' IF: ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3' IR: AACGTTTCACGAAGGCACAC	Hhal (ThermoScientific™)	222	(HOWE et al., 1997)
SAG 2 (alt-SAG2)	EF: GGAACGCGAACAATGAGTTT ER: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT IF: ACCCATCTGCGAAGAAAACG IR: ATTTGACCAGCGGGAGCAC	Dupla digestão enzimática: HinfI (ThermoScientific™) + TaqI (ThermoScientific™)	546	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>SAG3</b>	EF: CAACTCTCACCATTCACCC ER: GCGCGTTGTTAGACAAGACA IF: CACAAGGAGACCGAGAAGGA IR: TCTTGTGGGTGTTCACTCA	NciI (ThermoScientific™)	225	(GRIGG et al., 2001)

<b>GRA6</b>	EF: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT ER: GCACCTTCGCTTGTGGTT IF: TTTCCGAGCAGGTGACCT IR: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI (ThermoScientific™)	344	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>BTUB</b>	EF: TCCAAAATGAGAGAAATCGT ER: AAATTGAAATGACGGAAGAA IF: GAGGTCATCCTCGGACGAACA IR: TTGTAGGAACACCCGGACGC	Dupla digestão enzimática: BsiEI (ThermoScientific™) + TaqI (ThermoScientific™)	411	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>C22-8</b>	EF: TGATGCATCCATGCGTTTTAT ER: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA IF: TCTCTCTACGTGGACGCC IR: AGGTGCTTGGATATTCGC	Dupla digestão enzimática: Alw26I (Invitrogen™) + MboII (ThermoScientific™)	521	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>C29-2</b>	EF: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA ER: AGGGTCTCTTGCGCATACAT IF: AGTTCTGCAGAGTGTCGC IR: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	Dupla digestão enzimática: Tail (ThermoScientific™) + RsaI (ThermoScientific™)	446	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>L358</b>	EF: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC ER: GCAATTTCTCGAAGACAGG IF: AGGAGGCGTAGCGCAAGT IR: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	Dupla digestão enzimática: HaeIII (ThermoScientific™) + NlaIII (ThermoScientific™)	418	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>PK1</b>	EF: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA ER: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT IF: CGCAAAGGGAGACAATCAGT IR: TCATCGCTGAATCTCATTGC	Dupla digestão enzimática: Aval (ThermoScientific™) + RsaI (ThermoScientific™)	903	(KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
<b>APICO</b>	EF: TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG ER: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA IF: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT IR: GGGATTGAAACCCCTTGATA	Dupla digestão enzimática: BspTI (Invitrogen™) + HpyF3I (Invitrogen™)	640	(SU; ZHANG; DUBEY, 2006)

Fonte: arquivo pessoal, adaptada de SU et al., (2010); e SILVA, (2016).

Legenda: sequências de oligonucleotídeos de DNA utilizados, onde EF = Forward externo; ER = Reverse externo; IF = Forward interno; IR = Reverse interno. Os externos foram empregados na primeira PCR, e os internos, na segunda PCR/Nested.

Duas reações de amplificação foram realizadas para cada marcador, adaptadas segundo a matriz biológica da qual o DNA foi extraído.

No caso de blocos parafinados, foram realizadas as seguintes etapas:

- 1ª PCR (duplex - material parafinado): adaptada do método descrito por SILVA, 2016b. Foram adicionados os iniciadores externos de uma dupla de marcadores por reação (duplex): 5'SAG2+SAG3, 3'SAG2+SAG1, GRA6+BTUB. Em um segundo momento, utilizou-se os marcadores externos das seguintes duplex:

c22-8+PK1, c29-2+L358, novo SAG2+Apico. As reações tiveram um volume final de 20µL, e seguiram da mistura de:

- 0,25 µL de cada iniciador externo – total de 0,5 µL
- 10 µL de master mix (GoTaq® Green Master Mix - Promega);
- 1,5 µL água ultrapura (EmbryoMax™ Ultra Pure Water - Sigma-Aldrich);
- 8 µl de amostra (produto da extração de DNA a partir de bloco).

As amplificações consistiram de: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), com aumento progressivo de 1°C a cada fase, um minuto a 55°C (pareamento) e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram armazenados em congelador, até a realização da segunda PCR.

No caso de amostras oriundas de tecidos congelados:

- 1ª PCR (multiplex - material congelado): adaptada do método descrito por SU et al., 2010. Dividida em duas reações multiplex, sendo uma das reações englobando os marcadores: SAG1, alt. sag2, L358, Apico, SAG3 e GRA6; e a outra reação englobando os marcadores: c22-8, PK1, c29-2, 3'SAG-2, 5'SAG-2 e BTUB. Ambas as reações tiveram volume final de 50 µL e foram realizadas adicionando:

- 0,25 µL de cada iniciador – total de 0,5 µL x 6 = 3 µL
- 25 µL de master mix (GoTaq® Green Master Mix - Promega);
- 17 µL água ultrapura (EmbryoMax™ Ultra Pure Water - Sigma-Aldrich);
- 5 µL de amostra (produto da extração de DNA a partir de congelado).

As amplificações consistiram de: incubação inicial de 95°C por 4 minutos para desnaturação, acrescido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, e uma extensão final de 1 minuto e meio a 72°C. Os produtos da PCR foram armazenados em congelador, até a realização da segunda PCR.

- 2ª PCR (ou nested PCR): adaptada do método descrito por SILVA (2016b). Foram adicionados os iniciadores internos de cada um dos marcadores, separadamente em cada microtubo: SAG1, alt. sag2, L358, Apico, SAG3, GRA6, c22-8, PK1, c29-2, 3'SAG-2, 5'SAG-2 e BTUB. As reações tiveram volume final de 20 µL, e foram realizadas com a seguinte proporção:

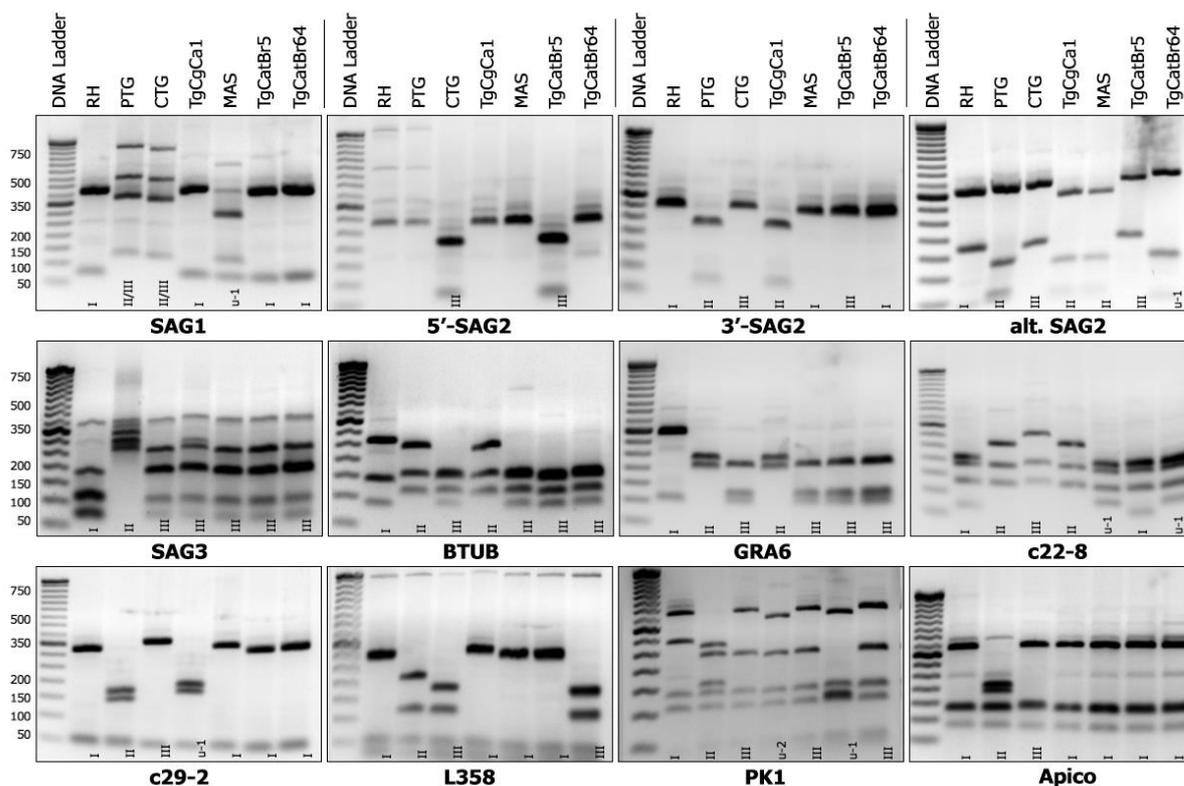
- 0,5 µL de cada iniciador – total de 1 µL

- 10 µL de master mix (GoTaq® Green Master Mix - Promega)
- 4 µL de água ultrapura (EmbryoMax Ultra Pure Water - Sigma-Aldrich)
- 5 µl de produto da 1ª PCR

O programa do termociclador foi igual ao da respectiva 1ª PCR. Os produtos da PCR foram armazenados em congelador, até a realização da RFLP.

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% (tabela 7). A RFLP seguiu o método descrito por (SILVA, 2016b). Dois µL de produto dos fragmentos amplificados da nested-PCR foram adicionados à uma mistura de 18 µL [contendo água ultrapura, enzima(s) e tampão, conforme proporção descrita(s) na(s) bula(s)] e em seguida, foram submetidos ao termociclador, a 37°C por 6 horas. Por último, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 3%, com revelação em GelRed® (Biotium) e fotodocumentadas (BioRad). Os resultados obtidos foram analisados comparativamente ao marcador de 50 pb (Invitrogen™), além dos resultados dos genótipos-padrão [RH, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64 (figura 7)] - os quais foram gentilmente cedidos pela Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena (VPS-FMVZ/USP), para validação da padronização da técnica. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura (EmbryoMax™ Ultra Pure Water - Sigma-Aldrich).

Figura 7 – Imagens dos géis de eletroforese dos genótipos-padrão de *T. gondii*.



Fonte: arquivo pessoal. Imagem sob revisão – Transboundary Emerging Diseases

Legenda: validação da técnica - análise de nested PCR-RFLP de amostras de genótipos-padrão de *Toxoplasma gondii* usando 10 marcadores genéticos diferentes. Os genótipos de referência de *Toxoplasma gondii* utilizados foram: RH (ou GT1), PTG, CTG, TgCgCa1 (ou Cougar), MAS, TgCatBr5 e TgCatBr64. Os produtos de PCR de cada marcador foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição (Tabela 7) e os fragmentos de DNA foram visualizados separadamente na eletroforese em gel de agarose a 3% (reveladas por GelRed<sup>®</sup>, Biotium), fotodocumentadas (Biorad) e as imagens das bandas foram comparadas com um marcador de 50 pb (Invitrogen<sup>™</sup>).

#### 4.6 ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada em conjunto com o doutorando e médico veterinário Pedro Enrique Navas-Suárez, do Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (LAPCOM-FMVZ/USP). Foram realizados os testes de ANOVA fator único e estimativas, por meio de porcentagens, valendo-se do Microsoft Excel<sup>™</sup>.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANIMAIS ESTUDADOS

No total, 61 animais foram selecionados para este estudo. Os números absolutos de animais para cada uma das análises podem variar, de acordo com a viabilidade da amostra (prejuízo do estado de conservação ou ausência de órgão representado - interferências pré-analíticas) ou ainda devido à finalidade almejada para o método (interferências pós-analíticas).

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS

No total, entre janeiro de 2015 e junho de 2020, foram recebidos 4985 primatas neotropicais (os quais, primordialmente, eram oriundos de vida livre) pelo IAL, englobando os seguintes gêneros: *Alouatta* spp., *Ateles* spp., *Callicebus* spp., *Callithrix* spp., *Leontopithecus* spp., *Sapajus* spp. e *Brachyteles* spp. Destes, 4136 pertenciam aos gêneros estudados e 61 PNTs foram diagnosticados com toxoplasmose sistêmica no período estudado (tabela 8); as características epidemiológicas dos PNTs estudados estão detalhadas na tabela 9.

Tabela 8 - Distribuição da frequência de diagnósticos de toxoplasmose em primatas neotropicais de vida livre de acordo com o gênero. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

	<b>Relação gênero x doença</b>
<b><i>Alouatta</i> spp.</b>	2% (21/1150)
<b><i>Callithrix</i> spp.</b>	1% (37/2986)
<b><i>Brachyteles</i> spp.</b>	50% (1/2)

Observação: não foi estabelecida a frequência para aqueles primatas neotropicais cujo gênero ou família não foram identificados (n = 2).

Tabela 9 - Características epidemiológicas de primatas neotropicais recebidos e diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

\* Obs.

Caraterística		Total de PNTs	Atelidae	Cebidae	PNT NI	Vida livre	Cativeiro
Identificação taxonômica	<b>Atelidae</b>	<b>36% (22/61)</b>	-	-	-	<b>30% (10/33)</b>	<b>60% (3/5)</b>
	<i>Alouatta</i> spp.	23% (5/22)	-	-	-	10% (1/10)	0% (0/3)
	<i>Alouatta guariba</i>	9% (2/22)	-	-	-	20% (2/10)	0% (0/3)
	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	64% (14/22)	-	-	-	60% (6/10)	100% (3/3)
	<i>Brachyteles arachnoides</i>	5% (1/22)	-	-	-	10% (1/10)	0% (0/3)
	<b>Cebidae</b>	<b>61% (37/61)</b>	-	-	-	<b>70% (23/33)</b>	<b>40% (2/5)</b>
	<i>Callithrix</i> spp.	51% (19/37)	-	-	-	74% (17/23)	0% (0/2)
	<i>Callithrix jacchus</i>	14% (5/37)	-	-	-	0% (0/23)	0% (0/2)
	<i>Callithrix penicillata</i>	35% (13/37)	-	-	-	26% (6/23)	100% (2/2)
	<b>NI</b>	<b>3% (2/61)</b>	-	-	-	<b>0% (0/33)</b>	<b>0% (0/5)</b>
Sexo	Fêmea	31% (19/61)	32% (7/22)	32% (12/37)	0% (0/2)	33% (11/33)	60% (3/5)
	Macho	34% (21/61)	45% (10/22)	30% (11/37)	0% (0/2)	45% (15/33)	0% (0/5)
	NI	34% (21/61)	23% (5/22)	38% (14/37)	100% (2/2)	21% (7/33)	40% (2/5)
Faixa etária	Filhote	3% (2/61)	9% (2/22)	0% (0/37)	0% (0/2)	3% (1/33)	20% (1/5)
	Jovem	7% (4/61)	5% (1/22)	8% (3/37)	0% (0/2)	3% (1/33)	0% (0/5)
	Adulto	48% (29/61)	59% (13/22)	43% (16/37)	0% (0/2)	64% (21/33)	20% (1/5)
	Senil	5% (3/61)	5% (1/22)	5% (2/37)	0% (0/2)	6% (2/33)	20% (1/5)
	NI	38% (23/61)	23% (5/22)	43% (16/37)	100% (2/2)	24% (8/33)	40% (2/5)
Manutenção	Cativeiro	8% (5/61)	14% (3/22)	5% (2/37)	0% (0/2)	-	-
	Mata	5% (3/61)	14% (3/22)	0% (0/37)	0% (0/2)	-	-
	Rural	10% (6/61)	14% (3/22)	8% (3/37)	0% (0/2)	-	-
	Urbana	39% (24/61)	18% (4/22)	54% (20/37)	0% (0/2)	-	-
	NI	38% (23/61)	41% (9/22)	32% (12/37)	100% (2/2)	-	-

<b>Tipo de ocorrência</b>	Surto	30% (18/61)	23% (5/22)	35% (13/37)	0% (0/2)	12% (4/33)	0% (0/5)
	Individual	70% (43/61)	77% (17/22)	65% (24/37)	100% (2/2)	88% (29/33)	100% (5/5)
<b>Unidade da Federação</b>	DF	8% (5/61)	0% (0/22)	14% (5/37)	0% (0/2)	0% (0/33)	0% (0/5)
	PB	2% (1/61)	5% (1/22)	0% (0/37)	0% (0/2)	3% (1/33)	0% (0/5)
	PR	3% (2/61)	0% (0/22)	0% (0/37)	100% (2/2)	0% (0/33)	0% (0/5)
	RS	3% (2/61)	9% (2/22)	0% (0/37)	0% (0/2)	6% (2/33)	0% (0/5)
	SC	16% (10/61)	45% (10/22)	0% (0/37)	0% (0/2)	9% (3/33)	20% (1/5)
	SE	2% (1/61)	0% (0/22)	3% (1/37)	0% (0/2)	0% (0/33)	0% (0/5)
	SP	66% (40/61)	41% (9/22)	84% (31/37)	0% (0/2)	82% (27/33)	80% (4/5)
<b>Sazonalidade/precipitação</b>	Chuva	44% (27/61)	27% (6/22)	57% (21/37)	0% (0/2)	33% (11/33)	60% (3/5)
	Seco	56% (34/61)	73% (16/22)	43% (16/37)	100% (2/2)	67% (22/33)	40% (2/5)
<b>Sazonalidade/estação</b>	Inverno	34% (21/61)	45% (10/22)	27% (10/37)	50% (1/2)	39% (13/33)	40% (2/5)
	Outono	30% (18/61)	36% (8/22)	24% (9/37)	50% (1/2)	33% (11/33)	20% (1/5)
	Primavera	30% (18/61)	9% (2/22)	43% (16/37)	0% (0/2)	15% (5/33)	40% (2/5)
	Verão	7% (4/61)	9% (2/22)	5% (2/37)	0% (0/2)	12% (4/33)	0% (0/5)

Legenda: PNTs = primatas neotropicais; NI = não identificado; DF = Distrito Federal; PB = Paraíba; PR = Paraná; RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; SE = Sergipe; SP = São Paulo.

\*Observação: a diferença na somatória entre o total de PNTs e os animais mantidos em vida livre e em cativeiro se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=23). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

Em relação ao tipo de ocorrência, foram contabilizados seis surtos (tabela 10). As epizootias (ou surtos) acometeram principalmente indivíduos membros da família Cebidae, envolvendo um número máximo de cinco animais (surto 2), enquanto os surtos envolvendo a família Atelidae englobaram no máximo dois animais (surtos 1 e 4). Houve um surto com membros de duas famílias distintas (surto 3), e dois surtos com apenas dois indivíduos da família Cebidae (surtos 5 e 6).

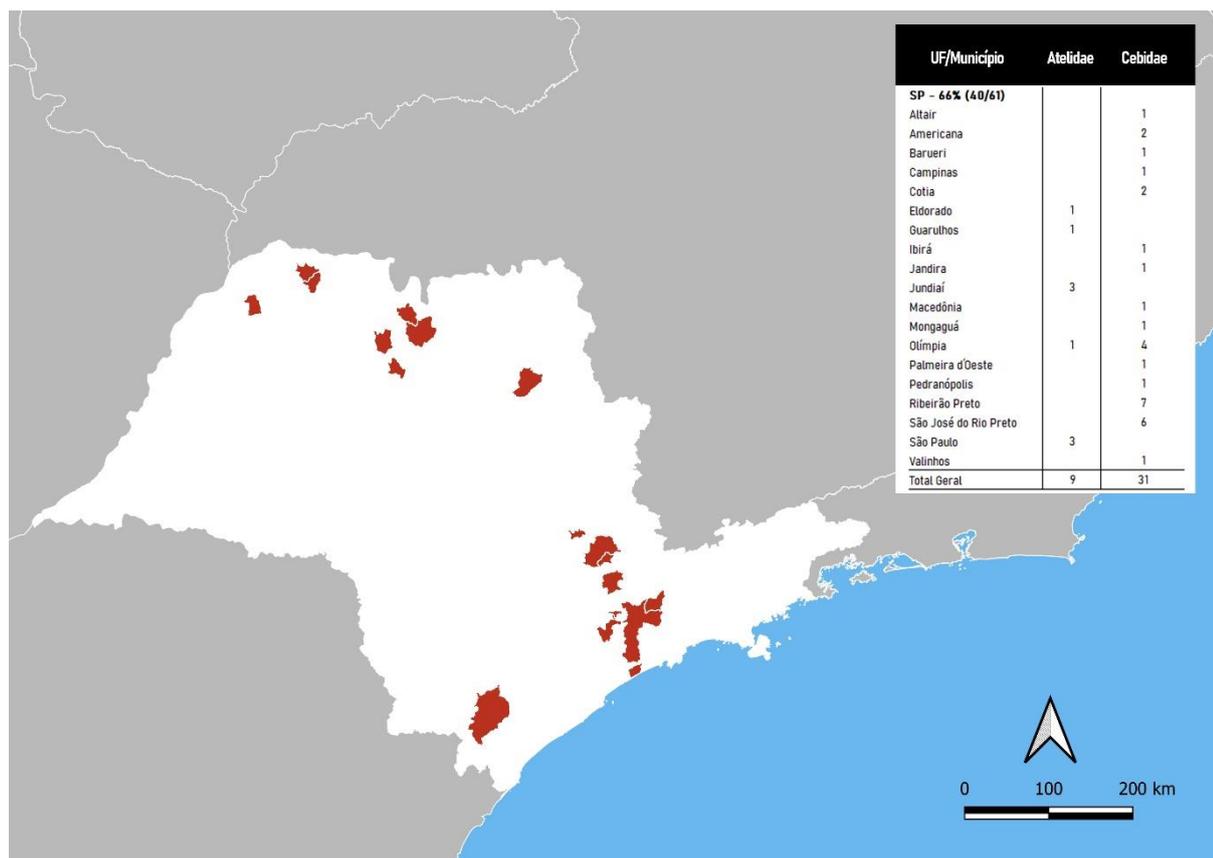
Tabela 10 - Distribuição dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, em função do tipo de ocorrência (individual ou em surtos). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

<b>Família</b>		<b>Atelidae</b>	<b>Cebidae</b>	<b>NI</b>
Individual		77% (17/22)	65% (24/37)	100% (2/2)
Surto	<u>1</u>	9% (2/22)	0% (0/37)	0% (0/2)
	<u>2</u>	0% (0/22)	14% (5/37)	0% (0/2)
	<u>3</u>	5% (1/22)	11% (4/37)	0% (0/2)
	<u>4</u>	9% (2/22)	0% (0/37)	0% (0/2)
	<u>5</u>	0% (0/22)	5% (2/37)	0% (0/2)
	<u>6</u>	0% (0/22)	5% (2/37)	0% (0/2)

Legenda: NI = não identificado.

Foram observados 40 casos distribuídos em 19 municípios distintos do estado de São Paulo, concentrados predominantemente na região norte do estado e na grande São Paulo (figura 8). Ribeirão Preto foi o município mais representado, com sete casos no total.

Figura 8 - Distribuição geográfica municipal dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, oriundos do estado de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal. Imagem criada com o software QGis em conjunto com Adobe Photoshop™.  
 Legenda: UF = Unidade Federativa; SP = São Paulo.

Além do estado de São Paulo, situado no Sudeste, a amostragem engloba outras 6 unidades federativas, de 3 diferentes regiões do Brasil (Sul: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; Nordeste: Paraíba e Sergipe; Centro-Oeste: Distrito Federal) (figura 9).

Figura 9 - Distribuição geográfica municipal dos casos de toxoplasmose de primatas neotropicais avaliados, em função do local de origem externo ao estado de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal. Imagem criada com o software QGis em conjunto com Adobe Photoshop™. Legenda: UF = Unidade Federativa; NI = não identificado; DF = Distrito Federal; PB = Paraíba; PR = Paraná; RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; SE = Sergipe; SP = São Paulo.

### 5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A quantidade de órgãos e tecidos analisados histopatologicamente variou, de acordo com a viabilidade da amostra (prejuízo do estado de conservação ou ausência de órgão representado - interferências pré-analíticas). No entanto, independentemente do grau de autólise, em todos os órgãos e tecidos foram observadas alterações que indicavam a suspeita de toxoplasmose ou, ainda, foi observada a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. A tabela 11 elenca a quantidade de órgãos e tecidos recebidos, além da quantidade de casos com parasitos observados (independentemente do grau de autólise) e a quantidade de casos cujo grau de preservação permitiu a avaliação histopatológica detalhada.

Tabela 11 - Distribuição dos órgãos/tecidos de primatas neotropicais avaliados, em função da quantidade de casos recebidos, casos com presença de parasitos compatíveis com *T. gondii*, casos excluídos por autólise e casos com avaliação histopatológica completa. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

Característica	Órgãos e tecidos					
	Fígado (N=61)	Baço (N=57)	Rim (N=55)	Pulmão (N=47)	Coração (N=54)	Encéfalo (N=52)
Quantidade total de casos recebidos						
Casos com presença de parasitos	87% (53/61)	91% (52/57)	44% (24/55)	70% (33/47)	22% (12/54)	25% (13/52)
Excluídos por autólise	18% (11/61)	16% (9/57)	22% (12/55)	15% (7/47)	15% (8/54)	21% (11/52)
Total incluídos na análise histopatológica detalhada	82% (50/61)	84% (48/57)	78% (43/55)	85% (40/47)	85% (46/54)	79% (41/52)

Legenda: N=número de casos.

Dentre os órgãos e tecidos de PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020, fígado e baço foram os mais representados e com maiores quantidade de parasitos observados. O tecido renal foi o mais excluído por autólise.

A tabela 12 traz as informações concernentes à presença de formas parasitárias de *T. gondii* para cada um dos órgãos e tecidos analisados nas famílias Atelidae e Cebidae.

Tabela 12 - Distribuição dos primatas neotropicais analisados em função dos órgãos/tecidos avaliados e a frequência de observação de formas parasitárias de *T. gondii* analisadas em HE nas famílias Atelidae e Cebidae. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

	Total de PNTs avaliados	Presença de formas parasitárias de <i>T. gondii</i> em relação ao número de atelídeos investigados	Presença de formas parasitárias de <i>T. gondii</i> em relação ao número de cebídeos investigados
Fígado	87% (53/61)	86% (19/22)	86% (32/37)
Baço	91% (52/57)	91% (20/22)	81% (30/37)
Rim	44% (24/55)	50% (11/22)	35% (13/37)
Pulmão	70% (33/47)	55% (12/22)	54% (20/37)
Coração	22% (12/54)	9% (2/22)	24% (9/37)
Encéfalo	25% (13/52)	27% (6/22)	14% (5/37)

Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: a diferença na somatória entre o total de PNTs e cada uma das famílias se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A contagem incluiu também os casos que foram excluídos da análise histopatológica sistemática por autólise.

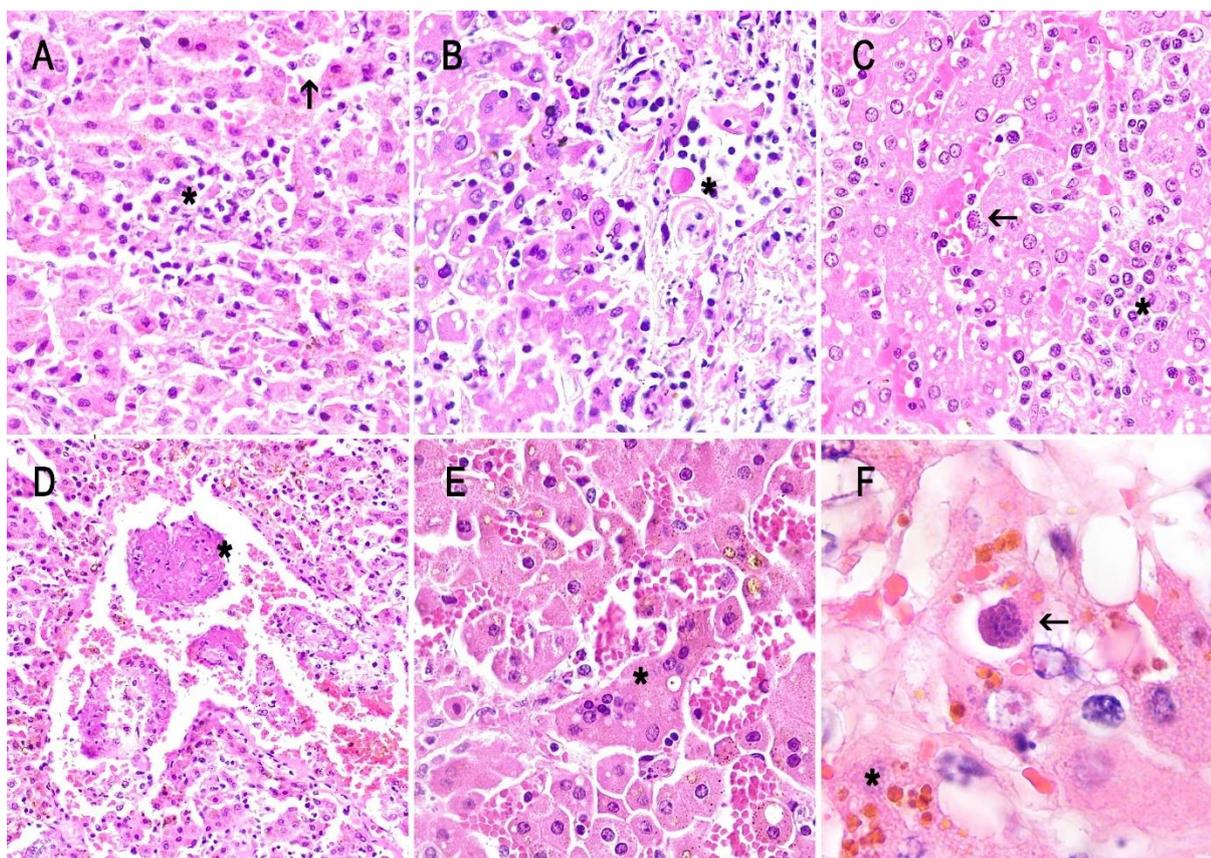
Dentre os órgãos e tecidos de PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020 e diagnosticados com toxoplasmose, o tecido esplênico mostrou-se com

maior frequência de observação de formas parasitárias de *T. gondii* (91% dos casos no total absoluto).

### 5.3.1 Achados hepáticos

Os achados histopatológicos analisados em fígado estão representados na figura 10 e detalhados na tabela 13.

Figura 10 - Aspectos histomorfológicos hepáticos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Hepatite necrotizante lobular mista, indicada pelo asterisco, somada a destrabeculação; seta destacando cisto tecidual em meio a dilatação sinusoidal (HE, 40x). B – Hepatite mista necrotizante com esteatose, e asterisco destacando a presença de hepatócito apoptótico; ocasionais hepatócitos com degeneração glicogênica nuclear (HE, 40x). C – Dilatação e leucocitose sinusoidal (asterisco) somada a esteatose; seta indicando célula de Kupffer contendo cisto tecidual (HE, 40x). D – Trombo vascular (HE, 20x). E – Hepatócito multinucleado (asterisco) e congestão hepática (HE, 40x). F – Cisto tecidual dentro de célula de Kupffer; hepatócitos com pigmento acastanhado intracitoplasmático (HE, 100x).

Tabela 13 - Distribuição das alterações histopatológicas hepáticas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

		Característica histopatológica avaliada	Total de PNTs com fígado avaliado e alterado	Atelidae	Cebidae	Vida livre	Cativeiro
Alterações intersticiais	<b>Necrose</b>		<b>100% (50/50)</b>	<b>100% (19/19)</b>	<b>100% (29/29)</b>	<b>100% (30/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
		1	2% (1/50)	5% (1/19)	0% (0/29)	0% (0/30)	0% (0/3)
		2	24% (12/50)	26% (5/19)	21% (6/29)	23% (7/30)	0% (0/3)
		3	54% (27/50)	37% (7/19)	69% (20/29)	63% (19/30)	67% (2/3)
		4	20% (10/50)	32% (6/19)	10% (3/29)	13% (4/30)	33% (1/3)
		aleatória	94% (47/50)	84% (16/19)	100% (29/29)	97% (29/30)	100% (3/3)
		centrolobular a mediozonal	2% (1/50)	5% (1/19)	0% (0/29)	3% (1/30)	0% (0/3)
		mediozonal	4% (2/50)	11% (2/19)	0% (0/29)	0% (0/30)	0% (0/3)
	<b>Inflamação</b>		<b>98% (49/50)</b>	<b>95% (18/19)</b>	<b>100% (29/29)</b>	<b>100% (30/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
		1	10% (5/49)	6% (1/18)	10% (3/29)	7% (2/30)	0% (0/3)
		2	33% (16/49)	44% (8/18)	28% (8/29)	33% (10/30)	67% (2/3)
		3	35% (17/49)	39% (7/18)	34% (10/29)	37% (11/30)	33% (1/3)
		4	22% (11/49)	11% (2/18)	28% (8/29)	23% (7/30)	0% (0/3)
		lobular	76% (37/49)	83% (15/18)	69% (20/29)	70% (21/30)	100% (3/3)
		portal	2% (1/49)	0% (0/18)	3% (1/29)	3% (1/30)	0% (0/3)
portal e lobular	22% (11/49)	17% (3/18)	28% (8/29)	27% (8/30)	0% (0/3)		
misto	98% (48/49)	94% (17/18)	100% (29/29)	100% (30/30)	100% (3/3)		
mononuclear	2% (1/49)	6% (1/18)	0% (0/29)	0% (0/30)	0% (0/3)		
<b>Fibrose</b>		<b>26% (13/50)</b>	<b>11% (2/19)</b>	<b>38% (11/29)</b>	<b>23% (7/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>	
	1	15% (2/13)	0% (0/2)	18% (2/11)	29% (2/7)	0% (0/0)	
	2	62% (8/13)	100% (2/2)	55% (6/11)	43% (3/7)	0% (0/0)	
	3	23% (3/13)	0% (0/2)	27% (3/11)	29% (2/7)	0% (0/0)	
	portal	77% (10/13)	100% (2/2)	73% (8/11)	71% (5/7)	0% (0/0)	
	portal e perissinusoidal	8% (1/13)	0% (0/2)	9% (1/11)	14% (1/7)	0% (0/0)	

	portal, ponte porta-porta e perissinusoidal	15% (2/13)	0% (0/2)	18% (2/11)	14% (1/7)	0% (0/0)
Alterações hepatocitárias	<b>Balonização</b>	<b>8% (4/50)</b>	<b>11% (2/19)</b>	<b>7% (2/29)</b>	<b>0% (0/30)</b>	<b>33% (1/3)</b>
	2	50% (2/4)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/0)	0% (0/1)
	3	50% (2/4)	100% (2/2)	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (1/1)
	<b>Esteatose</b>	<b>82% (41/50)</b>	<b>79% (15/19)</b>	<b>83% (24/29)</b>	<b>90% (27/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	1	37% (15/41)	47% (7/15)	29% (7/24)	41% (11/27)	0% (0/3)
	2	44% (18/41)	27% (4/15)	58% (14/24)	44% (12/27)	67% (2/3)
	3	12% (5/41)	20% (3/15)	4% (1/24)	11% (3/27)	0% (0/3)
	4	7% (3/41)	7% (1/15)	8% (2/24)	4% (1/27)	33% (1/3)
	<b>Destrabeculação</b>	<b>80% (40/50)</b>	<b>74% (14/19)</b>	<b>86% (25/29)</b>	<b>87% (26/30)</b>	<b>67% (2/3)</b>
	1	50% (20/40)	43% (6/14)	52% (13/25)	58% (15/26)	50% (1/2)
	2	30% (12/40)	29% (4/14)	32% (8/25)	35% (9/26)	0% (0/2)
	3	18% (7/40)	21% (3/14)	16% (4/25)	4% (1/26)	50% (1/2)
	4	3% (1/40)	7% (1/14)	0% (0/25)	4% (1/26)	0% (0/2)
	<b>Apoptose</b>	<b>80% (40/50)</b>	<b>84% (16/19)</b>	<b>76% (22/29)</b>	<b>87% (26/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	<b>Multinucleação</b>	<b>46% (23/50)</b>	<b>21% (4/19)</b>	<b>66% (19/29)</b>	<b>57% (17/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	<b>Pigmento castanho</b>	<b>28% (14/50)</b>	<b>53% (10/19)</b>	<b>14% (4/29)</b>	<b>27% (8/30)</b>	<b>33% (1/3)</b>
	<b>Degeneração nuclear glicogênica</b>	<b>4% (2/50)</b>	<b>5% (1/19)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>7% (2/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
Alterações sinusoidais	<b>Dilatação</b>	<b>72% (36/50)</b>	<b>58% (11/19)</b>	<b>86% (25/29)</b>	<b>93% (28/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	1	28% (10/36)	36% (4/11)	24% (6/25)	36% (10/28)	0% (0/3)
	2	53% (19/36)	55% (6/11)	52% (13/25)	39% (11/28)	100% (3/3)
	3	19% (7/36)	9% (1/11)	24% (6/25)	25% (7/28)	0% (0/3)
	<b>Leucocitose</b>	<b>90% (45/50)</b>	<b>89% (17/19)</b>	<b>90% (26/29)</b>	<b>93% (28/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	1	33% (15/45)	35% (6/17)	31% (8/26)	39% (11/28)	0% (0/3)
	2	36% (16/45)	47% (8/17)	31% (8/26)	29% (8/28)	67% (2/3)
	3	29% (13/45)	18% (3/17)	35% (9/26)	29% (8/28)	33% (1/3)
	4	2% (1/45)	0% (0/17)	4% (1/26)	4% (1/28)	0% (0/3)
	Alterações hemodinâmicas	<b>Trombose</b>	<b>12% (6/50)</b>	<b>16% (3/19)</b>	<b>10% (3/29)</b>	<b>17% (5/30)</b>
<b>Hemorragia</b>		<b>72% (36/50)</b>	<b>74% (14/19)</b>	<b>76% (22/29)</b>	<b>93% (28/30)</b>	<b>100% (3/3)</b>

<b>Outras alterações</b>	<b>Ectasia ductal</b>	<b>4% (2/50)</b>	<b>0% (0/19)</b>	<b>7% (2/29)</b>	<b>7% (2/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Obliteração ductal</b>	<b>2% (1/50)</b>	<b>0% (0/19)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>3% (1/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Mineralização</b>	<b>4% (2/50)</b>	<b>0% (0/19)</b>	<b>7% (2/29)</b>	<b>7% (2/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Trematódeos</b>	<b>8% (4/50)</b>	<b>0% (0/19)</b>	<b>14% (4/29)</b>	<b>7% (2/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Megacariócitos</b>	<b>8% (4/50)</b>	<b>5% (1/19)</b>	<b>10% (3/29)</b>	<b>10% (3/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Amiloidose</b>	<b>2% (1/50)</b>	<b>0% (0/19)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>3% (1/30)</b>	<b>0% (0/3)</b>

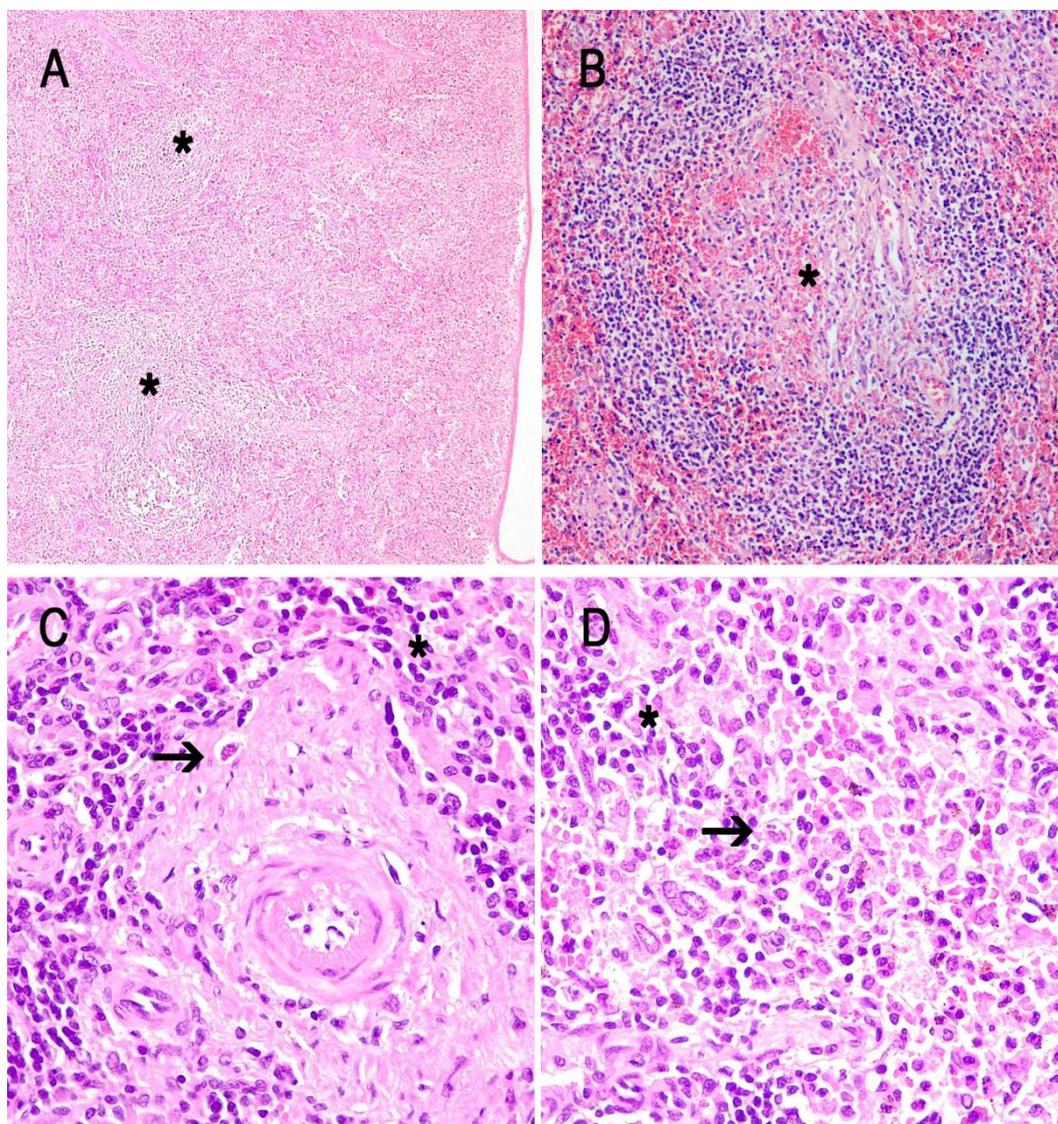
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: a diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=19), Cebidae (N=29) e total de PNTs (N=50) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A diferença na somatória entre vida livre (N=30), cativo (N=3) e o total de PNTs (N=50) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=17). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

### 5.3.2 Achados esplênicos

Os achados histopatológicos analisados em baço estão representados na figura 11 e detalhados na tabela 14.

Figura 11 - Aspectos histomorfológicos esplênicos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Depleção linfóide, com asteriscos marcando o esboço arquitetural dos folículos linfóides (HE, 4x). B – Asterisco indicando necrose centrofolicular e congestão esplênica (HE, 10x). C – Presença de cisto (seta) próximo a arteríola folicular, com esplenite aguda associada, indicada pelo asterisco (HE, 40x). D – Taquizoítos intracitoplasmáticos (seta) e esplenite aguda (asterisco) (HE, 40x).

Tabela 14 - Distribuição das alterações histopatológicas esplênicas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

	Característica histopatológica avaliada	Total de PNTs com baço avaliado e alterado	Atelidae	Cebidae	Vida livre	Cativeiro
<b>Esplenite</b>	aguda	<b>85% (41/48)</b>	<b>72% (13/18)</b>	<b>93% (26/28)</b>	<b>86% (25/29)</b>	<b>100% (2/2)</b>
	1	17% (7/41)	38% (5/13)	8% (2/26)	16% (4/25)	50% (1/2)
	2	39% (16/41)	23% (3/13)	46% (12/26)	36% (9/25)	0% (0/2)
	3	34% (14/41)	31% (4/13)	35% (9/26)	36% (9/25)	0% (0/2)
	4	10% (4/41)	8% (1/13)	12% (3/26)	12% (3/25)	50% (1/2)
	necrotizante	<b>96% (46/48)</b>	<b>100% (18/18)</b>	<b>93% (26/28)</b>	<b>97% (28/29)</b>	<b>100% (2/2)</b>
	1	9% (4/46)	0% (0/18)	15% (4/26)	7% (2/28)	0% (0/2)
	2	33% (15/46)	33% (6/18)	31% (8/26)	43% (12/28)	0% (0/2)
	3	43% (20/46)	44% (8/18)	46% (12/26)	29% (8/28)	100% (2/2)
	4	15% (7/46)	22% (4/18)	8% (2/26)	21% (6/28)	0% (0/2)
<b>Alterações reacionais</b>	<b>Depleção linfoide</b>	<b>73% (35/48)</b>	<b>94% (17/18)</b>	<b>57% (16/28)</b>	<b>76% (22/29)</b>	<b>100% (2/2)</b>
	1	3% (1/35)	0% (0/17)	6% (1/16)	5% (1/22)	0% (0/2)
	2	23% (8/35)	12% (2/17)	38% (6/16)	27% (6/22)	0% (0/2)
	3	57% (20/35)	65% (11/17)	44% (7/16)	50% (11/22)	50% (1/2)
	4	17% (6/35)	24% (4/17)	13% (2/16)	18% (4/22)	50% (1/2)
	<b>Hiperplasia linfoide</b>	<b>19% (9/48)</b>	<b>6% (1/18)</b>	<b>29% (8/28)</b>	<b>14% (4/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>
	2	33% (3/9)	0% (0/1)	38% (3/8)	25% (1/4)	0% (0/0)
	3	67% (6/9)	100% (1/1)	63% (5/8)	75% (3/4)	0% (0/0)
	<b>Hematopoiese extramedular</b>	<b>15% (7/48)</b>	<b>11% (2/18)</b>	<b>18% (5/28)</b>	<b>7% (2/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>
	<b>Alterações hemodinâmicas</b>	<b>Congestão</b>	<b>77% (37/48)</b>	<b>94% (17/18)</b>	<b>71% (20/28)</b>	<b>76% (22/29)</b>
1		16% (6/37)	0% (0/17)	30% (6/20)	23% (5/22)	0% (0/2)
2		22% (8/37)	12% (2/17)	30% (6/20)	18% (4/22)	0% (0/2)

	3	43% (16/37)	59% (10/17)	30% (6/20)	36% (8/22)	100% (2/2)
	4	19% (7/37)	29% (5/17)	10% (2/20)	23% (5/22)	0% (0/2)
<b>Trombose</b>		<b>4% (2/48)</b>	<b>0% (0/18)</b>	<b>4% (1/28)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>
<b>Outros achados</b>		<b>2% (1/48)</b>	<b>0% (0/18)</b>	<b>4% (1/28)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>
<b>Amiloidose</b>		<b>2% (1/48)</b>	<b>0% (0/18)</b>	<b>4% (1/28)</b>	<b>3% (1/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>
<b>Microfilárias</b>		<b>6% (3/48)</b>	<b>17% (3/18)</b>	<b>0% (0/28)</b>	<b>10% (3/29)</b>	<b>0% (0/2)</b>

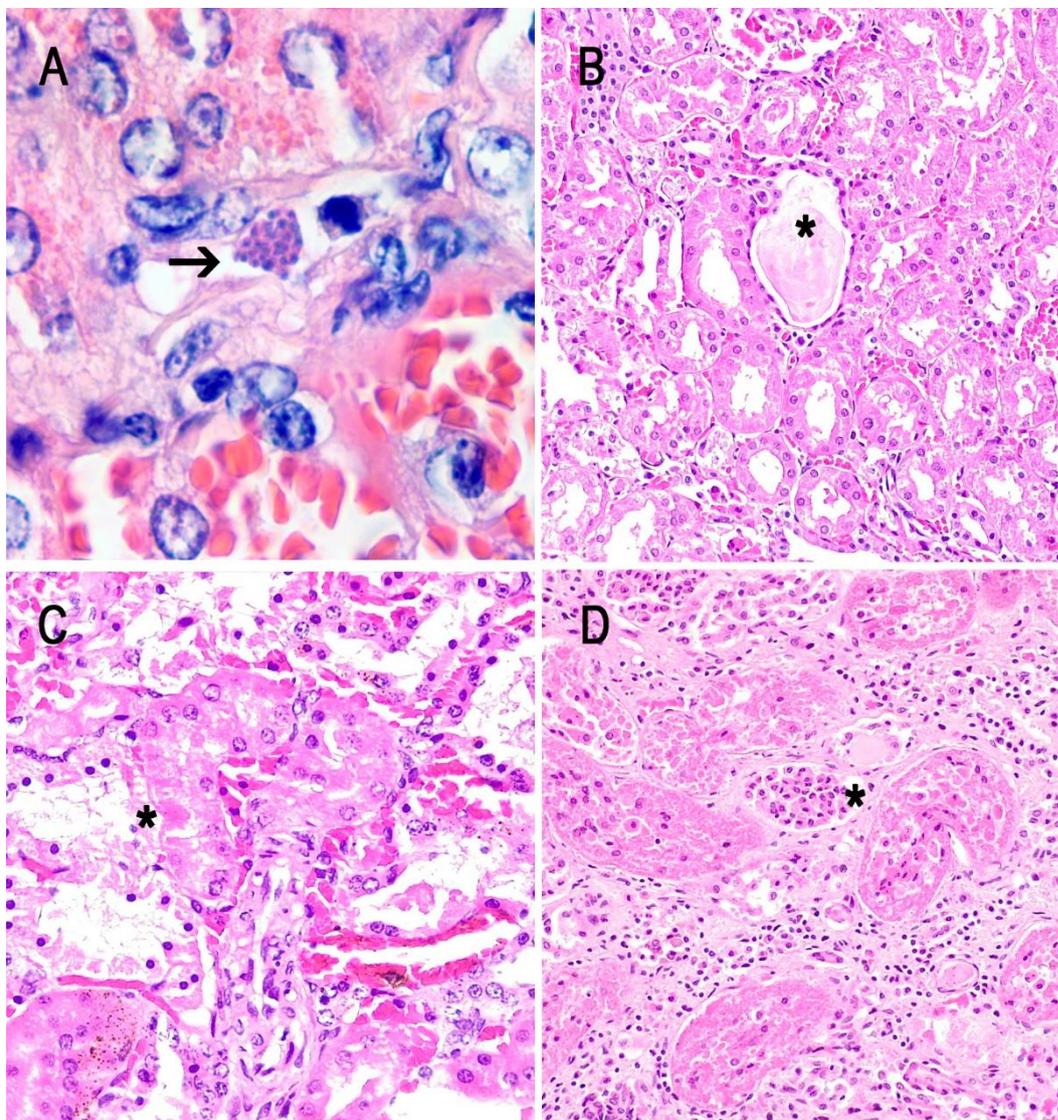
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: a diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=18), Cebidae (N=28) e total de PNTs (N=48) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A diferença na somatória entre vida livre (N=29), cativo (N=2) e o total de PNTs (N=48) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=17). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

### 5.3.3 Achados renais

Os achados histopatológicos analisados em rim estão representados na figura 12 e detalhados na tabela 15.

Figura 12 - Aspectos histomorfológicos renais de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Seta indicando cisto tecidual em capilar peritubular (HE, 100x). B – Tireoidização tubular, asterisco (HE, 20x). C – Necrose tubular aguda, asterisco (HE, 40x). D – Nefrite intersticial crônica com fibrose de entremeio, somada a tubulite aguda, asterisco (HE, 40x).

Tabela 15 - Distribuição das alterações histopatológicas renais avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

	Característica histopatológica avaliada	Total de PNTs com rim avaliado e alterado	Atelidae	Cebidae	Vida livre	Cativeiro
Alterações intersticiais	<b>Nefrite</b>	<b>81% (35/43)</b>	<b>87% (13/15)</b>	<b>77% (20/26)</b>	<b>93% (25/27)</b>	<b>100% (1/1)</b>
	1	14% (5/35)	8% (1/13)	15% (3/20)	16% (4/25)	0% (0/0)
	2	31% (11/35)	15% (2/13)	45% (9/20)	36% (9/25)	100% (1/1)
	3	51% (18/35)	69% (9/13)	40% (8/20)	48% (12/25)	0% (0/0)
	4	3% (1/35)	8% (1/13)	0% (0/20)	0% (0/25)	0% (0/0)
	Mista	29% (10/35)	23% (3/13)	35% (7/20)	28% (7/25)	100% (1/1)
	Mononuclear	71% (25/35)	77% (10/13)	65% (13/20)	72% (18/25)	0% (0/0)
	<b>Fibrose</b>	<b>21% (9/43)</b>	<b>40% (6/15)</b>	<b>12% (3/26)</b>	<b>26% (7/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>
	1	11% (1/9)	0% (0/6)	33% (1/3)	14% (1/7)	0% (0/0)
	2	44% (4/9)	50% (3/6)	33% (1/3)	57% (4/7)	0% (0/0)
3	44% (4/9)	50% (3/6)	33% (1/3)	29% (2/7)	0% (0/0)	
4	0% (0/9)	0% (0/6)	0% (0/3)	0% (0/7)	0% (0/0)	
Alterações tubulares	<b>Proteinose tubular</b>	<b>70% (30/43)</b>	<b>87% (13/15)</b>	<b>65% (17/26)</b>	<b>81% (22/27)</b>	<b>100% (1/1)</b>
	1	7% (2/30)	8% (1/13)	6% (1/17)	5% (1/22)	0% (0/0)
	2	37% (11/30)	23% (3/13)	47% (8/17)	41% (9/22)	100% (1/1)
	3	50% (15/30)	69% (9/13)	35% (6/17)	50% (11/22)	0% (0/0)
	4	7% (2/30)	0% (0/13)	12% (2/17)	5% (1/22)	0% (0/0)
	<b>Necrose tubular aguda</b>	<b>67% (29/43)</b>	<b>93% (14/15)</b>	<b>54% (14/26)</b>	<b>78% (21/27)</b>	<b>100% (1/1)</b>
	1	7% (2/29)	14% (2/14)	0% (0/14)	5% (1/21)	0% (0/0)
	2	31% (9/29)	7% (1/14)	57% (8/14)	33% (7/21)	100% (1/1)
	3	38% (11/29)	43% (6/14)	29% (4/14)	43% (9/21)	0% (0/0)
	4	24% (7/29)	36% (5/14)	14% (2/14)	19% (4/21)	0% (0/0)
<b>Tubulite</b>	<b>5% (2/43)</b>	<b>13% (2/15)</b>	<b>0% (0/26)</b>	<b>7% (2/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>	
<b>Mineralização</b>	<b>19% (8/43)</b>	<b>7% (1/15)</b>	<b>27% (7/26)</b>	<b>15% (4/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>	

	<b>Tireoidização tubular</b>	<b>7% (3/43)</b>	<b>7% (1/15)</b>	<b>8% (2/26)</b>	<b>4% (1/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>
	<b>Regeneração tubular</b>	<b>14% (6/43)</b>	<b>20% (3/15)</b>	<b>12% (3/26)</b>	<b>19% (5/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>
<b>Alterações glomerulares</b>	<b>Glomeruloesclerose</b>	<b>2% (1/43)</b>	<b>7% (1/15)</b>	<b>0% (0/26)</b>	<b>4% (1/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>
	<b>Glomerulopatia membranosa discreta</b>	<b>7% (3/43)</b>	<b>7% (1/15)</b>	<b>8% (2/26)</b>	<b>7% (2/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>
<b>Outros</b>	<b>Amiloidose</b>	<b>2% (1/43)</b>	<b>0% (0/15)</b>	<b>4% (1/26)</b>	<b>4% (1/27)</b>	<b>0% (0/1)</b>

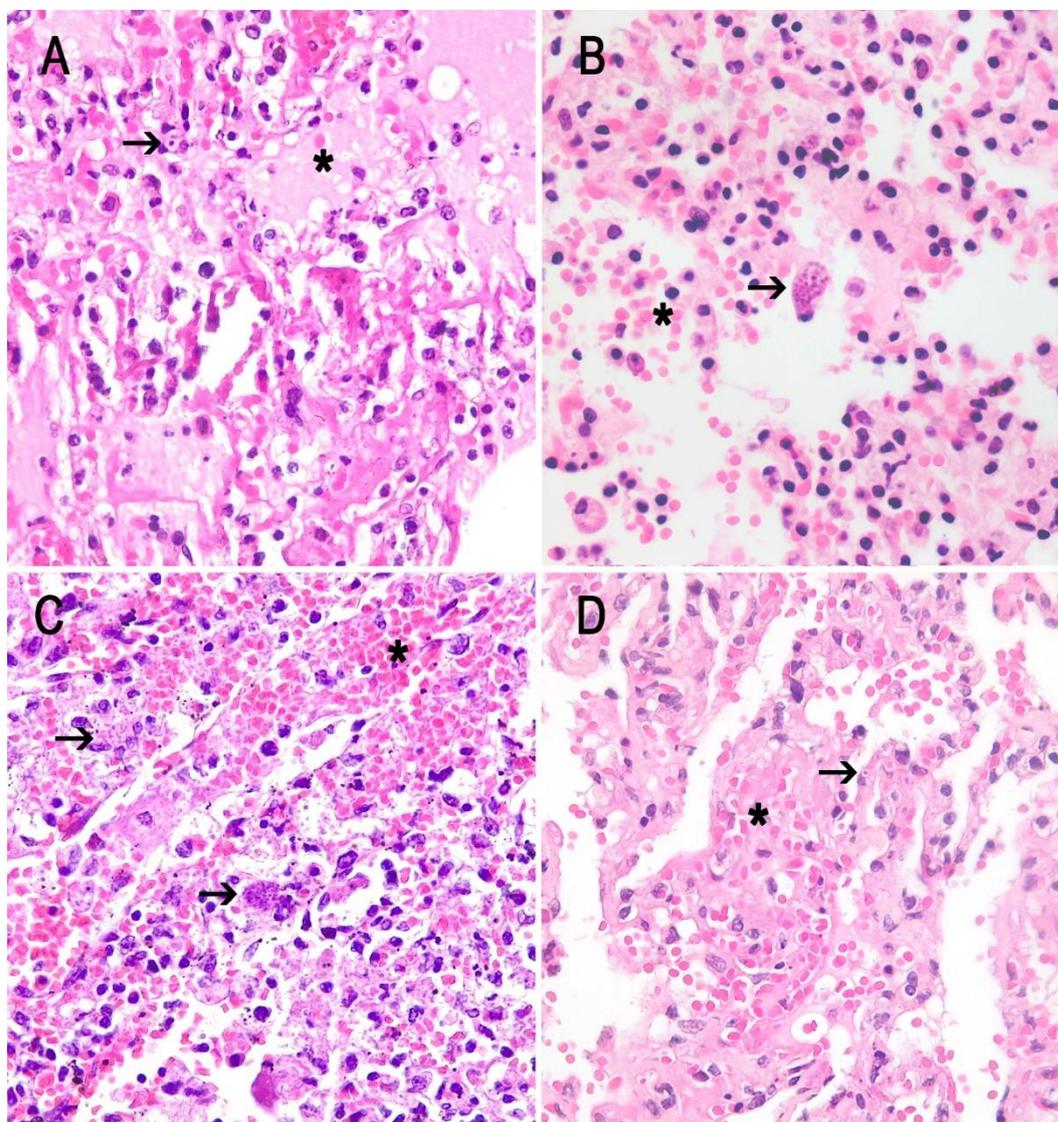
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: dentre as lesões observadas nas amostras de rim dos PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020 diagnosticados com toxoplasmose e selecionadas para compor a análise histopatológica, a lesão mais frequente foi a nefrite intersticial, observada em 89% dos casos. A diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=15), Cebidae (N=26) e total de PNTs (N=43) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A diferença na somatória entre vida livre (N=27), cativo (N=1) e o total de PNTs (N=43) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=15). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

### 5.3.4 Achados pulmonares

Os achados histopatológicos analisados em pulmão estão representados na figura 13 e detalhados na tabela 16.

Figura 13 - Aspectos histomorfológicos pulmonares de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Pneumonia intersticial mista necrotizante, com edema (asterisco) e hemorragia alveolar; seta com destaque para a presença de taquizoítos lesionais (HE, 40x). B – Cisto tecidual de *T. gondii* em macrófago alveolar (seta), com pneumonia intersticial mista e hemorragia alveolar (asterisco) (HE, 40x). C – Pneumonia intersticial mista necrotizante com congestão, hemorragia e presença de formas parasitárias lesionais (setas) (HE, 40x). D – Trombose vascular (asterisco), com hemorragia alveolar e taquizoíto destacado pela seta (HE, 40x).

Tabela 16 - Distribuição das alterações histopatológicas pulmonares avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

	Característica histopatológica avaliada	Total de PNTs com pulmão avaliado e alterado	Atelidae	Cebidae	Vida livre	Cativeiro
<b>Pneumonia</b>		<b>93% (37/40)</b>	<b>94% (15/16)</b>	<b>91% (21/23)</b>	<b>86% (19/22)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	1	11% (4/37)	7% (1/15)	14% (3/21)	21% (4/19)	0% (0/3)
	2	51% (19/37)	60% (9/15)	48% (10/21)	47% (9/19)	67% (2/3)
	3	32% (12/37)	27% (4/15)	33% (7/21)	21% (4/19)	33% (1/3)
	4	5% (2/37)	7% (1/15)	5% (1/21)	11% (2/19)	0% (0/3)
	Intersticial	5% (2/37)	7% (1/15)	5% (1/21)	0% (0/19)	0% (0/3)
	Intersticial necrotizante	95% (35/37)	93% (14/15)	95% (20/21)	100% (19/19)	100% (3/3)
	Mista, multifocal	100% (37/37)	100% (15/15)	100% (21/21)	100% (19/19)	100% (3/3)
<b>Alterações reacionais</b>	<b>Megacariócitos</b>	<b>5% (2/40)</b>	<b>13% (2/16)</b>	<b>0% (0/23)</b>	<b>5% (1/22)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Macrófagos alveolares</b>	<b>33% (13/40)</b>	<b>19% (3/16)</b>	<b>43% (10/23)</b>	<b>32% (7/22)</b>	<b>33% (1/3)</b>
	<b>Hiperplasia BALT</b>	<b>3% (1/40)</b>	<b>0% (0/16)</b>	<b>4% (1/23)</b>	<b>0% (0/22)</b>	<b>0% (0/3)</b>
	<b>Ossificação</b>	<b>3% (1/40)</b>	<b>6% (1/16)</b>	<b>0% (0/23)</b>	<b>0% (0/22)</b>	<b>0% (0/3)</b>
<b>Outras infecções</b>	<b>Metazoários</b>	<b>3% (1/40)</b>	<b>0% (0/16)</b>	<b>4% (1/23)</b>	<b>5% (1/22)</b>	<b>0% (0/3)</b>
<b>Alterações hemodinâmicas</b>	<b>Edema intralveolar</b>	<b>93% (37/40)</b>	<b>81% (13/16)</b>	<b>100% (23/23)</b>	<b>91% (20/22)</b>	<b>67% (2/3)</b>
	1	24% (9/37)	23% (3/13)	26% (6/23)	35% (7/20)	0% (0/2)
	2	30% (11/37)	15% (2/13)	35% (8/23)	40% (8/20)	50% (1/2)
	3	27% (10/37)	46% (6/13)	17% (4/23)	20% (4/20)	0% (0/2)
	4	19% (7/37)	15% (2/13)	22% (5/23)	5% (1/20)	50% (1/2)
	<b>Hemorragia intralveolar</b>	<b>83% (33/40)</b>	<b>75% (12/16)</b>	<b>91% (21/23)</b>	<b>91% (20/22)</b>	<b>100% (3/3)</b>
	1	39% (13/33)	42% (5/12)	38% (8/21)	40% (8/20)	67% (2/3)
	2	30% (10/33)	42% (5/12)	24% (5/21)	30% (6/20)	0% (0/3)
	3	21% (7/33)	17% (2/12)	24% (5/21)	20% (4/20)	33% (1/3)
	4	9% (3/33)	0% (0/12)	14% (3/21)	10% (2/20)	0% (0/3)

Congestão	<b>93% (37/40)</b>	<b>88% (14/16)</b>	<b>100% (23/23)</b>	<b>95% (21/22)</b>	<b>100% (3/3)</b>
1	8% (3/37)	14% (2/14)	4% (1/23)	5% (1/21)	33% (1/3)
2	24% (9/37)	14% (2/14)	30% (7/23)	33% (7/21)	33% (1/3)
3	62% (23/37)	71% (10/14)	57% (13/23)	52% (11/21)	33% (1/3)
4	5% (2/37)	0% (0/14)	9% (2/23)	10% (2/21)	0% (0/3)
<b>Trombose</b>	<b>20% (8/40)</b>	<b>38% (6/16)</b>	<b>9% (2/23)</b>	<b>23% (5/22)</b>	<b>33% (1/3)</b>
<b>Pigmento castanho intracitoplasmático</b>	<b>8% (3/40)</b>	<b>19% (3/16)</b>	<b>0% (0/23)</b>	<b>14% (3/22)</b>	<b>0% (0/3)</b>

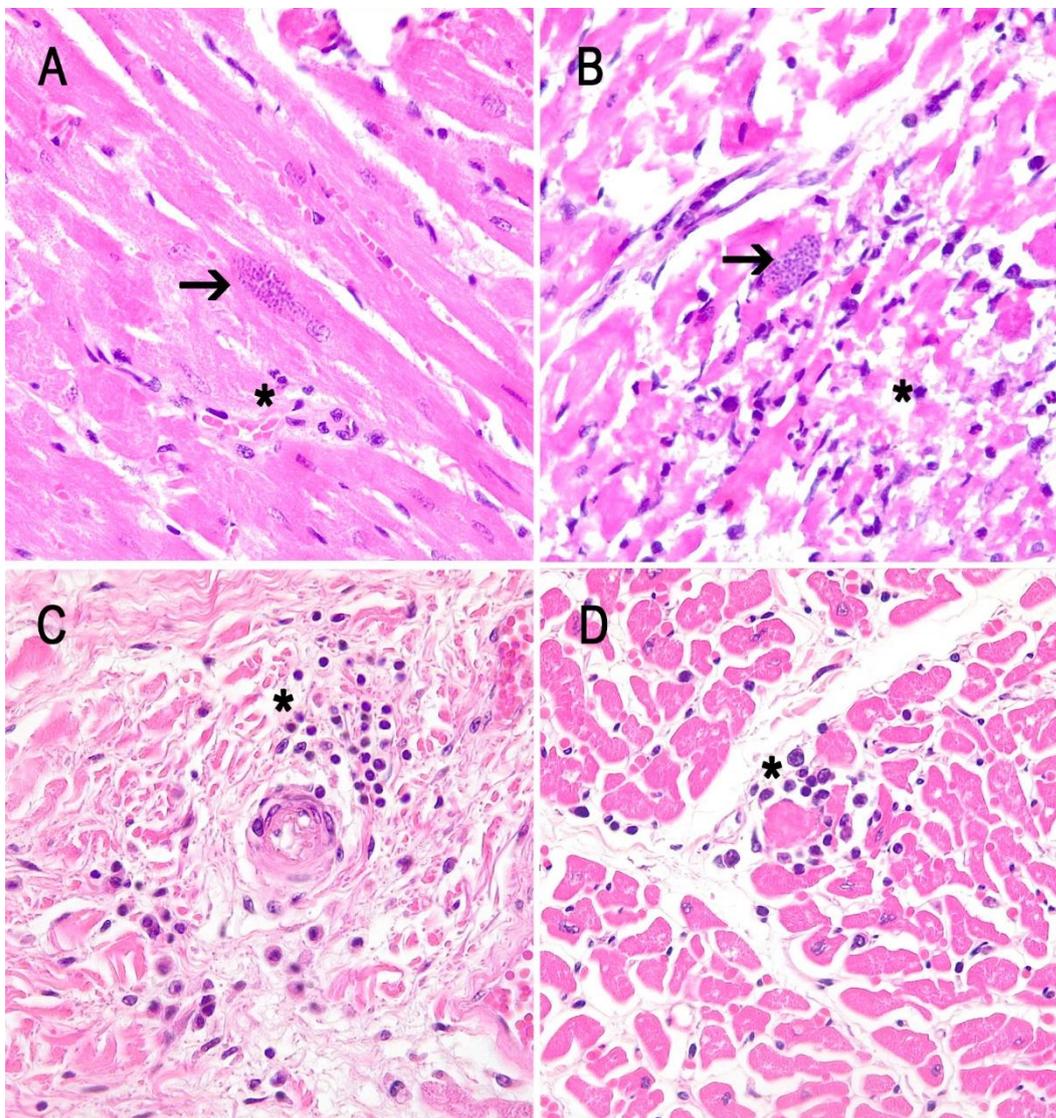
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: dentre as lesões observadas nas amostras de pulmão dos PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020 diagnosticados com toxoplasmose e selecionadas para compor a análise histopatológica, a lesão mais frequente foi a pneumonia intersticial, observada em 93% dos casos. A diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=16), Cebidae (N=23) e total de PNTs (N=40) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=1), não contabilizados na tabela (um dos PNT NI não teve fragmentos de pulmão enviados). A diferença na somatória entre vida livre (N=22), cativo (N=3) e o total de PNTs (N=40) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em cativo ou vida livre (N=15). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

### 5.3.5 Achados cardíacos

Os achados histopatológicos analisados em coração estão representados na figura 14 e detalhados na tabela 17.

Figura 14 - Aspectos histomorfológicos cardíacos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Cisto tecidual de *T. gondii* (seta) próximo a miocardite mista indicada pelo asterisco (HE, 40x). B – Miocardite mista e necrotizante (asterisco) somada a presença de cisto de *T. gondii* (seta) intralésional (HE, 40x). C – Perivasculite mista, asterisco (HE, 40x). D – Miocardite crônica, asterisco (HE, 40x).

Tabela 17 - Distribuição das alterações histopatológicas cardíacas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

	Característica avaliada	histopatológica	Total de PNTs com coração avaliado e alterado					
			Atelidae	Cebidae	Vida livre	Cativeiro		
<b>Inflamação</b>			<b>65% (30/46)</b>	<b>63% (10/16)</b>	<b>64% (18/28)</b>	<b>73% (19/26)</b>	<b>0% (0/3)</b>	
		1	53% (16/30)	70% (7/10)	39% (7/18)	47% (9/19)	0% (0/0)	
		2	33% (10/30)	30% (3/10)	39% (7/18)	37% (7/19)	0% (0/0)	
		3	13% (4/30)	0% (0/10)	22% (4/18)	16% (3/19)	0% (0/0)	
			miocárdio, focal	3% (1/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
			miocárdio e endocárdio, multifocal	3% (1/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
			miocárdio e epicárdio, multifocal	13% (4/30)	30% (3/10)	6% (1/18)	21% (4/19)	0% (0/0)
			miocárdio e perivascular, multifocal	7% (2/30)	20% (2/10)	0% (0/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
			miocárdio, multifocal	63% (19/30)	50% (5/10)	67% (12/18)	58% (11/19)	0% (0/0)
			pancardite, multifocal	3% (1/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
			subepicárdio, focal	3% (1/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	0% (0/19)	0% (0/0)
			subepicárdio, miocárdio, multifocal	3% (1/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	0% (0/19)	0% (0/0)
			polimofornuclear	7% (2/30)	0% (0/10)	6% (1/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
			mononuclear	10% (3/30)	30% (3/10)	0% (0/18)	5% (1/19)	0% (0/0)
		misto	83% (25/30)	70% (7/10)	94% (17/18)	89% (17/19)	0% (0/0)	
<b>Necrose</b>	<b>Intensidade</b>		<b>17% (8/46)</b>	<b>0% (0/16)</b>	<b>25% (7/28)</b>	<b>19% (5/26)</b>	<b>0% (0/3)</b>	
		2	75% (6/8)	0% (0/0)	71% (5/7)	60% (3/5)	0% (0/0)	
		3	25% (2/8)	0% (0/0)	29% (2/7)	40% (2/5)	0% (0/0)	
<b>Alterações hemodinâmicas</b>	<b>Hemorragia</b>		<b>20% (9/46)</b>	<b>13% (2/16)</b>	<b>21% (6/28)</b>	<b>23% (6/26)</b>	<b>0% (0/3)</b>	
		1	56% (5/9)	50% (1/2)	50% (3/6)	67% (4/6)	0% (0/0)	
		2	44% (4/9)	50% (1/2)	50% (3/6)	33% (2/6)	0% (0/0)	
	<b>Congestão</b>		<b>11% (5/46)</b>	<b>19% (3/16)</b>	<b>7% (2/28)</b>	<b>12% (3/26)</b>	<b>0% (0/3)</b>	
		1	20% (1/5)	33% (1/3)	0% (0/2)	33% (1/3)	0% (0/0)	

2	40% (2/5)	33% (1/3)	50% (1/2)	33% (1/3)	0% (0/0)
3	20% (1/5)	0% (0/3)	50% (1/2)	0% (0/0)	0% (0/0)
4	20% (1/5)	33% (1/3)	0% (0/2)	33% (1/3)	0% (0/0)
<b>Trombose</b>	<b>2% (1/46)</b>	<b>0% (0/16)</b>	<b>4% (1/28)</b>	<b>4% (1/26)</b>	<b>0% (0/3)</b>

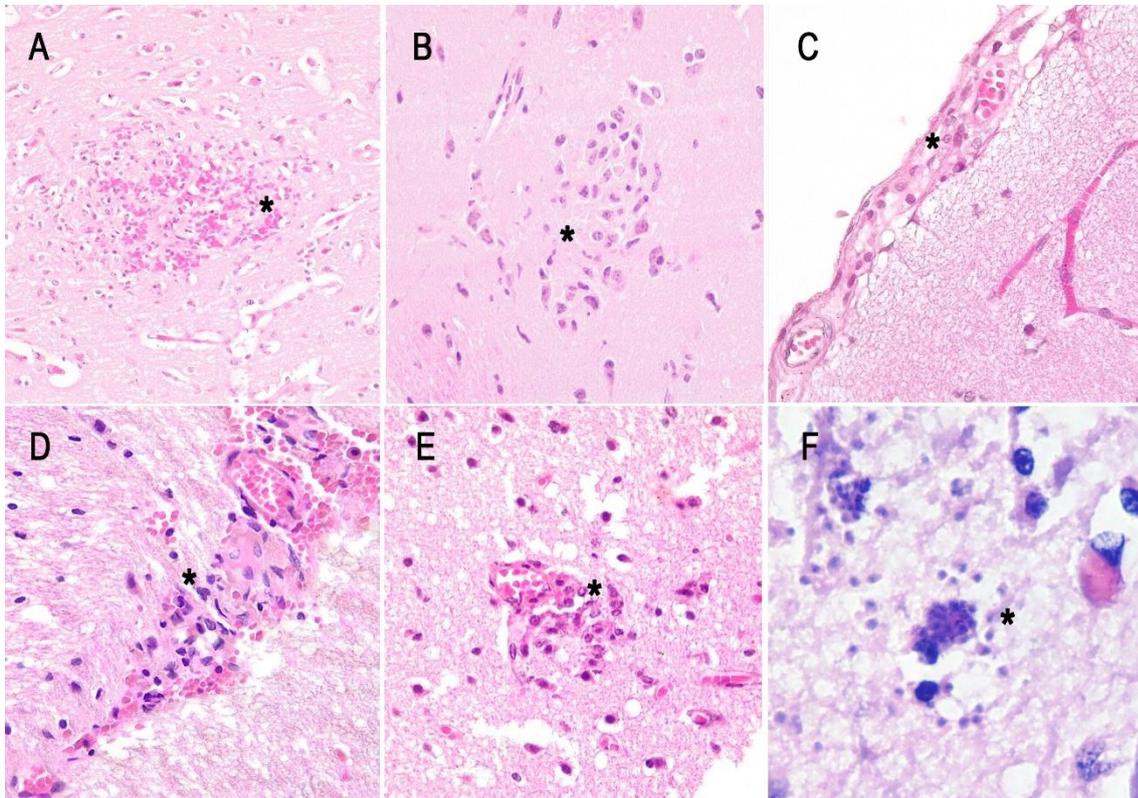
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: dentre as lesões observadas nas amostras de coração dos PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020 diagnosticados com toxoplasmose e selecionadas para compor a análise histopatológica, a lesão mais frequente foi a miocardite, observada em 62% dos casos. A diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=16), Cebidae (N=28) e total de PNTs (N=46) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A diferença na somatória entre vida livre (N=26), cativo (N=3) e o total de PNTs (N=46) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=17). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

### 5.3.6 Achados encefálicos

Os achados histopatológicos analisados em encéfalo estão representados na figura 15 e detalhados na tabela 18.

Figura 15 - Aspectos histomorfológicos encefálicos de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – Área focal de hemorragia em neuroparênquima, asterisco (HE, 20x). B – Gliose nodular, asterisco (HE, 40x). C – Meningite não-supurativa, asterisco (HE, 40x). D – Encefalite não-supurativa associada a hemorragia, asterisco (HE, 40x). E – Encefalite supurativa marcada por manguito perivascular, asterisco (HE, 40x). F – Asterisco destacando cisto tecidual e taquizoítos de *T. gondii* em neurópilo (HE, 40x).

Tabela 18 - Distribuição das alterações histopatológicas encefálicas avaliadas de primatas neotropicais diagnosticados com toxoplasmose, em função da família e tipo de manutenção (sob cuidados humanos em cativeiro ou vida livre). Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs.

	<b>Característica histopatológica avaliada</b>	<b>Total de PNTs com cérebro avaliado e alterado</b>	<b>Atelidae</b>	<b>Cebidae</b>	<b>Vida livre</b>	<b>Cativeiro</b>
<b>Inflamação</b>	<b>Meningite</b>	<b>10% (4/41)</b>	<b>7% (1/14)</b>	<b>12% (3/25)</b>	<b>13% (3/24)</b>	<b>0% (0/1)</b>
	1	75% (3/4)	100% (1/1)	67% (2/3)	67% (2/3)	0% (0/0)
	2	25% (1/4)	0% (0/1)	33% (1/3)	33% (1/3)	0% (0/0)
	focal	0% (0/4)	0% (0/1)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/0)
	multifocal	75% (3/4)	0% (0/1)	100% (3/3)	100% (3/3)	0% (0/0)
	perivascular	25% (1/4)	100% (1/1)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/0)
	não-supurativa	25% (1/4)	0% (0/1)	33% (1/3)	33% (1/3)	0% (0/0)
	supurativa	75% (3/4)	100% (1/1)	67% (2/3)	67% (2/3)	0% (0/0)
	<b>Encefalite</b>	<b>27% (11/41)</b>	<b>36% (5/14)</b>	<b>16% (4/25)</b>	<b>25% (6/24)</b>	<b>0% (0/1)</b>
	1	45% (5/11)	0% (0/5)	75% (3/4)	33% (2/6)	0% (0/0)
	2	55% (6/11)	100% (5/5)	25% (1/4)	67% (4/6)	0% (0/0)
	focal	18% (2/11)	0% (0/5)	50% (2/4)	17% (1/6)	0% (0/0)
	multifocal	64% (7/11)	80% (4/5)	50% (2/4)	83% (5/6)	0% (0/0)
perivascular	18% (2/11)	20% (1/5)	0% (0/4)	0% (0/6)	0% (0/0)	
não-supurativa	36% (4/11)	0% (0/5)	50% (2/4)	17% (1/6)	0% (0/0)	
supurativa	64% (7/11)	100% (5/5)	50% (2/4)	83% (5/6)	0% (0/0)	
<b>Alterações reacionais</b>	<b>Gliose</b>	<b>37% (15/41)</b>	<b>79% (11/14)</b>	<b>8% (2/25)</b>	<b>38% (9/24)</b>	<b>100% (1/1)</b>
	1	13% (2/15)	18% (2/11)	0% (0/2)	0% (0/9)	0% (0/1)
	2	73% (11/15)	73% (8/11)	100% (2/2)	89% (8/9)	100% (1/1)
	3	13% (2/15)	9% (1/11)	0% (0/2)	11% (1/9)	0% (0/1)
<b>Alterações hemodinâmicas</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>49% (20/41)</b>	<b>43% (6/14)</b>	<b>56% (14/25)</b>	<b>63% (15/24)</b>	<b>100% (1/1)</b>
	1	40% (8/20)	67% (4/6)	29% (4/14)	33% (5/15)	0% (0/1)
	2	55% (11/20)	33% (2/6)	64% (9/14)	67% (10/15)	100% (1/1)
	3	5% (1/20)	0% (0/6)	7% (1/14)	0% (0/15)	0% (0/1)

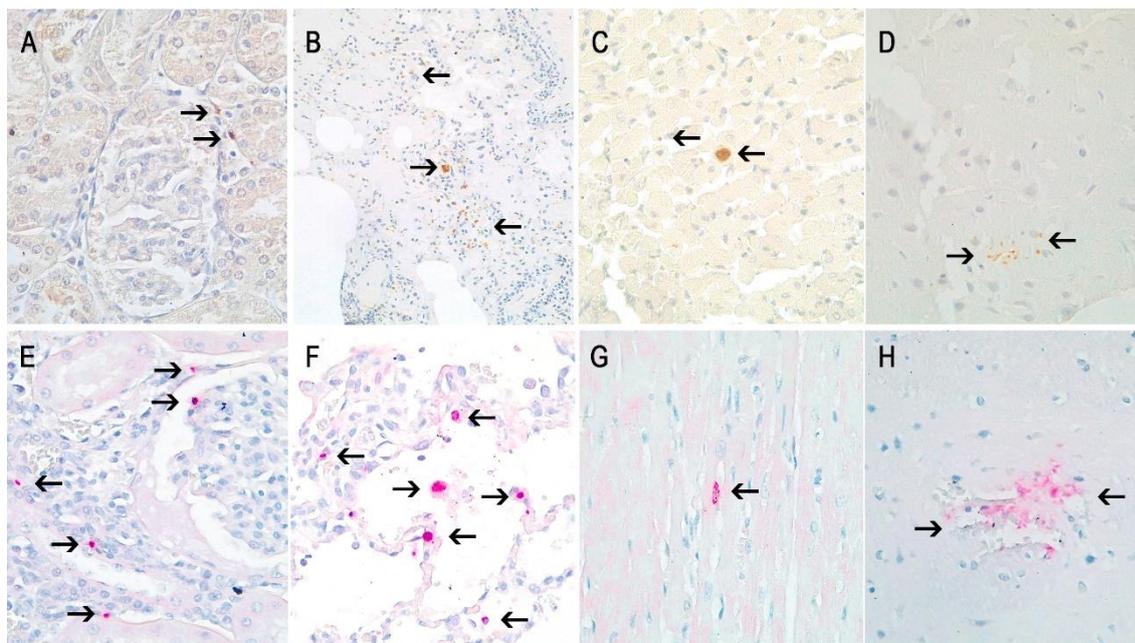
Legenda: PNTs = primatas neotropicais.

\*Observação: dentre as lesões observadas nas amostras de encéfalo dos PNTs recebidos pelo IAL entre 01/2015 a 06/2020 diagnosticados com toxoplasmose e selecionadas para compor a análise histopatológica, a lesão mais frequente foi a hemorragia, observada em 49% dos casos. A diferença na somatória de alguns parâmetros entre Atelidae (N=14), Cebidae (N=25) e total de PNTs (N=41) se dá por conta da existência de PNTs NI (N=2) não contabilizados na tabela. A diferença na somatória entre vida livre (N=24), cativo (N=1) e o total de PNTs (N=41) se dá devido à ausência de informações a respeito da manutenção do indivíduo em alguns casos (N=16). Outras diferenças somatórias justificam-se pelos números decimais não contabilizados nas porcentagens.

## 5.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Quanto à análise imuno-histoquímica, todos os órgãos e tecidos apresentaram imunomarcção (figura 16), variando a frequência de positividade de acordo com cada caso (tabela 19), sendo que 100% dos casos apresentaram positividade em fígado e baço.

Figura 16 - Representação fotomicrográfica da positividade da imunomarcção para *T. gondii* nos diferentes órgãos/tecidos avaliados de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: As setas indicam a presença dos parasitos imunomarcados. A – Rim, imunomarcção em DAB, 40x. B – Pulmão, imunomarcção em DAB, 20x. C – Coração, imunomarcção em DAB, 40x. D – Encéfalo, imunomarcção em DAB, 40x. E – Rim, imunomarcção em fosfatase, 40x. F – Pulmão, imunomarcção em fosfatase, 40x. G – Coração, imunomarcção em fosfatase, 20x. H – Encéfalo, imunomarcção em fosfatase, 40x.

Tabela 19 - Distribuição do número absoluto dos órgãos/tecidos de primatas neotropicais avaliados com toxoplasmose, em função da quantidade total de recebidos, total incluídos na análise IHQ e total de imunomarcados. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

Característica	Órgãos e tecidos em número absoluto					
	Fígado	Baço	Rim	Pulmão	Coração	Encéfalo
Quantidade total recebidos	61	57	55	47	54	52
Total incluídos na análise imuno-histoquímica	89% (54/61)	84% (48/57)	75% (41/55)	47% (22/47)	46% (25/54)	35% (18/52)
Total de imunomarcados	100% (54/54)	100% (48/48)	73% (30/41)	64% (14/22)	76% (19/25)	89% (16/18)

Em relação ao grau de imunomarcção em fígado e rim, estes estão representados na tabela 20.

Tabela 20 - Distribuição de casos conforme a intensidade das imunomarcções hepática e esplênica para *T. gondii* em primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

<u>Intensidade x órgão/ tecido</u>	<u>Fígado</u>	<u>Baço</u>
Baixa	33% (18/54)	33% (16/48)
Moderada	30% (16/54)	29% (14/48)
Alta	37% (20/54)	38% (18/48)

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR

### 5.5.1 PCR em tempo real

Dos 61 casos, 59 foram positivos na PCR em tempo real (qPCR), com Cq  $\leq 40$ .

### 5.5.2 Genotipagem por PCR-RFLP

Dos 61 casos, 58 possuíam blocos de parafina arquivados (37 representados na tabela 21 e 16 representados na tabela 22) e foram testados para PCR-RFLP, sendo que destes 79% (42/53) apresentaram amplificação de ao menos um dos marcadores testados e, no máximo, seis (55% - 6/11), representados na tabela 21. Em cinco casos, que só possuíam amostras emblocadas, não houve amplificação dos marcadores. Dos 22 dos casos com material congelado, 20 apresentaram amplificação de todos os marcadores, com exceção de dois casos em que não houve amplificação do marcador (MK) Apico (Tabela 22). Um caso apresentou digestão com resultado duvidoso no marcador c22-8. Somente um dos genótipos [#97/GUY-DOS (TgH18001)] já havia sido descrito anteriormente, sendo 21 novos potenciais genótipos encontrados.

Tabela 21 - Resultado dos alelos amplificados de cada um dos marcadores utilizados para genotipagem de *T. gondii* das amostras extraídas a partir de material em parafina de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

N Total	NºPesquisa	MK													
		SAG1	3'SAG2	5'SAG2	3'+5'SAG2	ALT-SAG2	SAG3	GRA6	BTUB	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO	ToxoDB
1	1														
2	2		III	III	III		I	I	II						
3	3														
4	4														
5	5		I/III											I	
6	6		I/III				III							III	
7	7		I	III	III	III	III	III	III					III	
8	9			I/III											
9	10						III								
10	11														
11	12														
12	13						I								
13	14						I		III						
14	15		I/III				III								
15	20		I/III				III								
16	21														
17	26		I/III												
18	27														
19	29														
20	33		III	III			I								
21	34		III	III	III		I	II	II						
22	35														
23	36		I/III				III								
24	37		I	I			I								
25	38		III	III	III		III	II							
26	39						III								
27	41		III				I							I	
29	44		III	III	III		III	III	III					III	
30	45		I	I	I		I	III	III					III	
31	46		I	I	I		III	II	III					III	
32	47		I	III	III	III	III	III	II					II	
33	48			III	III	III	III	II	III					III	
34	49		I	I	I		III	III	III					III	
35	51		II/III	III	III	III	I	III	III					III	
36	60			III	III	III	I								
37	61			III	III	III	III	I	I						

Legenda: MK = marcador; ToxoDB = banco de dados virtual com informações concernentes ao parasita *Toxoplasma gondii*.

Tabela 22 - Resultado dos alelos amplificados de cada um dos marcadores utilizados para genotipagem de *T. gondii* das amostras extraídas a partir de material congelado de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs

N Total	Nº Pesquisa	MK														ToxoDB
		SAG1	3'SAG2	5'SAG2	3'+5'SAG2	ALT-SAG2	SAG3	GRA6	BTUB	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO		
1	17	II/III	I/III	I	I	II	III	III	III	III	II	III	I	III	I	Novo
2	18	I	I/III	III	III	III	III	III	III	III	II	III	II	III	I	Novo
3	19	I	I/III*	III*	III*	III	III*	III	I*	u-1	III	I	u-1	I	Novo	
4	22	I	I/III	III	III	u-1	III	III	III	II	III	II	III	III	Novo	
5	23	I	I/III*	I*	I*	II	III*	III*	II*	I	III	I	II	II	Novo	
6	24	I	I/III	I*	I*	II	III	II*	III*	I	III	I	II	II	Novo	
7	25	I	I/III	I	I	I	III	II	I	u-1	III	I	I	III	Novo	
8	28	II/III	I/III*	I*	I*	II	I*	III	III*	II	III	I	III	III	Novo	
9	30	I	I/III	III	III	III	III	III	III	I	III	I	u-1	I	Novo	
10	31	I	I/III	I*	I	III	III*	III	I*	I	III	II	I	II	Novo	
11	32	I	I/III*	I*	I*	II	III*	II*	III	I ou u-1	III	I	II	III	Novo	
12	40	I	I/III	III	III	III	III	III	III	I	III	I	III	I	Novo	
13	42	II/III	I/III*	III*	III*	II	III*	III*	I	II	III	I	I	NA	Novo	
14	43	I	I/III	I	I	I	III	II	III*	u-1	I	I	I	III	Novo	
15	50	I	I/III*	III*	III*	u-1	III*	II*	II*	u-1	I	II	III	I	Novo	
16	53	II/III	I/III*	I*	I*	II	I*	III	III*	II	III	I	III	I	#97	
17	54	I	I/III*	III*	III*	III	III*	II*	III*	III	I	II	III	I	Novo	
18	55	I	I/III*	III*	III*	I	III*	II*	III*	II	III	II	III	I	Novo	
19	56	I	I/III*	I*	I*	II	III*	III*	II*	I	III	I	II	III	Novo	
20	57	I	I/III*	III*	III*	III	III*	II*	II*	III	I	II	III	NA	Novo	
21	58	I	I/III*	III*	III*	II	III*	III*	III*	III	I	I	II	I	Novo	
22	59	I	I/III*	III*	III*	III	I*	III*	III*	II	I	I	III	I	Novo	

Legenda: MK = marcador; ToxoDB = banco de dados virtual com informações concernentes ao parasita *Toxoplasma gondii*; NA = não amplificado.

Observação: os asteriscos apontam alguns marcadores amplificados em material parafinado.

## 5.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS DIFERENTES ABORDAGENS EMPREGADAS

### 5.6.1 Características epidemiológicas e genotipagem por PCR-RFLP

A análise comparativa entre as famílias de primatas neotropicais e a determinação de um novo genótipo está representada na tabela 23.

Tabela 23 - Associação entre a determinação de um novo genótipo de *T. gondii* e a família de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020.

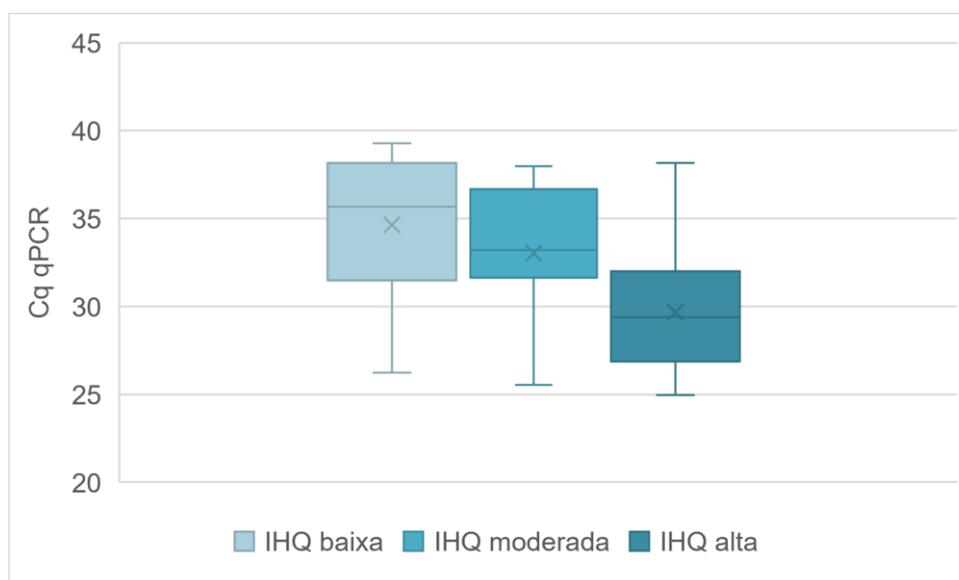
	Não-amplificada	Novo genótipo	Genótipo indexado previamente
<b>Atelidae</b>	14	8	0
<b>Cebidae</b>	25	11	ToxoDB #97

Legenda: ToxoDB = banco de dados virtual com informações concernentes ao parasita *Toxoplasma gondii*.

### 5.6.2 Características imuno-histoquímicas e PCR em tempo real

A análise comparativa entre a quantidade de ciclos (Cq) da PCR em tempo real e a graduação da imunomarcagem na IHQ em fígado e baço está representada nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

Gráfico 1 - Boxplot de associação entre a intensidade da imunomarcagem hepática para *T. gondii* e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real (qPCR) em primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs



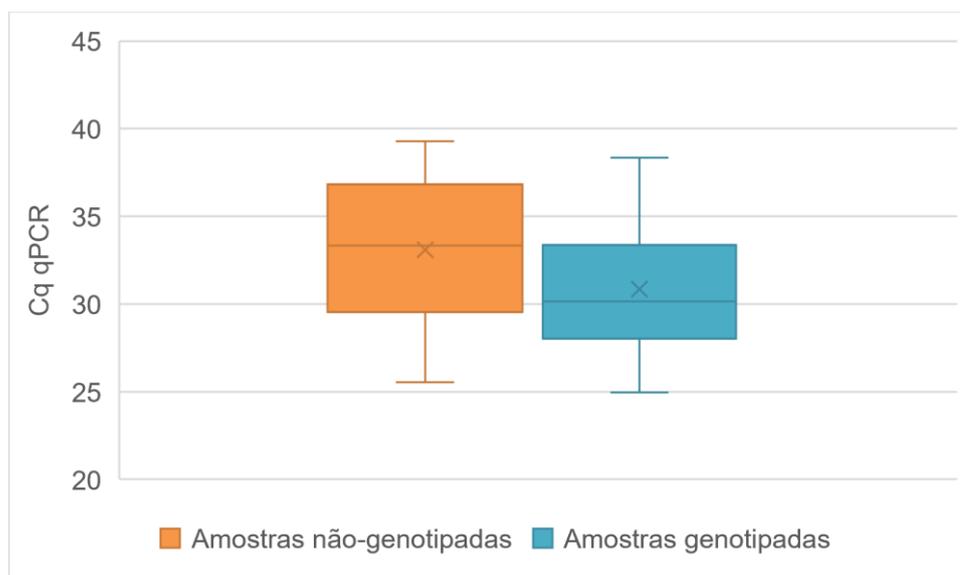
Legenda: Cq = quantidade de ciclos; qPCR = reação em cadeia de polimerase em tempo real, quantitativa.

Observação: houve correlação estatisticamente significativa ( $p=0,000461502$ ).

### 5.6.3 PCR em tempo real e genotipagem por PCR-RFLP

A análise comparativa entre a quantidade de ciclos (Cq) da PCR em tempo real e a genotipagem das amostras está representada no gráfico 2.

Gráfico 2 – Boxplot de associação entre determinação de um novo genótipo e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real (qPCR) para *T. gondii* das amostras de primatas neotropicais. Instituto Adolfo Lutz, 01/2015 a 06/2020. \*Obs



Legenda: Cq = quantidade de ciclos; qPCR = reação em cadeia de polimerase em tempo real, quantitativa.

Observação: houve correlação estatisticamente significativa ( $p=0,040185936$ ).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Este trabalho contou com a parceria entre o LAPCOM e o IAL. Dos 4136 PNTs recebidos por conveniência pelo IAL no período de janeiro de 2015 a junho de 2020 para a vigilância epidemiológica de febre amarela, 61 espécimes foram diagnosticados com toxoplasmose, oriundos de diferentes lugares do Brasil, incluindo o Distrito Federal e cinco diferentes estados brasileiros: PB, PR, RS, SC, SE e SP. O estado de São Paulo foi o mais representado, com 66% dos casos (40/61). Do total de animais, 54% eram provenientes de vida livre (33/61), e para muitos não constava o local preciso de origem na ficha SINAN; ainda, foram incluídos 5 animais mantidos sob cuidados humanos em cativeiro, que compuseram 8% do total dos dados. Assim, os resultados foram discutidos de modo generalista considerando uma casuística majoritariamente composta por animais de vida livre, oriundos de mata, ambiente urbano ou ambiente rural.

Dos PNTs encaminhados tendo como origem reconhecidamente a vida livre, 73% (24/33) eram provenientes de ambiente urbano, seguidos de 18% (6/33) oriundos de ambiente rural e, em menor quantidade, foram diagnosticados 9% (3/33) de PNTs encontrados em região de mata. Este resultado favorece a formulação da hipótese de que os PNTs em vida livre mais expostos à infecção pelo *T. gondii* estão diretamente envolvidos em um ambiente mais antropizado, onde possa existir uma maior necessidade destes animais descerem ao solo, seja devido ao acesso facilitado à restos de alimentos, ou à escassez de comida no ambiente natural, ou ainda devido à fragmentação do habitat (PINTO et al., 2009; ARAÚJO; LIESENFELD, 2018; CALLE-RENDÓN et al., 2020; Ó.M. CHAVES et al., 2021), fazendo com que estes animais tenham uma maior exposição a ambientes contaminados por fezes de felídeos domésticos semidomiciliados ou não-domiciliados – assim como sabidamente acontece em PNTS mantidos sob cuidados humanos, em cativeiro (CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013; NISHIMURA et al., 2019) – ainda, ressalta-se o incremento da possibilidade da ingestão de pequenos vertebrados sinantrópicos infectados (ASSUNÇÃO, 2020). Os resultados aqui apresentados e relacionados com a maior frequência de toxoplasmose em

PNTs de vida livre encontrados em regiões urbanas e rurais corroboram aqueles relatados por ASSUNÇÃO (2020).

Em contradição à relevante frequência da toxoplasmose como causa de morte em indivíduos mantidos em cativeiro, representando aproximadamente de 10 a 15% dos óbitos (EPIPHANIO, 2001), a incidência de toxoplasmose como causa de morte foi baixa em indivíduos de vida livre, sendo diagnosticados somente em 1,5% (61/4136) total de casos de *Alouatta* spp., *Callithrix* spp, e *Brachyteles arachnoides* recebidos pelo IAL para o programa de vigilância de febre amarela durante o período estudado.

Em relação aos surtos, foram observados seis episódios distintos (30% - 18/61), sendo somente um destes envolvendo animais de diferentes famílias. A diversidade de famílias envolvidas num único surto de toxoplasmose em PNTs também é relatada por SANTANA et al. (2020), que analisou animais mantidos em cativeiro, sob cuidados humanos, dos gêneros *Alouatta* spp (família Atelidae) e *Sapajus* spp (família Cebidae). Apesar de acreditarmos na maior tendência do encontro de surtos, ao invés de casos isolados - isso considerando as vias de transmissão do *T. gondii* - houve uma maior frequência de casos individuais no presente estudo (70% - 43/61), talvez por conta de um viés amostral por parte dos órgãos responsáveis pelo envio dos materiais. Estas dúvidas ressaltam a necessidade de novos estudos para compreender a correlação entre as epizootias e os PNTs em vida livre.

Ainda, considerando todos PNTs recebidos pelo IAL durante o período do trabalho, a frequência de diagnósticos de toxoplasmose entre as famílias Atelidae (2%; 22/1152) e Cebidae (1%; 37/2986) foi semelhante. No entanto, dentre os 61 casos diagnosticados como toxoplasmose, a frequência de casos em indivíduos da família Cebidae foi aparentemente maior, uma vez que estes compuseram 61% (37/61) dos diagnósticos confirmados dessa enfermidade, quando comparado aos indivíduos da família Atelidae que compuseram 36% (22/61) dos casos. Este dado corrobora estudos sorológicos que sugerem uma maior susceptibilidade dos indivíduos da família Cebidae, especialmente membros da subfamília Callitrichinae, à toxoplasmose devido à baixa ocorrência de animais com títulos ao *T. gondii* (PIRES et al., 2012; CATÃO-DIAS; EPIPHANIO; KIERULFF, 2013; NIEHAUS et al., 2020).

Quanto à faixa etária conhecida, 95% dos animais acometidos eram jovens, adultos ou idosos (36/38), o que denota uma maior probabilidade da infecção adquirida, e não congênita, sendo que a enfermidade foi observada somente em dois filhotes (5%; 2/38 animais cuja idade estava identificada em ficha). Este resultado corrobora estudos anteriores, onde os animais diagnosticados majoritariamente eram adultos (EPIPHANIO, 2001; FURUTA et al., 2001; EPIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; SILVA, 2016a), não havendo nenhum relato de transmissão transplacentária em PNTs, e apenas um único caso em estrepsirrino (JUAN-SALLÉS et al., 2011).

Foi observada a ocorrência de um caso em *Brachyteles arachnoides*, oriundo de região de mata, no município de Eldorado/SP. Os muriquis-do-sul são considerados, desde 2019, uma espécie criticamente em perigo de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), com população estimada de menos de 1500 indivíduos (TALEBI et al., 2021). De acordo com a literatura consultada, este foi o quarto óbito de *B. arachnoides* por toxoplasmose, sendo o segundo de vida livre e o primeiro filhote desta espécie. Os relatos anteriores ocorreram em dois machos adultos mantidos em cativeiro pelo Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), situado no município de Guapimirim, no Rio de Janeiro (SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2014) e uma fêmea adulta de vida livre, encontrada na região do vale do Ribeira, em São Paulo (SANTOS et al., 2018). Estudos acerca da patógenos inseridos em populações ameaçadas são de grande importância para a conservação (DEEM; KARESH; WEISMAN, 2001 *apud* BUENO et al., 2017). Ainda, cerca de 25% (35/150) dos primatas do Brasil são classificados como ameaçados, e destes ameaçados aproximadamente 70% (17/25) estão distribuídos na Mata Atlântica (BRASIL, 2014b), um bioma que atualmente ocupa 8% da área original (ALFARO, 2017). Espécies de primatas já ameaçadas de extinção que vivem em habitats fragmentados como a Mata Atlântica (PINTO et al., 2009; COSTA-ARAÚJO et al., 2021), podem ser mais criticamente afetadas pelas mudanças climáticas que estamos provocando (GRAHAM; MATTHEWS; TURNER, 2016). Ainda, os muriquis-do-sul estão restritos a somente 20 manchas florestais na Mata Atlântica, que estão distribuídas nos estados do Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo que este último comporta 60% (12/20) das áreas protegidas ocupadas por essa espécie (TALEBI et al., 2021). Na nossa opinião, considerando os dados acima elencados acerca da gravidade da situação conservacionista dos muriquis, o

relato de óbito por toxoplasmose em um espécimen de vida livre é preocupante e ressalta a importância do constante monitoramento da sanidade destas populações.

Em relação à sazonalidade, apesar da literatura apontar uma maior frequência de casos de toxoplasmose em períodos quentes e úmidos (FRENKEL; RUIZ, 1981; NIEHAUS et al., 2020), não foi possível observar uma diferença significativa em relação ao período do ano (tanto em relação à estação do ano, quanto à precipitação). Também não foram observadas diferenças em relação ao sexo dos animais, apesar de estudos anteriores apontarem uma maior frequência em fêmeas (EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; PIRES et al., 2012; SILVA, 2016a; MINERVINO et al., 2017; OLIVEIRA, 2020). Devido aos resultados inéditos obtidos em nosso estudo, a continuidade dos trabalhos, com aumento de relatos e descrições, poderá contribuir para esclarecer futuramente estes aspectos epidemiológicos.

## 6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Quanto a assinatura histomorfológica da doença nos órgãos e tecidos, a maioria dos achados reforça estudos anteriores acerca da histomorfologia da toxoplasmose em PNTs (EIPHANIO, 2001; EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; SANTOS, 2011; CASAGRANDE et al., 2013; CATÃO-DIAS; EIPHANIO; KIERULFF, 2013; SANTOS et al., 2018; SANTANA et al., 2020). Assim como reportado por EIPHANIO (2001), EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS (2003), SANTOS et al. (2018), e ASSUNÇÃO (2020), a presença de lesão necrótica lobular hepática de distribuição aleatória é um achado fortemente sugestivo de toxoplasmose em PNTs, uma vez que 100% (50/50) dos casos deste trabalho, cujo fígado foi avaliado, apresentaram este tipo de lesão, em diferentes intensidades, mas predominantemente moderada - 54% (27/50); frequentemente esteve associada a hepatite mista - 98% (48/49) - em concordância com ASSUNÇÃO (2020) - de intensidade variável, majoritariamente discreta a moderada - 67% (33/49) e de distribuição lobular em 76% dos casos (37/49). Dilatação e leucocitose sinusoidais discretas estiveram presentes em aproximadamente 80% dos casos (36/50 e 45/50, respetivamente). Outros achados que foram comuns em fígado incluem apoptose - 80% (40/50), além de focos de hemorragia - 72% (36/50), multinucleação hepatocelular - 46% (23/50), mínima destrabeculação - 50% (20/40), esteatose

discreta - 37% (15/41), e pigmento castanho sugestivo de hemossiderina - 28% (14/50). A hemossiderose hepática também foi um achado relatado por EIPHANIO (2001) e EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS (2003) em cebídeos, enquanto que a nossa casuística foi composta principalmente por atelídeos. Ainda, a fibrose esteve presente em 26% (13/50) dos casos, predominantemente discreta, em 62% dos casos (8/13). Fibrose em ponte representou 15% dos casos. Outras características avaliadas como balonização, degeneração glicogênica nuclear hepatocitária, ectasia ductal, obliteração ductal, mineralização, presença de megacariócitos, infiltrado inflamatório mononuclear ou centrado em zona portal, necrose centrolobular ou mediozonal foram considerados incomuns e representaram menos de 10% dos casos. Ainda, vale ressaltar que os achados de necrose, esteatose e apoptose em fígado também foram comumente relatados em PNTs com febre amarela (FERNANDES et al., 2017) – doença zoonótica imunoprevenível de notificação compulsória que justificou o envio de todas as amostras utilizadas para o presente trabalho – podendo então considerar a febre amarela como um dos diagnósticos diferenciais à toxoplasmose no contexto histomorfológico.

No baço, foi frequentemente observada esplenite aguda multifocal - 85% (41/48), predominantemente discreta - 39% (16/41), com necrose - 96% (46/48) e depleção linfóide - 73% (35/48), ambos os últimos aspectos de intensidade majoritariamente moderada, com 43% (20/46) e 57% (20/35) respectivamente de frequência cada – estes achados também foram reportados na literatura consultada (EIPHANIO, 2001; SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2018; ASSUNÇÃO, 2020). Comumente foi observado congestão - 77% (37/48). Outros achados avaliados como hiperplasia linfóide [também relatada por EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS (2003) e ASSUNÇÃO (2020)] e hematopoiese extramedular foram vistos em menos de 20% dos casos; ainda, trombose foi considerada incomum e representou menos de 5% dos casos.

No rim, 81% (35/43) dos casos apresentaram nefrite intersticial, prevalecendo a intensidade moderada em 51% (18/35) dos casos, com predomínio de quadros crônicos - 71% (25/35). Uma variação do tipo de células inflamatórias lesionais nos quadros de nefrite intersticial também foi relatada por EIPHANIO (2001), que caracterizou lesões crônicas e subagudas em maioria dos casos (~90%) em relação às agudas. Proteinose tubular foi observada em 70% (30/43) dos casos, e a necrose tubular aguda em 67% (29/43). Outros achados avaliados como mineralização e

regeneração tubular representaram menos de 20% dos casos; ainda, também foram relatados com frequência inferior a 10% os processos de tireoidização tubular, glomerulopatia membranosa discreta - sendo essa última alteração também relatada por EPIPHANIO (2001). Tubulite e glomeruloesclerose estiveram presentes em menos de 5% dos casos.

No pulmão, a pneumonia intersticial necrotizante foi encontrada em 95% (35/37) dos casos, na totalidade dos casos associada a um infiltrado misto (37/37 - 100%). A intensidade da pneumonia variou principalmente entre discreta a moderada - 84% (31/37). Edema - 93% (37/40), congestão - 93% (37/40) e hemorragia alveolar - 83% (33/40) foram achados muito frequentes. Estes dados corroboram informações observadas na literatura consultada (EPIPHANIO, 2001; FURUTA et al., 2001; ASSUNÇÃO, 2020). A presença de macrófagos alveolares foi notada em 33% (13/40) dos casos, e a trombose foi observada em 20% (8/40), sendo ambos estes achados também relatados por SANTOS (2011). Ainda, presença de pigmento castanho sugestivo de hemossiderina foi observado em menos de 10% dos casos; e hiperplasia de BALT, ossificação e presença de megacariócitos foram descritos em menos de 5%.

Por sua vez, no coração, foi frequente a observação de infiltrado inflamatório - 65% (30/46) principalmente multifocal em áreas restritas ao miocárdio - 63% (19/30), predominantemente de intensidade mínima - 53% (16/30). A necrose em foi relatada em 17% dos casos (8/46), predominantemente discreta - 75% (6/8). Distúrbios hemodinâmicos, como congestão, hemorragia e trombose, foram considerados incomuns, com menos de 20% dos casos apresentando essas lesões. A miocardite, em graus variáveis de intensidade, constituiu um achado amplamente relatado em literatura consultada (EPIPHANIO, 2001; SANTOS, 2011; ASSUNÇÃO, 2020).

Na avaliação do encéfalo, quadros de encefalite foram observados em 27% (11/41) dos casos, de intensidade mínima - 45% (5/11) a discreta 55% (6/11), enquanto que meningite foi observada em 10% (4/41) dos casos, também de mínima 75% (3/4) a discreta 25% (1/4). Houve predomínio de lesões inflamatórias multifocais (aproximadamente 70%), com tipo celular inflamatório variável, sendo as lesões supurativas prevalentes (aproximadamente 70%). Em relação à encefalite, nossos achados corroboram em parte aqueles observados por ASSUNÇÃO (2020) e SANTOS et al. (2018), que relataram infiltrados não-supurativos.

Os sítios onde mais foram observadas estruturas parasitárias de *T. gondii* (cistos teciduais e taquizoítos) na análise de tecidos corados pela HE foram baço – 91% (52/57), fígado – 87% (53/61) e pulmão – 70% (33/47). O trabalho de ASSUNÇÃO (2020) incluiu a quantificação parasitária e qualificação em cistos ou taquizoítos em fígado, baço e rim, e relatou uma maior frequência de formas parasitárias também em fígado e baço, quando comparado ao pulmão, semelhantemente ao que observamos no presente trabalho.

Foram observadas infecções concomitantes por metazoários, que representaram 13% (8/61), sendo: microfilárias encontradas em baço - 6% (3/48); trematódeos em ductos biliares 8% (4/50); e nematódeos adultos em pulmões - 3% (1/40). Dentre os trematódeos, todos foram classificados como do gênero *Platynosomum* spp., e 75% (3/4) dos casos ocorreram em períodos chuvosos, o que confronta com os dados encontrados em PNTs colombianos por RONDÓN (2017) e colaboradores, que relataram uma maior frequência em períodos secos. Em relação às microfilárias, os filarídeos relatados em literatura com maior frequência em PNTs pertencem ao gênero *Dipetalonema* spp. (ROCHA, 2014; CONGA et al., 2018). A realização de trabalhos complementares será importante para caracterizar e melhor compreender o papel das coinfeções no curso da toxoplasmose em PNTs.

Ainda, foram observados quadros de cirrose em 3% (2/61) dos animais, sendo um destes também associado à amiloidose sistêmica (acometendo fígado, baço e rim), constituindo este o primeiro relato deste padrão de ocorrência já descrito em PNT (DOS SANTOS et al., 2021).

### 6.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imunomarcagem foi positiva na totalidade de casos englobados e em todos os diferentes órgãos e tecidos estudados (fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo), favorecendo a evidência de que a toxoplasmose em PNTs assume um padrão sistêmico, resultado este que vai ao encontro de estudos anteriores (EIPHANIO, 2001; EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; GRUMANN et al., 2017).

Os tecidos mais frequentemente imunomarcados foram fígado - 100% (54/54), baço - 100% (48/48) e rim - 73% (30/41); no entanto, estes também foram os tecidos mais representados, uma vez que o IAL assumiu nos últimos anos a padronização de incluir estes três órgãos em um único bloco. Estes resultados foram próximos aos encontrados por EPIPHANIO (2001), que observou uma maior quantidade de estruturas imunomarcadas em fígado, baço e linfonodos (não incluídos no nosso estudo); e próximos dos resultados encontrados por ASSUNÇÃO, 2020 que relatou uma frequência maior de fragmentos de fígado e baço com formas imunomarcadas.

A autólise esteve presente em aproximadamente 16% dos casos (~10/61), no entanto, esta condição pareceu não ter interferido no resultado do procedimento, imuno-histoquímico, evidenciando, desta forma, a imuno-histoquímica como uma análise de altas sensibilidade e especificidade, positivando todos os casos previamente suspeitos pela análise histopatológica. Um estudo prévio comparativo entre diferentes métodos de diagnóstico de toxoplasmose em galinhas classificou a imuno-histoquímica, vinculada à histopatologia, como ferramenta útil e com alta especificidade - em torno de 98% (CASARTELLI-ALVES et al., 2014). No entanto, DUBEY (2022) descreveu a especificidade da reação de imuno-histoquímica variável, de acordo com os anticorpos empregados, assumindo uma reação cruzada com outros organismos relacionados quando do uso de anticorpos policlonais, e uma maior especificidade quando do emprego de anticorpos monoclonais anti-MIC3, que identifica o vacúolo parasitóforo.

Em relação à graduação da imunomarcção, a maioria dos casos foi caracterizada com alta quantidade de formas parasitárias, tanto em fígado (20/54 - 37%) quanto em baço (18/48 - 38%). ASSUNÇÃO (2020) e EPIPHANIO (2001) quantificaram e qualificaram a observação de cistos teciduais e taquizoítos pela imuno-histoquímica, no entanto não graduaram a imunomarcção. No entanto, CAROSSINO (2021) e colaboradores graduaram a intensidade da imunomarcção, em cangurus-vermelho, com anticorpos que marcaram VP's, e observaram uma maior quantidade de parasitos em pulmão, seguido de coração e fígado.

## 6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR

### 6.4.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real mostrou-se positiva em 97% dos casos (59/61), com resultado de  $Cq \leq 40$ . Dos dois casos negativos (n<sup>os</sup> 3 e 22), um deles (n<sup>o</sup> 3) apresentava baixo grau de imunomarcção em baço (único órgão submetido à IHQ), além de um padrão histopatológico hepático distinto, com formação de microabscessos; por outro lado, o caso n<sup>o</sup> 22 apresentava moderado grau de imunomarcção em fígado e baço, com PCR convencional amplificada e genotipagem apontando um potencial novo genótipo Assim, apesar da qPCR ser descrita como método de altas sensibilidade e especificidade para detecção de *T. gondii* (DUBEY, 2022), o presente resultado sugere que um cuidado particular deve ser tomado na interpretação dos resultados, especialmente quando vão de encontro àqueles obtidos na IHQ. Neste sentido, uma maior sensibilidade da IHQ em quadros agudos, e o inverso em quadros crônicos, quando comparada a PCR convencional foi relatada em estudos com camundongos experimentalmente infectados (LOUÇÃO TERRA et al., 2004) – como o quadro da toxoplasmose em PNTs é sabidamente agudo, talvez isso possa justificar uma maior positividade pela IHQ em relação à qPCR. Somado a isso, o gene alvo B1, utilizado na nossa metodologia da qPCR, foi relatado como tendo uma menor sensibilidade quando comparado com a sequência REP-529 para detecção de *T. gondii* (CAMILO et al., 2017). A autólise não pareceu interferir no resultado do qPCR, o que diverge dos resultados de LOUÇÃO TERRA et al. (2004).

A concordância entre a positividade em 100% dos casos para as análises imuno-histoquímicas e histopatológicas, somada à ausência da positividade em 3% dos casos (2/61) na qPCR, também corrobora com o fato que o material emblocado apresenta uma menor preservação do material genético, devido à alta temperatura utilizada no processamento (LIBÓRIO et al., 2005); ou ainda, pelo fixador utilizado em todos os casos, a formalina, que causa danos à integridade das proteínas e ácidos nucleicos, além de desencadear reações químicas de quebra de pontes de hidrogênio nas regiões ricas em adenina e timina, resultando em fragmentação do DNA (GOUVEIA et al., 2016; OBOMA; NGOKERE, 2018; ZADA et al., 2018), dificultando a amplificação. Somado a isso, é sabido que o DNA presente nos tecidos emblocados perde a integridade ao longo do tempo, podendo ser considerada uma amostra inadequada para técnicas moleculares que requerem DNA de alto peso molecular devido à dificuldade da amplificação (LIBÓRIO et al., 2005). A mesma hipótese poderia justificar a dificuldade de amplificação dos

marcadores, principalmente aqueles compostos por fragmentos maiores – L358, C29-2, C22-8, ALT-SAG2, APICO e PK1 – na PCR convencional, a partir de blocos parafinados. Ainda, FERREIRA (2011) e colaboradores também relataram alta taxa de insucesso para a genotipagem a partir de amostras de sangue, líquido e líquido amniótico, com 33% (20/60) das amostras genotipadas (oito ou mais marcadores amplificados); os marcadores com amplificação dificultosa para estes autores foram c29-2, L358, PK1 e APICO. No entanto BASTOS DA SILVA (2016) e colaboradores também descreveram dificuldade principalmente na amplificação dos marcadores c22-8, c29-2, L358, PK1 e APICO, porém, apresentaram tipificação de mais de 8 marcadores de todas as 30 amostras de blocos parafinados utilizadas referentes à 15 pacientes aidéticos que evoluíram para óbito devido toxoplasmose severa disseminada, todos com óbito entre 2005 e 2011, ou seja até 11 anos antes. São necessários novos estudos com amostras emblocadas para genotipagem de *T. gondii* para uma melhor compreensão da interferência deste tipo de amostra para o sucesso da tipificação.

A mensuração de Cq sugeriu uma relação inversamente proporcional à carga parasitária; ou seja, quanto menor o Cq, provavelmente a quantidade de material genético presente na amostra é maior, assim como já foi evidenciado, por exemplo, na febre amarela em PNTs (CUNHA et al., 2019). Em tecido hepático (tecido priorizado para a PCR em tempo real), foi observada diferença estatística entre os três graus de imunomarcção e os valores de Cq, sendo alta quantidade de formas de *T. gondii* imunomarcadas em tecido hepático (>30/campo40x/hotspot em área de 2,37mm<sup>2</sup>) compatível com menores valores de Cq; moderada quantidade de formas de *T. gondii* imunomarcadas em tecido hepático (>15/campo40x/hotspot em área de 2,37mm<sup>2</sup>) associada a moderados valores de Cq; e a baixa quantidade de formas de *T. gondii* imunomarcadas em tecido hepático (<10/campo40x/hotspot em área de 2,37mm<sup>2</sup>) compatível com altos valores de Cq. A correlação entre o Cq observado na PCR em tempo real e a quantidade de parasitos imunomarcados também foi relatada por CAROSSINO et al. (2021), em amostras de cinco cangurus-vermelho (*Macropus rufus*); no entanto, os autores relataram não terem conseguido estabelecer uma precisa correlação devido ao baixo N amostral.

### 6.4.2 Genotipagem por PCR-RFLP

A genotipagem por PCR-RFLP permitiu a amplificação completa somente das amostras extraídas a partir de órgãos e tecidos congelados, os quais todos também apresentavam um baixo valor de Cq (análise em tempo real feita de blocos parafinados), sendo, inclusive, observada diferença estatisticamente significativa entre o Cq das amostras genotipadas completamente e das amostras não-genotipadas. A interpretação dos resultados da eletroforese em gel de agarose foi realizada comparando uma bateria de géis para cada um dos genótipos-padrão com o padrão de peso molecular de 50 pares de base (Invitrogen™), utilizado para cada reação, mas por limitação do tamanho da cuba de eletroforese, não foram adicionados os genótipos-padrão em cada corrida, fazendo com que os resultados sejam avaliados de forma cuidadosa no que concerne representarem potenciais novos genótipos.

O conhecimento acerca dos genótipos envolvidos na toxoplasmose em PNTs é muito escasso (DUBEY, 2022), sendo que Dubey e colaboradores (2021) recentemente revisaram a ocorrência de 16 genótipos distintos em PNTs, em uma gama de 282 genótipos já reportados em todo o mundo (DUBEY, 2022). No presente trabalho foram encontrados 22 potenciais genótipos de *T. gondii* – este número absoluto de genótipos caracterizados em nossa pesquisa representa, proporcionalmente, um incremento em mais que 100% do conhecimento de genótipos de *T. gondii* previamente descritos em PNTs. Destes 22 genótipos, 21 são potenciais novos genótipos, sendo 52% (11/21) de amostras oriundas de cebídeos e 38% (8/21) de amostras oriundas de atelídeos, além de 10% (2/21) de PNTs não-identificados.

Não foi possível estabelecer uma comparação entre os genótipos e a ocorrência conforme a localização geográfica, devido a grande quantidade de novos potenciais genótipos; no entanto 86% (18/21) dos potenciais genótipos amplificados se referem a amostras enviadas do estado de São Paulo, e somente duas do estado do Paraná (casos 30 e 40) e uma do estado de Santa Catarina (caso 31). É interessante apontar que dentre os surtos, houve a amplificação de mais de uma amostra em somente uma das epizootias (surto 4 - animais 23 e 24), revelando a alternância de somente dois dos alelos referentes aos marcadores GRA6 e BTUB, caracterizando dois diferentes genótipos potenciais. A distinção de genótipos

envolvidos em surtos de toxoplasmose em PNTs também foi relatada por SANTANA et al. (2020).

A única amostra previamente descrita em literatura encontrada corresponde ao genótipo ToxoDB #97/GUY-DOS (TgH18001), o qual havia sido encontrado em um homem, na Guiana Francesa, em 2002 (CARME et al., 2002). Esse genótipo é vinculado à “toxoplasmose aguda severa”, cujos casos estão associados a humanos imunocompetentes, sendo os relatos restritos ao bioma Amazônico e por isso o processo também é conhecido como “toxoplasmose amazônica” (NUNURA et al., 2010; DEMAR et al., 2012; VITALIANO et al., 2014; BLAIZOT et al., 2020; DUBEY, 2022). O caso do PNT do nosso estudo é referente a um *Callithrix* spp. de vida livre, de zona urbana do município de São José do Rio Preto/SP. Este resultado reforça a necessidade de constante monitoramento dos genótipos dos casos de toxoplasmose, tanto em humanos quanto em animais.

Somado a isso, os genótipos brasileiros vêm sendo caracterizados como atípicos devido à alta heterogeneidade, sendo chamados de "*Brazilian strain*" (FRANCO et al., 2015, 2019), levando este nome por conta da ampla diversidade genética de *T. gondii* no Brasil (DUBEY et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013; VITALIANO et al., 2015) com relatos de genótipos com resistência farmacológica à sulfadiazina e a pirimetamina nos tratamentos em humanos (BESSA et al., 2021).

Desta forma, os resultados relatados no presente trabalho ressaltam e corroboram a importância dos primatas não humanos no contexto zoonótico da toxoplasmose, com a ampla diversidade de genótipos em nosso território e, ainda, a marcante diversidade de genótipos que ocorrem em PNTs de vida livre.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados alcançados, e considerando a literatura consultada que aponta que este foi o trabalho retrospectivo com dados inéditos com maior N amostral (61) majoritariamente de PNTs sabidamente de vida livre já publicado, é possível afirmar que o banco de amostras do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, é uma rica fonte para pesquisas envolvendo PNTs de vida livre.

Dentre os resultados obtidos, destaca-se o diagnóstico do quarto óbito relatado de muriqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) devido à toxoplasmose, sendo este a primeira descrição envolvendo filhote desta espécie e a segunda em vida livre. Tendo em vista que os *B. arachnoides* ocupam um bioma altamente fragmentado, por estarem criticamente ameaçados de extinção, e devido ao conhecido impacto que esta enfermidade apresenta para parcela importante dos PNTs, é importante que novos estudos busquem esclarecer a dinâmica do *T. gondii* nessas populações em vida livre para uma melhor contribuição de diretrizes conservacionistas para a espécie.

A assinatura histomorfológica da toxoplasmose em PNTs em vida livre é marcada principalmente pela hepatite aguda necrotizante multifocal aleatória, esplenite aguda necrotizante, além de pneumonia intersticial e necrotizante mista multifocal, com edema e hemorragia alveolar. Esses achados são compatíveis com a histomorfologia previamente descrita detalhadamente em trabalhos disponíveis na literatura, que é baseada predominantemente em amostras de PNTs mantidos sob cuidados humanos em cativeiro. Os órgãos que apresentaram maior quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* observados tanto na histopatologia quando na imuno-histoquímica foram fígado e baço, corroborando estudos prévios. Todos os órgãos analisados foram imunomarcados, reafirmando estudos anteriores que apontam a toxoplasmose como uma doença de caráter sistêmico em PNTs.

A técnica de IHQ foi confirmatória na totalidade de casos suspeitos para *T. gondii*, ao passo que a técnica de PCR em tempo real não confirmou a ocorrência em dois casos; assim, com base nos resultados histopatológicos e da genotipagem, sugere-se uma ressalva na interpretação dos resultados negativos da PCR em tempo real, sendo indicada a associação com outros procedimentos diagnósticos e a associação com dados clínico-epidemiológicos *ante-mortem*, sempre que possível.

Ainda, a técnica PCR em tempo real demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre a faixa de um menor valor de Cq e a maior quantidade de parasitos imunomarcados em tecido hepático, correlação cuja tendência já foi observada em um estudo com outros animais acometidos por toxoplasmose.

A genotipagem permitiu a identificação de 21 potenciais novos genótipos de *T. gondii*, dentre uma gama de 282 genótipos previamente conhecidos em todo o mundo em diferentes espécies, e de 16 genótipos previamente conhecidos acometendo PNTs, demonstrando uma ampla diversidade de genótipos em PNTs brasileiros e favorecendo estudos que apontam o Brasil como o país com a maior diversidade genética de *T. gondii* em todo o mundo. Foi também identificada a presença de um potencial genótipo previamente conhecido (ToxoDB #97), que é vinculado a ocorrência de toxoplasmose aguda severa em humanos imunocompetentes residentes do bioma Amazônico, sendo este genótipo identificado na Amazônia da Guiana Francesa e, a partir do nosso estudo, também em um PNT de vida livre, de zona urbana do município de São José do Preto/SP, área que originalmente seria de Mata Atlântica. Estes resultados apontam uma necessidade de maiores estudos acerca do conhecimento dos genótipos circulantes em PNTs e do esclarecimento da possível circulação de genótipos hipervirulentos na região sudeste do Brasil.

Finalmente, consideramos que os dados ora apresentados salientam e reforçam a importância da verticalização do conhecimento sobre a toxoplasmose em PNTs, assim como o contínuo monitoramento sanitário das populações de PNTs, tanto em vida livre quanto sob cuidados humanos em cativeiro, frente a esta protozoose, enfermidade reconhecidamente capaz de causar impactos devastadores em populações de platinos.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. A. et al. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. **EcoHealth**, v. 16, n. 2, p. 378–390, 2019.

ALFARO, J. L. The Monkeying of the Americas: Primate Biogeography in the Neotropics. **Annual review of anthropology**, v. 46, p. 317–36, 2017.

APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1187–1191, 2000.

ARAÚJO, A. J. B.; LIESENFELD, M. V. A. Ocorrência de Primatas Não-Humanos no Ambiente Urbano de Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 113–127, 2018.

ARISTIDE, L. et al. Cranial and endocranial diversity in extant and fossil atelids (Platyrrhini: Atelidae): A geometric morphometric study. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 169, n. 2, p. 322–331, 2019.

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

BALDWIN, J.; BALDWIN, J. The squirrel monkeys, genus *Saimiri*. In: COIMBRA-FILHO, A.; MITTERMEIR, R. A. (Eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 241–276.1981.

BARBOSA, H.S.; MUNO, R.M.; MOURA, M.A. O Ciclo Evolutivo. In: SOUZA, W., and BELFORT J. R. **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 33-45. 2014.

BASTOS DA SILVA, I. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 16–21, 2016.

BENCHIMOL, J.L.; SÁ, M.R. **Adolpho Lutz: Primeiros trabalhos**: Alemanha, Suíça

e Brasil (1878-1883). 1 ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 440 p.

BERTRANPETIT, E. et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150–155, 2017.

BESSA, G. de L. et al. *Toxoplasma gondii* in South America: a differentiated pattern of spread, population structure and clinical manifestations. **Parasitology Research**, v. 120, n. 9, p. 3065–3076, 2021.

BICCA-MARQUES, J.C.; SILVA, V.M.; GOMES, D.F. Ordem Primates. In: REIS N.R., PERACHI A.L., PEDRO WA, L. I. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Editora Universidade Estadual de Londrina, p. 107–150. 2006.

BLAIZOT, R. et al. Outbreak of Amazonian Toxoplasmosis: A One Health Investigation in a Remote Amerindian Community. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–12, 2020.

BOINSKI, S. Mating patterns in squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*) - Implications for seasonal sexual dimorphism. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 21, n. 1, p. 13–21, 1987.

BORDIGNON, M.; SETZ, E.; CASELLI, C. Gênero *Callicebus* Thomas 1903. In: REIS, N.; PERACHI, A.; ANDRADE, F. (Eds.). **Primates brasileiros**. Londrina: Technical Books, p. 153–166. 2008.

BOUER, A. et al. Outbreak of toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. **Folia Primatologica**, v. 70, n. 5, p. 282–285, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria de consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017**. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a. 102 p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **PIB da Agricultura Familiar: Brasil – Estados**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2007. 172 p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de

Saneamento. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: **25º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2019**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Regional, 2020. 183 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014**. Brasília, 2014b.

BRUSATTE, S. L. et al. The extinction of the dinosaurs. **Biological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 628–642, 2015.

BUENO, M. G. et al. Infectious Diseases in Free-Ranging Blonde Capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. **International Journal of Primatology**, v. 38, n. 6, p. 1017–1031, 2017.

CALLE-RENDÓN, B. R. et al. Drivers of primate richness and occurrence in a naturally patchy landscape in the Brazilian Amazon. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 11–12, p. 3369–3391, 2020.

CAMILO, L. M. et al. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 638–647, 2017.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. et al. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 462–469, 2013.

CARME, B. et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4037–4044, 2002.

CARME, B. et al. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 132–135, 2009.

CARNEIRO, A. et al. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes for Isolates from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901–907, 2013.

CAROSSINO, M. et al. Pathologic and immunohistochemical findings in an outbreak of systemic toxoplasmosis in a mob of red kangaroos. **Journal of Veterinary**

**Diagnostic Investigation**, v. 33, n.3, p. 554 –565, 2021.

CASAGRANDE, R. A. et al. Toxoplasmose em primatas neotropicais: Estudo retrospectivo de sete casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 94–98, 2013.

CASARTELLI-ALVES, L. et al. Veterinary Parasitology Sensitivity and specificity of serological tests , histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 346–351, 2014.

CASTRO M.C., et al. Development, environmental degradation, and disease spread in the Brazilian Amazon. **PLoS Biol**, v. 17, n. 11, 2019.

CATÃO-DIAS, J. L.; EPIPHANIO, S.; KIERULFF, M. C. M. Neotropical Primates and Their Susceptibility to *Toxoplasma gondii*: New Insights for an Old Problem. In: BRINKWORTH, J. F.; PECHENKINA, K. (Eds.). **Primates, Pathogens, and Evolution**. New York: Springer, p. 257–289. 2013.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CHEN, R. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from zoo wildlife and pet birds in Fujian, China. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 663–668, 2015.

CHIEBAO, D. P. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii*. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 13, n. 1, 2016.

CLARK, D. P.; RUSSELL, L. D. **Molecular Biology Made Simple and Fun**. Illinois: Cache River Press, 1997. 470p.

CONDAMINE, F. L. et al. Dinosaur biodiversity declined well before the asteroid impact, influenced by ecological and environmental pressures. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

CONGA, D. F. et al. Occurrence of *Dipetalonema gracile* in a wild population of woolly monkey *Lagothrix poeppigii* in the northeastern Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 154–160, 2018.

COSTA-ARAÚJO, B. R. et al. **Conservation of primates and arboreal mammals in the Atlantic Forest**. 2021. Disponível em: <https://www.oryxthejournal.org/blog/conservation-of-primates-and-arboreal-mammals-in-the-atlantic-forest/>. Acesso em: 20 jan 2022.

COSTA-SILVA, S. et al. *Toxoplasma gondii* in cetaceans of Brazil: A histopathological and immunohistochemical survey. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 395–402, 2019.

CUNHA, M. S. et al. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

CUNHA, R. Gênero Aotus Illiger 1811. In: REIS, N. R.; PERACHI, A. L.; ANDRADE, F. R. (Eds.). **Primatas brasileiros**. Londrina: Technical Books, p. 115–125. 2008.

CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One health, emerging infectious diseases and wildlife: Two decades of progress?. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1725, 2017.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366–371, 2008.

DEEM, S. L.; KARESH, W. B.; WEISMAN, W. Putting theory into practice: Wildlife health in conservation. **Conservation Biology**, v. 15, n. 5, p. 1224–1233, 2001.

DEFLEER, T. **Primates of Colombia**. Bogotá: Conservation international, 2003. 550p.

DEMAR, M. et al. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. E221–E231, 2012.

DOS SANTOS, A. L. M. et al. Relato de caso: Amiloidose e toxoplasmose concomitante em sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). In: 6º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Anais...** Evento remoto, 2021.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p. 166–170, 1986.

- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1593–1598, 1994.
- DUBEY, J. P. Duration of Immunity to Shedding of *Toxoplasma gondii* Oocysts by Cats. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410–415, 1995.
- DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: A comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 15–20, 1997.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1- 2, p. 57–72, 2004.
- 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. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 157, n. 7, p. 299–305, 2008.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009a.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 89–103, 2009b.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 313 p.
- DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424. 2012.
- DUBEY, J. P. et al. Recent epidemiologic, clinical, and genetic diversity of *Toxoplasma gondii* infections in non-human primates. **Research in Veterinary Science**, v. 136, n. April, p. 631–641, 2021.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2022. 566 p.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and Other Intestinal Coccidial Infections in Cats and Dogs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1009–1034, 2009.

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.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: What's out and where did they come from. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190–195, 2009.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A. et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280–285, 2009.

ELLWANGER, J. H. et al. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **An Acad Bras Cienc**. v. 92, n.1, p. 1–33, 2020.

EPIPHANIO, S. **Patologia comparada da toxoplasmose em primatas neotropicais mantidos em cativeiro**. 2001. 197 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FERNANDES, N. C. C. de A. et al. Outbreak of Yellow Fever among Nonhuman Primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 12, p. 10–13, 2017.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A. Aspectos Taxonômicos e Evolutivos. In: SOUZA, W.; BELFORT J. R (Eds.). **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 21–31. 2014.

FERREIRA, I. M. R. et al. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 190–195, 2011.

FERREIRA, T. C. R. et al. *Toxoplasma gondii*: Isolation, biological and molecular characterisation of samples from free-range *Gallus gallus domesticus* from countryside Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 384–389, 2018.

FLEAGLE, J. **Primate adaptation and evolution**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1999. 596 p.

FLEGR, J. et al. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

FRAGASZY, D.; VISALBERGHI, E.; FEDIGAN, L. **The complete capuchin—the biology of the genus *Cebus***. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 356 p.

FRANCO, P. S. et al. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 181, 2015.

FRANCO, P. S. et al. Brazilian strains of *Toxoplasma gondii* are controlled by azithromycin and modulate cytokine production in human placental explants. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 10, p. 1–13, 2019.

FREESE, C.; OPPEHHEIMER, J. The Capuchin monkeys, Genus *Cebus*. In: COIMBRA-FILHO, A.; MITTERMEIR, R. (Eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências. p. 331–390. 1981.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A. Endemicity of Toxoplasmosis in Costa Rica. **American Journal of Epidemiology**, v. 113, n. 3, p. 254–269, 1981.

FURUTA, T. et al. Horizontal transmission of *Toxoplasma gondii* in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Experimental Animals**, v. 50, n. 4, p. 299–306, 2001.

- FUZESSY, L. F. Estudo Comparativo da Morfologia de grupos de híbridos de *Callithrix* sp. de vida livre em Viçosa, MG. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- GADDI, P. J.; YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 155–159, 2007.
- GARCIA BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.
- GARCIA, J. L. et al. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 307–311, 2005.
- GARDNER, M. B.; LUCIW, P. A. Macaque models of human infectious disease. **Institute of Laboratory Animal Resources Journal**, v. 49, n. 2, p. 220–255, 2008.
- GOIN, F. J. et al. Origins, Radiations, and Distribution of South American Mammals. In: PATTERSON, B. D.; COSTA, L. P. (Eds.). **Bones, clones, and biomes: The History and Geography of Recent Neotropical Mammals**. Chicago: University of Chicago Press, p. 20-50. 2012.
- GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. **Nota Técnica, Embrapa**. Campo Grande, 24 de março de 2017. p. 2–5.
- GONZALES-VIERA, O. et al. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3–4, p. 358–362, 2013.
- GORE, R. A ascensão dos mamíferos. **National Geographic Brasil**, v. 36, p. 26–61, 2003.
- GOUVEIA, G. R. et al. Nucleic Acids Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools**. IntechOpen, p. 27–36. 2016.
- GRAHAM, T. L.; MATTHEWS, H. D.; TURNER, S. E. A Global-Scale Evaluation of Primate Exposure and Vulnerability to Climate Change. **International Journal of Primatology**, v. 37, n. 2, p. 158–174, 2016.

GRIGG, M. E. et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633–639, 2001.

GROGAN, L. F. et al. Surveillance for Emerging Biodiversity Diseases of Wildlife. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

GRUMANN, M. R. et al. Immunohistochemical and serological aspects of *Toxoplasma gondii* infection in Neotropical primates. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 3, p. 1375–1382, 2017.

HAMILTON, C. M. et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2019.

HATAM-NAHAVANDI, K. et al. *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

HEYMANN, E. W. et al. Small Neotropical primates promote the natural regeneration of anthropogenically disturbed areas. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002.

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

HIRSCH, A. et al. Bdgeoprim – Database of Geo-Referenced Localities of Neotropical Primates. **Neotropical Primates**, v. 10, n. 2, p. 79–84, 2002.

HOSSEINI, S. A. et al. Human toxoplasmosis: A systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 2019.

HOWE, D. K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411–1414, 1997.

- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–1566, 1995.
- HUANG, M. et al. Isolation and identification of *Toxoplasma gondii* from black-crown squirrel monkey (*Saimiri vanzolinii*) of South China. **Chinese Veterinary Science**, v. 48, n. 3, p. 316–322, 2018.
- INGBERMAN, B.; STONE, A.; CHEIDA, C. Gênero *Saimiri* (Voigt 1831). In: REIS, N. R.; PERACHI, A. L.; ANDRADE, F. R. (Eds.). **Primatas brasileiros**. Londrina: Technical Books, p. 41–46. 2008.
- IZAWA, K. Foods and feeding behavior of wild black-capped capuchin (*Cebus apella*). **Primates**, v. 20, n. 1, p. 57–76, 1979.
- JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10–25, 2010.
- JUAN-SALLÉS, C. et al. Localized toxoplasmosis in a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) causing placentitis, stillbirths, and disseminated fetal infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1041–1045, 2011.
- KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980–2992, 2005.
- KHAN, A. et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 37, p. 14872–14877, 2007.
- KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011.
- KIERULFF, M. et al. Behavioral ecology of lion tamarins. In: KLEIMAN, D.; RYLANDS, A. (Eds.). **Lion tamarins: biology and conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 157–187. 2002.
- LEHMANN, T. et al. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

**America**, v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 2006.

LIBÓRIO, T. N. et al. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed , paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 405–410, 2005.

LIN, M. H. et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4121–4125, 2000.

LOUÇÃO TERRA, M. A. B. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 185–188, 2004.

LUCAS, S. R. R. et al. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 4, 1999.

MANWELL, R. D. et al. Mammalian and Avian Toxoplasma. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 76, n. 1, p. 1–14, 1945.

MARCIANO, M. A. M. et al. Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts by PCR real-time after treatment with propidium monoazide. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 62, p. e84, 2020.

MÄTZ-RENSING, K.; LOWENSTINE, L. J. New World and Old World Monkeys. In: TERIO, K. A.; MCALOOSE, D.; LEGER, J. ST. (Eds.). **Pathology of wildlife and zoo animals**. San Diego: Academic Press, p. 343–374. 2018.

MEIRA, A. R. Splendore: facets of life of the Toxoplasma discoverer. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 9–12, 2010.

MELO, R. P. B. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset (*Callithrix jacchus*) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco state, Northeastern of Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100447, 2020.

MENDES, S.; SILVA, M.; STRIER, K. **O Muriqui**. Vitória: Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 2010. 95 p.

MINERVINO, A. H. H. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive

non-human primates in the Amazon region, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 46, n. 6, p. 343–346, 2017.

MINOT, S. et al. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13458–13463, 2012.

MITTERMEIER R. A.; RYLANDS A. B.; WILSON D. E. Vol 3: Primates. In: **Handbook of the Mammals of the World**. Barcelona: Lynx Ediciones, 953 p. 2014.

MOLINA, C. V. et al. Negative serosurvey of *Toxoplasma gondii* antibodies in Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) from Niterói/RJ, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 115–118, 2016.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1945–76, 2004.

NAKAYIMA, J. et al. Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014.

NERY-GUIMARÃES, F.; FRANKEN, A. J.; CHAGAS, W. A. Toxoplasmose em Primatas Não-Humanos. I - Infecções Naturais em “*Macaca mulatta*” e “*Cebus apella*”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 69, n. 2, p. 77–87, 1971.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. **Académie des sciences**, p. 147:763., 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du Gondi. **Comptes rendus de l'académie des science**, v. 148, p. 1878, 1909.

NIEHAUS, C. et al. Environmental factors associated With *Toxoplasma gondii* Exposure in Neotropical Primates of Costa Rica. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 1–12, 2020.

NISHIMURA, M. et al. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**, v. 68, n. 1, p. 79–86, 2019.

NORCONK, M. et al. Mechanical and nutritional properties of food as factors in

platyrrhine dietary adaptations. In: GARBER, P. et al. (Eds.). **Developments in primatology: progress and prospect**. New York: Springer, p. 279–319. 2009.

NUNURA, J. et al. Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111–112, 2010.

Ó.M. CHAVES et al. Wildlife is imperiled in peri-urban landscapes: threats to arboreal mammals. **bioRxiv**, v. 1, p. 44, 2021.

OBOMA, Y. I.; NGOKERE, A. A. Effect of formalin fixation on DNA purity and quantity, nucleic acid, and amplicon size in cervical human papilloma virus detection. **African Journal of Cellular Pathology Full**, v. 10, n. 4, p. 47–53, 2018.

OH, H. et al. An outbreak of toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in South Korea. **Journal of Medical Primatology**, v. 47, n. 4, p. 238–246, 2018.

OIE. **Improving wildlife surveillance for its protection while protecting us from the diseases it transmits**, 2008. Disponível em: <https://www.oie.int/en/improving-wildlife-surveillance-for-its-protection-while-protecting-us-from-the-diseases-it-transmits/>. Acesso em: 10 nov 2021.

OIE. **Toxoplasmosis**. Terrestrial Manual, 2017. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.09.09\\_TOXO.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_TOXO.pdf). Acesso em: 27 out 2021.

OLIVEIRA, C. B. S. et al. Pathogenicity and phenotypic sulfadiazine resistance of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from livestock in Northeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 6, p. 391–398, 2016.

OLIVEIRA, C. A. DE. **Estudo de fatores de risco para a infecção por *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) em primatas não-humanos neotropicais *Saimiri* spp. (LINNAEUS, 1758) no ICTB Fiocruz, RJ, Brasil**. 2020. 80 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2020.

PAN, M. et al. Sixty Years (1957-2017) of research on toxoplasmosis in China-An overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–16, 2017.

PARDINI, L. et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a

colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 587–590, 2015.

PEDERSEN, A. B.; DAVIES, T. J. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. **EcoHealth**, v. 6, n. 4, p. 496–508, 2009.

PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, 2008.

PENA, H. F. J. et al. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 377–381, 2011.

PERELMAN, P. et al. A molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 3, p. 1–17, 2011.

PEREZ, S. I. et al. Divergence Times and the Evolutionary Radiation of New World Monkeys (Platyrrhini, Primates): An Analysis of Fossil and Molecular Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

PINTO, N. et al. Primate Densities in the Atlantic Forest of Southeast Brazil: The Role of Habitat Quality and Anthropogenic Disturbance. In: GARBER, P. A. et al. (Eds.). **South American Primates, Developments in primatology: progress and prospects**. New York: Springer, p. 413–431. 2009.

PIRES, J. S. et al. Infection by *Toxoplasma gondii* in neotropical non-human primates. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1041–1044, 2012.

RABINOWITZ, P. M. et al. Toward proof of concept of a one health approach to disease prediction and control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, 2013.

REIS, N. R. dos et al. Sobre os mamíferos do Brasil. In: REIS, N. R. PERACHI A.L., PEDRO WA, L. I. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Editora Universidade Estadual de Londrina, p. 17–25. 2006.

RICKLI, R.; REIS, N. Gênero Cacajao Lesson 1840. In: REIS N.R., PERACHI A.L., PEDRO WA, L. I. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Editora Universidade Estadual de Londrina, p. 123–125. 2006.

RIZZO, L. V. **Comunicação pessoal**. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2000.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

ROCHA, B. M. **Taxonomia de nematóides parasitos de primatas neotropicais, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) (Primata: Callitrichidae), *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812) (Primata: Atelidae) e *Sapajus apella* (Linnaeus, 1758) Grooves, 2005 (Primata: Cebidae), do estado de Minas Gerais**. 2014. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora. 2014.

RONDÓN, S. et al. Seasonality, richness and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primates (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 3, p. 202–208, 2017.

ROSENTHAL, B. M. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 67–70, 2009.

RYLANDS, A. B. MITTERMEIER, R. A. The genetic diversity of the New World Primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy. In: GARBER, P. A. et al. (Eds.). **South American Primates, Developments in primatology: progress and prospects**. New York: Springer, p. 23–54. 2009.

S.VAZ, R. et al. Congenital Toxoplasmosis: A Neglected Disease? – Current Brazilian public health policy. **Field Actions Science Reports. The journal of field actions**, Special Issue 3. 2011.

SAARI, M.; RAISANEN, S. The survival of trophozoites in human tears , saliva , and urine and in cow ' s milk. **Acta Ophthalmologica**, v. 52, n. 1970, p. 847–852, 1974.

SANTANA, C. H. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a lethal toxoplasmosis outbreak affecting captive howler monkeys (*Alouatta* sp.). **Journal of Medical Primatology**, v. 50, n. 2, p. 99–107, 2020.

SANTORO, M. et al. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of wild boars (*Sus scrofa*) from southern Italy reveals high prevalence and parasite load. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2019.

SANTOS, A. L. M. dos et al. Estudo descritivo: histopatologia e imuno-histoquímica para a detecção de patógenos em amostras de fauna selvagem recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 18, n. 205, p. 1–12, 2021a.

SANTOS, M. C. et al. Quantitative study of wild animals received at the Wild Animals Triage Centers (CETAS) in Bahia and identification of trafficking routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021b.

SANTOS, S. V. **Patologia comparada de *Brachyteles arachnoides* e *Brachyteles hypoxanthus* (E. Geoffroy, 1806, Atelidae - Primates)**. 2011. 325 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, S. V. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in two southern Woolly spider monkeys (*Brachyteles arachnoides* - Geoffroy, 1806) from the Rio de Janeiro primate center, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 43, n. 2, p. 125–129, 2014.

SANTOS, S. V. et al. Fatal toxoplasmosis in a southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical, and molecular characterization. **Journal of Medical Primatology**, v. 47, n. 2, p. 124–127, 2018.

SERGEANT, V. et al. Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6990–6997, 2005.

SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453–461, 2014.

SHWAB, E. K. et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 29, p. E6956–E6963, 2018.

SILVA, D. B. da. **Diagnóstico sorológico e molecular de *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos em parque zoológico**. 2016a. 111 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016a.

SILVA, I. B. da. **Perfil genotípico de isolados de *Toxoplasma gondii***

**provenientes de pacientes com toxoplasmose disseminada.** 2016b. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016b.

SILVA, J. L. et al. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II- variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, n.1, p. 4-9, 2017.

SILVA, L. A. et al. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 3–9, 2014.

SNOWDON, C.; SOINI, P. The tamarins, genus *Saguinus*. In: MITTERMEIER, R. A. et al. (Eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington: World Wildlife Fund, p. 223–298. 1988.

SOINI, P. The pygmy marmoset, genus *Cebuella*. In: MITTERMEIER, R. A. et al. (Eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington: World Wildlife Fund, p. 79–129. 1988.

SOUZA, W. De; BELFORT, J. Apresentação. In: SOUZA, W., and BELFORT J. R. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 10–13. 2014.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. **Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2010.

SU, C. et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5844–5849, 2012.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841–848, 2006.

SULLIVAN, W. J.; SMITH, A. T.; JOYCE, B. R. Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii* - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 155–161, 2009.

TALEBI, M. et al. *Brachyteles arachnoides* (amended version of 2019 assessment). **The IUCN Red List of Threatened Species 2021**: e. T2994A191693399. 2021.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000.

THEZÉ, J. Rapport sur les travaux de l'Institut d'Hygiene et de Bactériologie. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 9, p. 449–469, 1916.

UNEP. **Brazil - Main Details - Biodiversity facts**. Disponível em: <https://www.cbd.int/countries/profile/?country=br>. Acesso em: 21 nov. 2021.

VANWORMER, E. et al. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 217–231, 2013.

VICENTE, J.; VERCAUTEREN, K. C.; GORTÁZAR, C. **Diseases at the Wildlife - Livestock Interface: Research and Perspectives in a Changing World**. 1 ed. Cham: Springer; 2021

VERONA, C. E.; PISSINATTI, A. Primates – Primatas do Novo Mundo (Sagui, Macacoprego, Macacoarana, Bugio e Muriqui). In: SILVA, Z. S. C.; RAMOS, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: ROCA, p. 807-828. 2014.

VIDAL, M. D. **Protocolos para coleta de dados sobre primatas em unidades de conservação da Amazônia**. 1. ed. Brasília: ICMBio, 2012. 38 p.

VITALIANO, S. N. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil**. 2012. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

VITALIANO, S. N. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 276–283, 2014.

VITALIANO, S. N. et al. Epidemiological aspects of *Toxoplasma gondii* infection in riverside communities in the Southern Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade**

**Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 301–306, 2015.

WACHARAPLUESADEE, S. et al. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nature Communications**, v. 12, n. 972, p. 1–9, 2021.

WEBB, S. D. The Great American Biotic Interchange: Patterns and Processes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 93, n. 2, p. 245–257, 2006.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **Int J Parasitol.**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009.

WOLFSON, F. Mammalian toxoplasma in erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 5, p. 653–658, 1941.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842–1847, 2005.

XIN, S. et al. Isolation, genotyping and virulence determination of a *Toxoplasma gondii* strain from non-human primate from China. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–7, 2021.

ZADA, A. et al. Optimization of DNA isolation method from Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded tissues (FFPE) and comparative performance of four different Polymerase Chain Reaction (PCR) kits. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 13, p. 38-41, 2018.

ZANELLA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesq. agropec. bras.**, v. 51, n. 5, p. 510–519, 2016.

ZANON, C.; REIS, N.; FILHO, H. Gênero Ateles E. Geoffroy 1806. In: REIS, N. R.; PERACHI, A. L.; ANDRADE, F. R. (Eds.). **Primatas brasileiros**. Londrina: Technical Books, p. 169–173. 2008.

ZHANG, S. et al. Bat and pangolin coronavirus spike glycoprotein structures provide insights into SARS-CoV-2 evolution. **Nature Communications**, v. 12, n. 1607, p. 1–12, 2021.



ANEXO A – Dados epidemiológicos, descrições anatomopatológicas e resultados moleculares de cada um dos casos estudados.

Nº pesquisa: 01	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: Indaial/SC	Cq (qPCR): 38.86
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 14/05/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: necrose intersticial mínima multifocal aleatória, com destrabeculação hepatocitária moderada; leucocitose sinusoidal mista discreta; esteatose discreta, e mínima hemorragia de entremeio somada a raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: necrose intersticial moderada multifocal associada a esplenite aguda multifocal discreta; depleção linfóide moderada e marcante congestão esplênica, com formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* de entremeio.

Rim: necrose tubular aguda marcante difusa; nefrite intersticial crônica moderada multifocal e proteinose discreta.

Pulmão: pneumonia intersticial mista discreta multifocal; edema alveolar moderado, hemorragia alveolar discreta e moderada congestão. Presença de raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: histomorfologia preservada.

Encéfalo: mínimos focos hemorrágicos multifocais, além de raros nódulos gliais.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, DAB. Positividade em fígado.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 02	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: Indaial/SC	Cq (qPCR): 31.06
	Manutenção: N/I	Idade: Adulto	Data de óbito: 14/05/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: necrose intersticial moderada aleatória; hepatite lobular discreta mononuclear multifocal; fibrose portal discreta focal com discreta quantidade de pigmento acastanhado intrahepatocitário; destrabeculação hepatocelular, esteatose e hemorragia mínimas; além de raros hepatócitos apoptóticos. Soma-se a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: necrose intersticial moderada multifocal; depleção linfóide e congestão marcantes; presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista moderada multifocal; proteinose tubular moderada; necrose tubular aguda mínima; presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante discreta multifocal com infiltrado inflamatório misto associado; moderada congestão em capilares dos septos; em alvéolos, nota-se edema e macrófagos espumosos em moderada quantidade, além de mínima hemorragia; presença megacariócitos e de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: histomorfologia preservada.

Encéfalo: mínimos focos de hemorragia em neuroparênquima.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, DAB. Positividade em baço.

Fígado: não possui IHQ

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 03	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Fêmea	Município: Blumenal/SC	Cq (qPCR): Negativo
	Manutenção: N/I	Idade: Adulta	Data de óbito: 15/05/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: necrose intersticial discreta predominantemente mediozonal associada a hepatite lobular mista multifocal (tendendo a formar micro abscessos); balonização hepatocelular moderada; leucocitose sinusoidal mista mínima; mínima hemorragia. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante intersticial discreta multifocal; moderada hiperplasia linfóide e congestão; hematopoiese extramedular; presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial multifocal mista moderada; moderada congestão e mínimo edema intra-alveolar; presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: focos discretos de hemorragia em miocárdio.

Encéfalo: histomorfologia inalterada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, DAB. Positividade em baço.

Fígado: não possui IHQ

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 04	Gênero/Espécie: <i>Alouatta</i> spp.	Sexo: Macho	Município: Blumenal/SC	Cq (qPCR): 37.35
	Manutenção: N/I	Idade: Jovem	Data de óbito: 28/08/2015	PCR-RFLP: Não-amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

A análise de todos os fragmentos descritos foi comprometida por autólise discreta a moderada.

Fígado: necrose intersticial marcante multifocal aleatória; hepatite lobular mista discreta multifocal; moderada destrabeculação hepatocelular; mínima esteatose; presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Baço: necrose intersticial discreta multifocal associada a esplenite aguda mínima, depleção linfóide moderada, além de presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Rim: autólise marcante.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal; edema alveolar difuso moderado e congestão moderada. Soma-se a presença trombos e também de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista discreta multifocal, e presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: meningoencefalite supurativa perivascular multifocal mínima a discreta (formando manguitos de no máximo três camadas de células inflamatórias em neuroparênquima), associada a hemorragia e nódulos gliais mínimos e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e encéfalo, DAB. Positividade em encéfalo e fígado.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 05	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Macho	Município: Brasília/DF	Cq (qPCR): 29.51
	Manutenção: N/I	Idade: Adulto	Data de óbito: 08/10/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

A análise de todos os órgãos foi prejudicada por artefatos de congelamento.

Fígado: necrose intersticial moderada multifocal aleatória associada a hepatite mista mínima lobular; moderada destrabeculação hepatocitária e leucocitose sinusoidal; esteatose discreta. Destaque para área focal de fibrose portal moderada, com múltiplos plugs biliares e ovos de trematódeos. Formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* observados com facilidade, em grande quantidade.

Baço: esplenite aguda moderada multifocal com mínima necrose associada; discreta depleção linfóide; presença de hematopoiese extramedular. Observam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: histomorfologia preservada; porém, observam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal; edema alveolar marcante, congestão moderada e mínima hemorragia, além de área discreta de hiperplasia de BALT. Observam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração e encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo; DAB. Positividade em pulmão, fígado, encéfalo, baço, coração e rim.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 06	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Brasília/DF	Cq: 34.11
	Manutenção: N/I	Idade: Adulta	Data de óbito: 08/10/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

A análise de todos os órgãos foi prejudicada por artefatos de congelamento.

Fígado: necrose intersticial discreta multifocal aleatória associada a hepatite mista mínima lobular; moderada destrabeculação hepatocelular e leucocitose sinusoidal, além de focos discreta esteatose. Nota-se área focal portal com fibrose discreta e plug biliar intraductal. Presença de raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda multifocal discreta com moderada necrose e depleção linfóide associadas. Nota-se discreta congestão e mínima hematopoiese extramedular. Presença de raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite crônica intersticial moderada multifocal (com raros neutrófilos permeando); tireoidização e mineralização tubular; moderada proteinose.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal, associada a edema alveolar e hemorragia marcante, além de moderada congestão septal. Presença de macrófagos alveolares e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: subepicardite e miocardite discreta a moderada mista multifocal, associadas a discretos focos de necrose. Edema perivascular discreto multifocal.

Encéfalo: histomorfologia tecidual preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, pulmão, coração, encéfalo e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, baço e pulmão.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 07	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Brasília/DF	Cq (qPCR): 32.16
	Manutenção: N/I	Idade: Jovem	Data de óbito: 08/10/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite lobular necrotizante moderada multifocal aleatória, com infiltrado inflamatório misto discreto associado; mínima a discreta dilatação e leucocitose sinusoidal e destrabeculação hepatocelular; discreta balonização e presença de hepatócitos multinucleados. Moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal com mínimo infiltrado inflamatório polimorfonuclear associado. Nota-se hiperplasia linfoide e congestão moderadas, além de hematopoiese extramedular e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: histomorfologia tecidual preservada. No entanto, notam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista moderada multifocal, com moderada congestão septal, discreto edema e mínima hemorragia alveolar somada ao incremento de macrófagos alveolares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista multifocal mínima, somada a discreta congestão, e presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo; DAB. Positividade em fígado, baço, encéfalo, rim, pulmão e coração.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 08	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Brasília/DF	Cq (qPCR): 36.67
	Manutenção: N/I	Idade: Adulta	Data de óbito: 08/10/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, rim, pulmão, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. No entanto, foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em fígado e pulmão e esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, rim, coração, encéfalo e pulmão, DAB. Positividade em fígado, coração, pulmão e rim.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: não foram recebidos fragmentos representativos de baço

Nº pesquisa: 09	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Brasília/DF	Cq (qPCR): 37.25
	Manutenção: N/I	Idade: Jovem	Data de óbito: 08/10/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite lobular mista necrotizante marcante multifocal; com moderada leucocitose e discreta dilatação sinusoidal, discreta balonização e destrabeculação hepatocelular; raros hepatócitos apoptóticos. Chama atenção grande quantidade de hepatócitos multinucleados e a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal, com congestão discreta associada, além da presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: necrose tubular aguda discreta multifocal, discreta mineralização e proteinose tubular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista necrotizante moderada multifocal, com moderada congestão, discreta hemorragia e mínimo edema alveolar, além de incremento de macrófagos alveolares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração e encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, encéfalo, pulmão e coração; DAB. Positividade em fígado, baço, pulmão, encéfalo, rim e coração.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 10	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Olimpia/SP	Cq (qPCR): 33.44
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 13/11/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, pulmão e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. Foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em baço; esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, rim, pulmão, coração e encéfalo; DAB. Positividade em baço.

Fígado: não possui IHQ

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 11	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> <i>jacchus</i>	Sexo: N/I	Município: Olimpia/SP	Cq (qPCR): 30.45
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 13/11/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise e artefatos de congelamento. No entanto, foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em baço; esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, rim, coração, pulmão e encéfalo; DAB. Positividade em rim, coração, baço e pulmão.

Fígado: não possui IHQ

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 12	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> <i>jacchus</i>	Sexo: N/I	Município: Olimpia/SP	Cq (qPCR): 29.47
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 13/11/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise e artefatos de congelamento. No entanto, foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em fígado, além de esboço de áreas aleatórias de necrose.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; DAB. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 13	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> <i>jacchus</i>	Sexo: N/I	Município: Olimpia/SP	Cq (qPCR): 30.30
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 13/11/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

A análise de todos os fragmentos representativos recebidos foi prejudicada por artefatos de congelamento.

Fígado: hepatite mista necrotizante lobular aleatória moderada multifocal; hepatite portal mista moderada multifocal; discreta esteatose, dilatação sinusoidal e corpos apoptóticos; mínima leucocitose sinusoidal e destrabeculação hepatocelular.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal associada a infiltrado inflamatório misto discreto multifocal; depleção linfoide moderada; congestão discreta. Observa-se hematopoiese extramedular e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista discreta multifocal somada a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e mineralização intratubular. Autólise moderada.

Pulmão: pneumonia intersticial mista discreta com marcante edema alveolar e moderada congestão. Notam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Coração: subepicardite mínima mista focal.

Encéfalo: histomorfologia compatível com a normalidade.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, rim, coração, encéfalo e pulmão; DAB. Positividade em baço, pulmão, coração, rim e encéfalo.

Fígado: não possui IHQ

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 14	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> <i>jacchus</i>	Sexo: N/I	Município: Olimpia/SP	Cq (qPCR): 33.82
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 13/11/2015	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise e artefatos de congelamento. No entanto, foi possível observar a presença de trematódeos adultos e ovos em ductos biliares, no fragmento de fígado; formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* observados em baço, rim e pulmão; além do esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, rim, coração, encéfalo e pulmão; DAB. Positividade em baço, pulmão, coração, rim e encéfalo.

Fígado: não possui IHQ

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 15	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: Florianópolis/SC	Cq (qPCR): 38.16
	Manutenção: N/I	Idade: Adulto	Data de óbito: 30/06/2016	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista necrotizante discreta multifocal aleatória, com esteatose e pigmento acastanhado intrahepatocitário moderado, discreta leucocitose sinusoidal, destrabeculação e apoptose hepatocelular. As áreas portais frequentemente exibem fibrose e edema discretos. Somam-se microtrombos e presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal, com moderada depleção linfóide e congestão, além de presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal; proteinose, necrose e regeneração tubular moderadas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite crônica mínima multifocal.

Encéfalo e pulmão: autólise marcante.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; DAB. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 16	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: Blumenal/SC	Cq (qPCR): 34.14
	Manutenção: N/I	Idade: Adulto	Data de óbito: 14/08/2016	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma observação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante mista multifocal moderada a marcante; com moderada quantidade de pigmento acastanhado intrahepatocitário e discreta leucocitose sinusoidal; notam-se hepatócitos apoptóticos em discreta quantidade. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante multifocal aguda moderada, com moderada congestão e depleção linfóide discreta. Destaque para presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica marcante multifocal (com raras células inflamatórias polimorfonucleares de entremeio), associada a moderada fibrose intersticial, necrose tubular aguda marcante e moderada proteinose. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista moderada multifocal, com moderado edema alveolar, discreta hemorragia e congestão. Somam-se focos discretos de ossificação em interstício; fibrose e incremento de macrófagos alveolares (por vezes com pigmento castanho) e presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite e perivasculite crônica multifocal discreta.

Encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 17	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 32.96
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 01/11/2016	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto por morador da região urbana. Observado derrame torácico à necropsia.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante mista multifocal moderada, com moderada dilatação leucocitose sinusoidal; esteatose moderada; destrabeculação hepatocitária discreta.

Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta a moderada multifocal; mínima congestão. Notam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal com tireoidização e mineralização tubular; além de moderada proteinose tubular e necrose tubular aguda. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mínima mista multifocal, com discreto edema alveolar, mínima congestão septal e hemorragia alveolar, além de incremento de macrófagos alveolares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mínima mista multifocal.

Encéfalo: área focal discreta de hemorragia.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 18	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 28.65
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 04/11/2016	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em área arborizada dentro de escola. À necropsia, observada esplenomegalia. Sem sinais ou vestígios de traumas ou fraturas.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante mista multifocal lobular aleatória moderada a marcante, com moderada leucocitose e dilatação sinusoidal, mínima fibrose portal e destrabeculação hepatocitária, discreta esteatose e hemorragia. Chama atenção marcante multinucleação hepatocelular e presença de raros megacariócitos. Também há um quadro de hepatite portal mista moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante aguda multifocal moderada, além de discreta depleção linfóide e congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: necrose tubular aguda discreta, nefrite intersticial moderada mista multifocal com proteinose tubular moderada. Formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal; alvéolos com discreto edema e mínima hemorragia, discreta congestão septal; incremento de macrófagos alveolares, os quais por vezes apresentam pigmento castanho intracitoplasmático. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista moderada multifocal, com moderada necrose tecidual. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: mínima meningite não-suprativa.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, pulmão, rim, baço, encéfalo e coração; Fosfatase. Positividade em fígado, pulmão, rim, baço, encéfalo e coração.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 19	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: N/I	Município: Americana/SP	Cq (qPCR): 33.63
	Manutenção: Cativo - Parque Ecológico	Idade: N/I	Data de óbito: 17/11/2016	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal em bom estado nutricional, não apresentando sinais de traumatismo. Fígado e pulmão congestos. Esplenomegalia. Animal encontrado morto após três animais da mesma espécie também evoluírem à óbito (relata início da epizootia 10 dias antes do óbito deste animal).

Histopatologia:

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante moderada mista multifocal; edema alveolar marcante, moderada hemorragia e congestão; incremento de macrófagos alveolares; trombose vascular.

Coração: histomorfologia tecidual preservada; no entanto, foram observadas formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Fígado, baço e rim: autólise marcante, porém foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em fígado e baço.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado, baço e rim.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 20	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Fêmea	Município: Indaial/SC	Cq (qPCR): 35.29
	Manutenção: Cativo - Projeto Bugio	Idade: Filhote	Data de óbito: 08/12/2016	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Filhote chegou ao projeto no dia 09/11, com início de sintomas no dia 26/11.

Hemograma apontou linfopenia e anemia arregenerativa. Na necropsia foi observado ascite, hemorragia pulmonar, hepática e retal; hepato-esplenomegalia; petéquias em rim, intestino, coração e encéfalo.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante mista discreta a moderada multifocal aleatória; hemorragia, apoptose de hepatócitos, destrabeculação hepatocelular e balonização moderadas; esteatose, leucocitose e dilatação sinusoidal discretas; raros hepatócitos multinucleados. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal com mínimo infiltrado inflamatório agudo associado, moderada congestão e depleção linfoide. Grande quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: autólise marcante; porém, ainda assim foi possível a observação de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal, com mínima hemorragia alveolar e congestão septal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: histomorfologia tecidual preservada.

Encéfalo: área focal concêntrica de hemorragia discreta em neuroparênquima associada a gliose discreta.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 21	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> <i>clamitans</i>	Sexo: N/I	Município: São Sepé/SC	Cq (qPCR): 39.12
	Manutenção: Vida livre – Mata atlântica	Idade: Adulto	Data de óbito: 01/02/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado em mata silvestre, capturado, e atendido com temperatura elevada. Sem sinais de agressão. Evoluiu para óbito em duas horas.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista necrotizante multifocal aleatória marcante, com marcante destrabeculação e apoptose hepatocelular; trombose, hemorragia, leucocitose e dilatação sinusoidal moderadas; discreta multinucleação hepatocitária e pigmento castanho intrahepatocitário; mínima esteatose. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante marcante, com moderada depleção linfóide e congestão. Presença de trombose vascular e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista moderada multifocal; necrose tubular aguda moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: focos mínimos de hemorragia em neuroparênquima; raros nódulos gliais.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, rim e baço; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 22	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Ibirá/SP	Cq (qPCR): Negativo
	Manutenção: Vida livre - Zona rural	Idade: N/I	Data de óbito: 22/02/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Encontrado morto próximo a zona rural.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória, somada a hemorragia moderada e esteatose discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante multifocal discreta a moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, rim e baço; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 23	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Jundiaí/SP	Cq (qPCR): 26.23
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 29/03/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise e artefatos de congelamento. No entanto, foi possível observar formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* em baço e pulmão; além de esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado e baço e rim.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: baixa (<10/campo/10x/*hostspot*)

Nº pesquisa: 24	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Jundiaí/SP	Cq (qPCR): 28.31
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 29/03/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

A análise de todos os fragmentos foi prejudicada por moderado grau de autólise e artefatos de congelamento.

Fígado: hepatite mista necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória; discreta leucocitose sinusoidal e apoptose hepatocelular, além de mínima esteatose. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante moderada multifocal associada a moderada congestão e depleção linfóide. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: histomorfologia preservada.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta associada a edema marcante, trombose vascular discreta, moderada hemorragia alveolar, e grande quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: histomorfologia preservada.

Encéfalo: encefalite supurativa discreta multifocal associada a gliose e formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* intralesionais.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 25	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 37.03
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: Senil	Data de óbito: 20/03/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto embaixo de árvore. À necropsia: hemorragia pulmonar e ruptura de bexiga.

Histopatologia:

Fígado: hepatite lobular mista e necrotizante discreta multifocal aleatória; esteatose, multinucleação hepatocelular, dilatação e leucocitose sinusoidal mínimas; além de hemorragia multifocal e trombose vascular discretas. Há também colangite proliferativa moderada focal crônica com trematódeos adultos e ovos intralesionais, associada a moderada proliferação ductular.

Baço: esplenite aguda moderada multifocal e discreta quantidade de pigmento castanho. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal; moderada proteinose e necrose tubular aguda. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite aguda mínima multifocal associada a necrose discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: mínimos focos de hemorragia em neuroparênquima. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim, coração e encéfalo.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 26	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Palmeira D'Oeste/SP	Cq (qPCR): 31.65
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: N/I	Data de óbito: 06/04/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto por munícipe, nas proximidades da casa do morador.

#### Histopatologia:

Fígado: hepatite mista necrotizante moderada multifocal aleatória, associada a moderada leucocitose sinusoidal. Há discreta esteatose, dilatação sinusoidal, hemorragia e hepatócitos apoptóticos e multinucleados; além de mínima destrabeculação hepatocelular. Nota-se marcante ectasia ductular focal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante moderada a marcante multifocal, com discreta depleção linfóide e congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica mínima multifocal, moderada necrose e regeneração tubular, além de discreta proteinose.

Coração: miocardite mista discreta multifocal, com mínima hemorragia associada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: mínimos focos de hemorragia. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

#### Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 27	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: Altair/SP	Cq (qPCR): 33.21
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 17/04/2017	PCR-RFLP: Não-amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto na região central da cidade.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante lobular moderada multifocal aleatória, com moderada multinucleação hepatocitária, discreta trombose e hematopoiese extramedular, além de discreta hemorragia, dilatação e leucocitose sinusoidal.

Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta, com moderada depleção linfoide, além de mínima congestão e hematopoiese extramedular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal, com discreta congestão septal, hemorragia e edema mínimos. Incremento dos macrófagos alveolares.

Coração: observado um cisto tecidual sem lesão relacionada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e baço; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 28	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Pedranópolis/SP	Cq (qPCR): 26.60
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: N/I	Data de óbito: 04/05/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto por morador de sítio.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada lobular multifocal aleatória; leucocitose, hemorragia, destrabeculação e apoptose hepatocelular discretas; mínima dilatação sinusoidal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal; discreta depleção linfóide e mínima congestão. Grande quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Rim: autólise marcante. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Encéfalo: focos discretos de hemorragia e gliose. Autólise moderada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço, fígado, rim, encéfalo e coração; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim, coração e encéfalo.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 29	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: Blumenal/SC	Cq (qPCR): 32.76
	Manutenção: Vida livre – Mata atlântica	Idade: Adulto	Data de óbito: 14/05/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em região de mata atlântica - ombrófila densa.

Apresentava baço escurecido e aumentado. Mífase em cavidades oral e nasal.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória; esteatose, apoptose hepatocelular e leucocitose sinusoidal discretas; destrabeculação hepatocelular, hemorragia e dilatação sinusoidal mínimas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante marcante com discreto inflamatório agudo associado, além de congestão e depleção linfóide moderadas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: necrose tubular aguda marcante, com moderada nefrite intersticial crônica (raros polimorfos de entremeio) multifocal associada a fibrose intersticial discreta; também é observada tireoidização, regeneração e proteinose tubular; raros cilindros de hemoglobina. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mínima mista multifocal com marcante edema alveolar, moderada congestão, discreta hemorragia e raros microtrombos. Incremento de macrófagos alveolares, os quais por vezes apresentam pigmento castanho intracitoplasmático; acúmulo de pigmento acastanhado também perivascular, multifocal.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 30	Gênero/espécie: N/I	Sexo: N/I	Município: Foz do Iguaçu/PR	Cq (qPCR): 26.21
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 29/05/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante marcante multifocal aleatória, com moderada leucocitose sinusoidal e esteatose; discreta apoptose; mínima destrabeculação hepatocelular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante moderada a marcante associada a moderada depleção linfóide. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal. Autólise moderada.

Pulmão: pneumonia supurativa necrotizante moderada multifocal; discreto edema alveolar com macrófagos espumosos. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista mínima multifocal associada a necrose discreta.

Encéfalo: encefalite não-supurativa com raras formas parasitárias intralésionais compatíveis com *T. gondii* e gliose discreta multifocal.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; DAB. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 31	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> spp.	Sexo: Macho	Município: São Bento do Sul/SC	Cq (qPCR): 29.09
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: Adulto	Data de óbito: 27/05/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Pulmão congesto. Fígado escurecido. Animal oriundo de vida livre, porém, evoluiu para óbito em CETAS.

Histopatologia:

Fígado: hepatite necrotizante marcante multifocal aleatória com infiltrado inflamatório misto mínimo associado. Soma-se pigmento acastanhado marcante; hemorragia moderada; destrabeculação, multinucleação hepatocelular e leucocitose sinusoidal discretas; esteatose, dilatação sinusoidal e apoptose hepatocitária mínimas. Chama atenção a presença de hepatócitos reativos cariomegálicos com núcleos claros e focos de ectasia de ductos biliares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal, com moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal, com moderada fibrose, necrose tubular aguda, proteinose e regeneração tubular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: mínima congestão e discreta quantidade de pigmento acastanhado.

Coração: miocardite e epicardite mínima mista multifocal.

Encéfalo: nódulos gliais discretos associados a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 32	Gênero/espécie: <i>Alouatta guariba</i>	Sexo: Macho	Município: Jundiaí/SP	Cq (qPCR): 27.72
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: Adulto	Data de óbito: 02/06/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em sítio, por morador.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante, com destrabeculação hepatocelular, pigmento acastanhado intrahepatocitário, leucocitose e dilatação sinusoidal discretas; moderada hemorragia e intensa quantidade de hepatócitos apoptóticos. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante moderada multifocal associada a depleção linfóide; congestão marcante. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e microfilárias.

Rim: nefrite intersticial crônica multifocal com fibrose discreta de entremeio; necrose tubular aguda e proteinose tubular discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial necrotizante mista discreta multifocal com edema e hemorragia alveolar discretos; moderada congestão septal e focos de fibrose discreta a moderada perivascular. Incremento de macrófagos alveolares, os quais frequentemente estão associados a fagocitose de pigmentos acastanhados. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite e perivasculite mista mínima multifocal; congestão marcante.

Encéfalo: nódulos gliais associados a formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* intralésionais.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo; DAB. Positividade em fígado, baço, rim, pulmão e encéfalo.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 33	Gênero: <i>Callithrix</i> <i>jacchus</i>	Sexo: N/I	Município: Umbaúba/SE	Cq (qPCR): 27.36
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 19/06/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante marcante somada a esteatose marcante; moderada multinucleação e destrabeculação hepatocelular; discreta hemorragia, dilatação sinusoidal e apoptose hepatocitária. Soma-se quadro de colangite fibrosante mista discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Baço: esplenite aguda necrotizante mínima e hiperplasia linfoide moderada; além de mínima congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: congestão marcante.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante moderada multifocal com edema alveolar marcante; congestão e hemorragia moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista discreta multifocal, com discreta necrose e hemorragia. Moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: moderada hemorragia multifocal em neuroparênquima. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, coração e pulmão.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 34	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 25.53
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: N/I	Data de óbito: 23/06/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Sem lesão externa. Baço e coração aumentados de tamanho.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal aleatória; nota-se moderada multinucleação hepatocelular; discreta esteatose, apoptose hepatocitária, dilatação sinusoidal e hemorragia; mínima leucocitose sinusoidal, perda do arranjo cordonal e hematopoiese extramedular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda e necrotizante moderada a marcante multifocal; depleção linfoide e congestão marcante associadas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista moderada multifocal crônica com necrose tubular aguda e proteinose discreta. Mineralização tubular discreta multifocal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante marcante multifocal, com intensa congestão; moderada hemorragia; discreto edema e trombose vascular. Soma-se a presença de nematódeos adultos, espessamento de túnica média vascular e endotélio reativo. Observam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: mínimos focos de hemorragia em miocárdio.

Encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 35	Gênero/espécie: <i>Alouatta guariba</i>	Sexo: Fêmea	Município: Sapé/PB	Cq (qPCR): 38.11
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: Adulta	Data de óbito: 06/06/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Encontrado morto em zona rural, dentro de área silvestre pertencente a sítio.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória, com marcante quantidade de hepatócitos apoptóticos, moderada quantidade de pigmento acastanhado intrahepatocitário, sinusoides com discreta dilatação e mínima leucocitose, além de perda do arranjo cordonal e esteatose mínimas.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta a moderada, com moderada depleção linfoide, moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: moderada necrose e proteinose tubular aguda; hemoglobinúria multifocal discreta.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta, com mínimo edema e hemorragia alveolar e trombose discreta multifocal. Bactérias cocoides intralveolares multifocais raramente associadas a alveolite aguda e macrófagos espumosos.

Coração: congestão, mínima miocardite mista multifocal.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e baço; Fosfatase. Positividade em fígado e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: baixa (<10/campo/10x/*hostspot*)

Nº pesquisa: 36	Gênero/espécie: <i>Alouatta</i> <i>clamitans</i>	Sexo: N/I	Município: Igrejinha/RS	Cq (qPCR): 31.73
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: N/I	Data de óbito: 25/06/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Moradores do local perceberam que o animal estava agonizando e evoluiu a óbito.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal aleatória, com moderada leucocitose sinusoidal, discreta hemorragia e corpos apoptóticos, além de mínima destrabeculação e dilatação sinusoidal. Trombose vascular multifocal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante discreta com moderada depleção linfóide; discreta congestão e mínimo infiltrado inflamatório misto. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal com fibrose discreta, discreta proteinose e mínima necrose tubular aguda. Raros focos de tireoidização, tubulite e mioglobinúria. Glomeruloesclerose ocasional. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante moderada multifocal, com discreto edema alveolar e moderada congestão. Raros microtrombos e megacariócitos.

Coração: miocardite e epicardite mista discreta multifocal.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 37	Gênero: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: Cotia/SP	Cq (qPCR): 25.66
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 13/07/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto na rodovia Raposo Tavares.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. No entanto, em todos os fragmentos representativos foi possível observar a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e encéfalo; DAB. Positividade em fígado e encéfalo.

Fígado: alta (>30/campo40x/*hotspot*)

Baço: não foram recebidos fragmentos representativos de baço

Nº pesquisa: 38	Gênero: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: Cotia/SP	Cq (qPCR): 39.27
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 13/07/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto na rodovia Raposo Tavares.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. No entanto, em fragmentos representativos de fígado foi possível observar a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e encéfalo; DAB. Positividade em fígado e encéfalo.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: não foram recebidos fragmentos representativos de baço

Nº pesquisa: 39	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Fêmea	Município: Blumenal/SC	Cq (qPCR): 36.07
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 25/07/2017	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em zona de mata atlântica. Observadas lesões macroscópicas sugestivas de pneumonia.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta multifocal centrolobular a mediozonal; moderada esteatose; hemorragia, dilatação sinusoidal e apoptose discreta; leucocitose sinusoidal e destrabeculação hepatocelular mínima. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante mínima a discreta, com moderada congestão e discreta depleção linfóide. Presença de trombos em pequenos vasos; raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e microfilárias.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal, trombose glomerular multifocal com atrofia glomerular; necrose e proteinose tubular moderadas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante moderada multifocal com edema e hemorragia alveolar. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista mínima multifocal.

Encéfalo: gliose moderada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim, coração, pulmão e encéfalo.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 40	Gênero/espécie: N/I	Sexo: N/I	Município: Icaraíma/PR	Cq (qPCR): 32.23
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 25/07/2017	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Pulmão, fígado, rim e baço hemorrágicos. Espuma em traqueia.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta multifocal aleatória, com mínima esteatose, leucocitose e apoptose hepatocitária. Somam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante aguda discreta multifocal, com moderada depleção linfóide. Somam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica mínima multifocal e necrose tubular aguda moderada.

Coração: miocardite necrotizante e hemorrágica aguda multifocal com formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: encefalite mínima perivascular mononuclear com nódulos gliais em moderada a marcante quantidade somada raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço e encéfalo.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: baixa (<10/campo/10x/*hostspot*)

Nº pesquisa: 41	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Macedônia/SP	Cq (qPCR): 29.29
	Manutenção: Vida livre – Zona rural	Idade: N/I	Data de óbito: 05/03/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Encontrado morto em fazenda.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada multifocal aleatória; fibrose mínima portal e perissinusoidal; discreta esteatose e dilatação sinusoidal; destrabeculação hepatocitária, hemorragia e apoptose mínimas; leucocitose sinusoidal e multinucleação hepatocelular moderadas.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta multifocal; hiperplasia linfóide discreta e mínima congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica multifocal discreta, com necrose tubular aguda moderada e discreta proteinose tubular.

Coração: miocardite e endocardite mista discreta multifocal, hemorragia mínima.

Encéfalo: meningoencefalite supurativa discreta multifocal, com discretos focos de hemorragia.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, rim, coração e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim e encéfalo.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 42	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: São Paulo/SP	Cq (qPCR): 28.64
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 30/03/2018	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

*Causa mortis*: indeterminada por autólise.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante modera multifocal aleatória; discreta esteatose e hemorragia; leucocitose sinusoidal e apoptose mínimas. Presença de pigmento acastanhado intrahepatocitário. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante moderada a marcante multifocal, com marcante congestão e moderada depleção linfóide. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e microfilárias.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal; necrose tubular marcante e moderada proteinose tubular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta multifocal, congestão moderada e discreta hemorragia alveolar.

Coração: miocardite crônica discreta multifocal com mínima congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: encefalite supurativa discreta multifocal com discretos nódulos gliais. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e encéfalo; Fosfatase. Positividade em fígado, baço e encéfalo.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: baixa (<10/campo/10x/*hostspot*)

Nº pesquisa: 43	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: N/I	Município: Campinas/SP	Cq (qPCR): 33.32
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: N/I	Data de óbito: 09/05/2018	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

*Causa mortis*: traumatismo.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta multifocal aleatória; moderada dilatação sinusoidal; leucocitose sinusoidal, apoptose, multinucleação hepatocitária e esteatose discretas; mínima destrabeculação hepatocelular. Autólise moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta a moderada multifocal, com moderada depleção linfoide. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Autólise moderada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e baço; Fosfatase. Positividade em fígado e baço.

Fígado: alta (>30/campo40x/*hotspot*)

Baço: alta (>50/campo40x/*hotspot*)

Nº pesquisa: 44	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 37.94
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 19/07/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Apresentava lesão no antebraço esquerdo, esplenomegalia e icterícia.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada multifocal aleatória, com marcante multinucleação hepatocelular; moderada quantidade de hepatócitos apoptóticos; dilatação e leucocitose sinusoidal discretas; esteatose, perda de arranjo cordonal e hemorragia mínima. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite necrotizante discreta multifocal com mínimo infiltrado misto associado; hiperplasia linfóide e congestão moderadas. Focos de hematopoiese extramedular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica mínima multifocal, com mínima proteinose tubular.

Pulmão: pneumonia intersticial mista discreta com mínimo edema e hemorragia alveolar, além de discreta congestão. Incremento de macrófagos alveolares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite e epicardite mista discreta, multifocal, com focos de hemorragia discretos.

Encéfalo: discreta hemorragia em neurópilo, multifocal.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, coração, baço, pulmão, rim; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, rim e pulmão.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: baixa (<10/campo/10x/*hostspot*)

Nº pesquisa: 45	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 28.41
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 19/07/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Apresentava múltiplas fraturas e traumatismos.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória, acompanhada de multinucleação hepatocelular moderada; discreta apoptose hepatocitária; esteatose, hemorragia, destrabeculação hepatocelular, leucocitose e dilatação sinusoidal mínimas. Colangite fibrosante e neutrofílica, discreta a moderada, associada a proliferação ductular e a presença de trematódeos intraluminais. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda e necrotizante discreta multifocal; congestão e hiperplasia linfóide moderadas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista moderada multifocal, com moderada proteinose e discreta necrose tubular aguda. Glomerulonefrite membranosa discreta multifocal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante moderada multifocal; hemorragia alveolar e congestão marcantes, e mínimo edema alveolar.

Coração: histomorfologia preservada.

Encéfalo: focos discretos de hemorragia em neuroparênquima.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e rim; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 46	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Fêmea	Município: Guarulhos/SP	Cq (qPCR): 29.11
	Manutenção: Cativeiro – Zoológico de Guarulhos	Idade: Senil	Data de óbito: 17/07/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal apresentava letargia, apatia, anorexia e desidratação. Na necropsia, mucosa oral ictérica e fígado hemorrágico.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal aleatória, com esteatose marcante; leucocitose sinusoidal e hemorragia moderadas; dilatação sinusoidal e apoptose discretas; mínima quantidade de pigmento castanho intrahepatocitário e hepatócitos multinucleados. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: não foram recebidos fragmentos representativos de baço

Nº pesquisa: 47	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Macho	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 35.18
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Senil	Data de óbito: 26/07/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Suspeita de envenenamento, após ser avistado com sialorreia dentro da casa de morador que notificou. Acúmulo de saliva em cavidade oral, congestão pulmonar, hepática e esplênica.

Histopatologia:

Fígado: cirrose hepática marcada por fibrose moderada em ponte porta-porta e discreta perissinusoidal, colangiohepatite mista e fibrosante moderada multifocal com marcante hiperplasia ductular, somada a hepatite necrotizante mista discreta multifocal aleatória. Soma-se destrabeculação hepatocelular e hemorragia discretas; mínima esteatose, dilatação e leucocitose sinusoidal além de raros hepatócitos apoptóticos. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta multifocal, com depleção linfóide moderada, e marcante depósito hialino perifolicular, somada a presença de raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: glomerulopatia esclerosante; nefrite intersticial crônica moderada, com tireoidização e proteinose tubular marcantes, além de mineralização tubular, regeneração e necrose tubular aguda discreta somada a deposição de material hialino glomerular e peritubular em porção medular.

Coração: miocardite mista mínima multifocal, com micro trombos.

Encéfalo: meningoencefalite supurativa mínima multifocal, somada a gliose discreta e hemorragia em neuroparênquima.

A coloração histoquímica de vermelho-congo, avaliada sob luz polarizada, revelou acúmulos discretos a moderados verde-refringente em baço (margeando os centros foliculares) e rim (em glomérulo e interstício), compatíveis com amiloide. O quadro cirrótico hepático foi destacado pelas colorações de tricrômico de masson e reticulina.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: baixa (<10/campo40x/*hotspot*)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 48	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: Jandira/SP	Cq (qPCR): 26.09
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 14/08/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória; multinucleação hepatocelular, hemorragia e dilatação sinusoidal moderadas; leucocitose discreta; destrabeculação hepatocelular e esteatose mínimas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista mínima multifocal com discreta proteinose tubular.

Pulmão: edema e hemorragia alveolar moderados somada a congestão moderada.

Coração e encéfalo: histomorfologia compatível com a normalidade.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não foram recebidos fragmentos representativos de baço

Nº pesquisa: 49	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 34.03
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Jovem	Data de óbito: 27/09/2018	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Hemorragia pulmonar e abdominal.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante marcante multifocal aleatória; destrabeculação hepatocelular, leucocitose sinusoidal e hemorragia moderadas; esteatose discreta; apoptose, pigmento castanho intrahepatocitário e dilatação sinusoidal mínimas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda discreta com moderada depleção linfóide e mínimos focos de necrose. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal, com necrose tubular aguda e proteinose tubular discretas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta a moderada multifocal, com congestão, hemorragia e edema alveolar discretos, além de incremento de macrófagos alveolares. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista multifocal moderada com necrose moderada e hemorragia discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Encéfalo: focos discretos de hemorragia e associada a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, pulmão, rim, baço, coração e encéfalo; DAB. Positividade em fígado, baço, rim, pulmão e encéfalo.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 50	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Barueri/SP	Cq (qPCR): 24.96
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 31/10/2018	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Encontrado morto por morador.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada multifocal aleatória com discreta quantidade de hepatócitos apoptóticos. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda discreta multifocal; discreta hiperplasia linfoide.

Pulmão: pneumonia mista e necrotizante moderada multifocal, com edema intralveolar moderado, macrófagos alveolares e congestão associados. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista discreta multifocal.

Rim e encéfalo: histomorfologia preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e baço; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: Alta (>30/campo40x/*hotspot*)

Baço: Alta (>50/campo40x/*hotspot*)

Nº pesquisa: 51	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Macho	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 32.42
	Manutenção: Vida livre - Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 04/12/2018	PCR-RFLP: Não-amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em uma praça arborizada situada na região urbana da cidade. Notificação realizada por munícipe. Apresentava bom escore corporal, sem indícios de traumas. À necropsia: intensa hemorragia abdominal; pulmões hemorrágicos e necróticos; hepatomegalia e necrose hepática; esplenomegalia e congestão esplênica.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal; com dilatação e leucocitose sinusoidal moderada a marcante, além de marcante esteatose. Discreta quantidade de hepatócitos multinucleados. Hemorragia, apoptose e perda de arranjo cordonal mínimas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda necrotizante discreta a moderada multifocal, com depleção linfóide, além de moderada congestão. Formas parasitárias de *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta multifocal, com edema e hemorragia intralveolar discretos multifocais, além de moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: pancardite mista moderada multifocal com focos de necrose discretos.

Encéfalo: sem alterações microscópicas.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço, coração, pulmão, encéfalo e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, baço, coração, pulmão e encéfalo.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 52	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Fêmea	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 37.98
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 10/01/2019	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Sem sinais de fraturas ósseas, estágio moderado de autólise.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, pulmão, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. No entanto, em fragmentos representativos de fígado, baço e pulmão foi possível observar a presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*; além de esboço de áreas aleatórias de necrose em fígado. Em pulmão, também notou-se hemorragia marcante.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, encéfalo, pulmão, coração, rim e baço; Fosfatase. Positividade em fígado e baço.

Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 53	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: São José do Rio Preto/SP	Cq (qPCR): 33.41
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: N/I	Data de óbito: 01/02/2019	PCR-RFLP: #97

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Presença de icterícia no tecido adiposo abdominal. Aumento dos rins.

Histopatologia:

A análise de todos os fragmentos foi comprometida por moderado grau de autólise.

Fígado: hepatite necro-hemorrágica moderada a marcante multifocal aleatória associada a infiltrado inflamatório misto discreto além da presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*. Soma-se dilatação sinusoidal, destrabeculação hepatocelular e esteatose discretas, além de raros hepatócitos apoptóticos.

Baço: esplenite aguda necrotizante moderada multifocal com marcante congestão; além de depleção linfóide.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal.

Pulmão: congestão e hemorragia moderados. Discreto edema alveolar. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: sem alterações microscópicas.

Encéfalo: focos discretos de hemorragia.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 54	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: N/I	Município: Americana/SP	Cq (qPCR): 36.65
	Manutenção: Cativeiro - Parque Ecológico Municipal	Idade: N/I	Data de óbito: 21/03/2019	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal interno do Parque Ecológico, causa da morte não identificada (sem suspeitas clínicas).

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante multifocal discreta a moderada; esteatose, hemorragia, leucocitose e dilatação sinusoidal discretas. Mínima multinucleação e destrabeculação hepatocelular. Somam-se hepatócitos apoptóticos em discreta quantidade. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda e necrotizante moderada a marcante, com marcante depleção linfóide e moderada congestão. Grande quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial mista discreta multifocal; necrose tubular aguda e proteinose discreta associadas.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta multifocal; congestão discreta; edema alveolar discreto; mínima hemorragia. Grande quantidade de macrófagos espumosos em alvéolos.

Coração: histomorfologia tecidual preservada.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; Fosfatase. Positividade em fígado.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 55	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Macho	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 32.86
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 03/05/2019	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em zona urbana, em bom estado nutricional e sem sinais de trauma. À necropsia: pulmão hemorrágico.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante mínima a discreta multifocal aleatória, com moderada dilatação sinusoidal multifocal, discreta esteatose e proliferação ductular; mínima perda do arranjo cordonal, leucocitose sinusoidal e hemorragia. Raros hepatócitos apoptóticos. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda e necrotizante moderada a marcante multifocal; mínima depleção linfóide e congestão. Focos de hematopoiese extramedular. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal.

Pulmão: mínima pneumonia intersticial mista necrotizante multifocal; congestão discreta; mínima hemorragia e edema alveolar.

Coração: miocardite mista discreta multifocal, com necrose discreta associada.

Encéfalo: sem alterações microscópicas dignas de nota.

Imuno-histoquímica:

Realizada em baço e rim; DAB. Positividade em baço e rim.

Fígado: não possui IHQ

Baço: alta (>50/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 56	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Macho	Município: São Paulo/SP	Cq (qPCR): 38.33
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 10/05/2019	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Lesões macroscópicas de pneumonia e cardiopatia. Animal oriundo de vida livre, porém, atendido no Cemacas.

Histopatologia:

Fígado: hepatite aguda e necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória; moderada esteatose; hemorragia e dilatação sinusoidal discretas; apoptose, trombose, leucocitose sinusoidal e destrabeculação hepatocelular mínimas. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: necrose esplênica marcante com mínima esplenite aguda. Congestão e depleção linfóide marcantes. Grande quantidade de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal, com discreta fibrose associada. Necrose tubular marcante, com discreta proteinose. Glomerulopatia membranosa discreta. Ocasionalis focos de tubulite aguda discreta.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante marcante multifocal, com congestão, edema e hemorragia moderados. Somam-se macrófagos espumosos em grande quantidade, os quais por vezes estão repletos de pigmento castanho. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* e ocasionais trombos vasculares.

Coração: miocardite e epicardite mista mínima multifocal.

Encéfalo: encefalite supurativa mínima com discretos nódulos glias.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado e baço; DAB. Positividade em fígado e baço.

Fígado: baixa (<10/campo40x/hotspot)

Baço: baixa (<10/campo/10x/hostspot)

Nº pesquisa: 57	Gênero/espécie: <i>Alouatta clamitans</i>	Sexo: Fêmea	Município: São Paulo/SP	Cq (qPCR): 29.30
	Manutenção: Cativeiro – Cemacas	Idade: Adulta	Data de óbito: 15/05/2019	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal mantido no Cemacas desde 2015. Apresentou prostração e dispneia 05 (cinco) dias antes do óbito.

Histopatologia:

Análise de todos os fragmentos representativos recebidos (fígado, baço, rim, coração e encéfalo) foi marcadamente prejudicada por autólise. No entanto, em fragmentos representativos de fígado foi possível observar hepatite lobular, esboço de áreas de necrose, esteatose e presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado; DAB. Positividade em fígado.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: não possui IHQ

Nº pesquisa: 58	Gênero/espécie: <i>Callithrix penicillata</i>	Sexo: Fêmea	Município: Ribeirão Preto/SP	Cq (qPCR): 30.14
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulta	Data de óbito: 06/11/2019	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Animal encontrado morto em área urbana, sobre a calçada, em frente a uma escola – local pouco arborizado. Fêmea lactante, em bom estado nutricional. Pulmão congesto; fígado aumentado, congesto, necrótico; baço aumentado e friável.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal aleatória. Leucocitose sinusoidal e trombose moderadas; discreta esteatose, acúmulo de pigmento acastanhado intrahepatocitário, dilatação e destrabeculação hepatocitária; mínima hemorragia, apoptose e multinucleação hepatocelular. Também há um quadro de colangite fibrosante, com proliferação e ectasia ductal (hamartoma biliar?), sendo observados plugs biliares intraductais. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda e necrotizante moderada multifocal; depleção linfóide moderada. Congestão discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica discreta multifocal associada a fibrose mínima; necrose tubular aguda marcante; proteinose marcante; focos discretos de mineralização tubular.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante moderada multifocal, com moderado edema e congestão, além de hemorragia marcante. Incremento de macrófagos alveolares. Presença de raras formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: sem alterações microscópicas dignas de nota.

Encéfalo: área focal discreta de hemorragia perivascular (*ring hemorrhage*); encefalite não-supurativa mínima perilesional.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, rim e baço; DAB. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: alta ( $>30/\text{campo}40x/\text{hotspot}$ )

Baço: baixa ( $<10/\text{campo}/10x/\text{hostspot}$ )

Nº pesquisa: 59	Gênero/espécie: <i>Brachyteles arachnoides</i>	Sexo: Fêmea	Município: Eldorado/SP	Cq (qPCR): 31.46
	Manutenção: Vida livre – área de mata atlântica	Idade: Filhote	Data de óbito: 11/02/2020	PCR-RFLP: Novo genótipo

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Encontrado morto em área preservada de mata atlântica.

Histopatologia:

A análise de todos os órgãos foi prejudicada por moderado grau de autólise.

Fígado: hepatite mista necrotizante discreta a moderada multifocal aleatória, com esteatose, depósito multifocal de pigmento castanho intrahepatocitário, hemorragia, leucocitose e dilatação sinusoidal mínimas; além de discreta apoptose e destrabeculação hepatocelular. Infiltrado reacional portal misto discreto multifocal.

Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: depleção linfóide multifocal marcante associada a necrose discreta. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica mínima multifocal, focos moderados de necrose tubular aguda e proteinose tubular; focos discretos de mineralização.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta multifocal, com edema moderado e mínima hemorragia alveolar; além de moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: sem alterações microscópicas.

Encéfalo: encefalite supurativa discreta multifocal, com focos discretos de hemorragia, além de presença de nódulos gliais em discreta quantidade. Notam-se formas parasitárias compatíveis com *T. gondii* intralesionais.

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 60	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: N/I	Município: Mongaguá/SP	Cq (qPCR): 29.54
	Manutenção: N/I	Idade: N/I	Data de óbito: 05/06/2020	PCR-RFLP: Não-amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necrotizante moderada a marcante multifocal aleatória. Moderada quantidade de pigmento castanho intrahepatocitário. Destrabeculação hepatocelular, hemorragia, dilatação e leucocitose sinusoidal discretas. Mínima apoptose hepatocelular. Colangite mista discreta com fibrose em ponte porta-porta e mínima proliferação ductular associada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: hiperplasia linfóide discreta multifocal com folículos linfóides com lesão necrotizante central moderada; esplenite aguda moderada. Moderada congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: nefrite intersticial crônica moderada multifocal (com raros neutrófilos intralésionais) associada a focos de fibrose moderada intersticial; necrose tubular aguda marcante com acentuada proteinose tubular. Nota-se tireoidização e mineralização tubular. Há túbulos com grande quantidade de hemácias intraluminal. Glomerulopatia membranosa discreta.

Pulmão: pneumonia intersticial mista e necrotizante discreta multifocal, com marcante depósito de edema intralveolar, grande quantidade de macrófagos alveolares; discreta hemorragia alveolar; e mínima congestão. Focos de mineralização.

Coração: miocardite mista mínima multifocal mononuclear discreta.

Encéfalo: encefalite não-supurativa mínima focal

Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado, rim e baço.

Fígado: alta (>30/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

Nº pesquisa: 61	Gênero/espécie: <i>Callithrix</i> spp.	Sexo: Macho	Município: Valinhos/SP	Cq (qPCR): 34.54
	Manutenção: Vida livre – Zona urbana	Idade: Adulto	Data de óbito: 16/06/2020	PCR-RFLP: Não- amplificado

Observações clínicas e/ou macroscópicas contidas na ficha SINAN:

Nenhuma informação.

Histopatologia:

Fígado: hepatite mista e necro-hemorrágica moderada multifocal aleatória. Destrabeculação hepatocelular, leucocitose e dilatação sinusoidal discretas. Esteatose, apoptose e multinucleação hepatocelular mínimas. Fibrose portal discreta com proliferação ductular associada, havendo também focos de mineralização intraductal associada a presença de células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Baço: esplenite aguda discreta com focos mínimos de necrose; hiperplasia linfóide moderada. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Rim: proteinose tubular discreta multifocal; focos discretos de necrose e regeneração tubular.

Pulmão: pneumonia necrotizante intersticial mista mínima, com edema e hemorragia discretos, além de moderada quantidade de macrófagos alveolares e congestão. Presença de formas parasitárias compatíveis com *T. gondii*.

Coração: miocardite mista mínima focal.

Encéfalo: focos de hemorragia discretos em neuroparênquima.

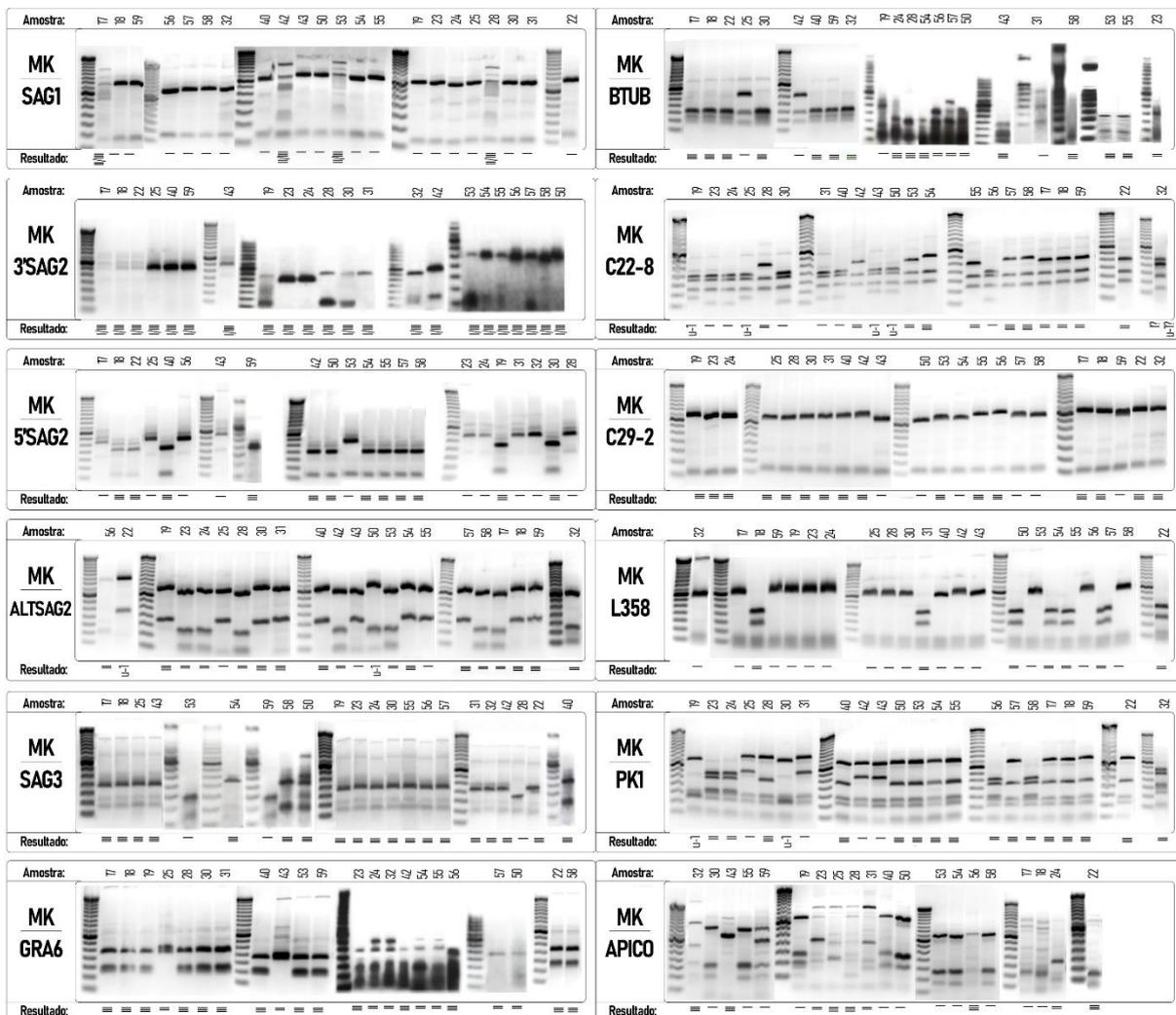
Imuno-histoquímica:

Realizada em fígado, baço e rim; Fosfatase. Positividade em fígado e baço.

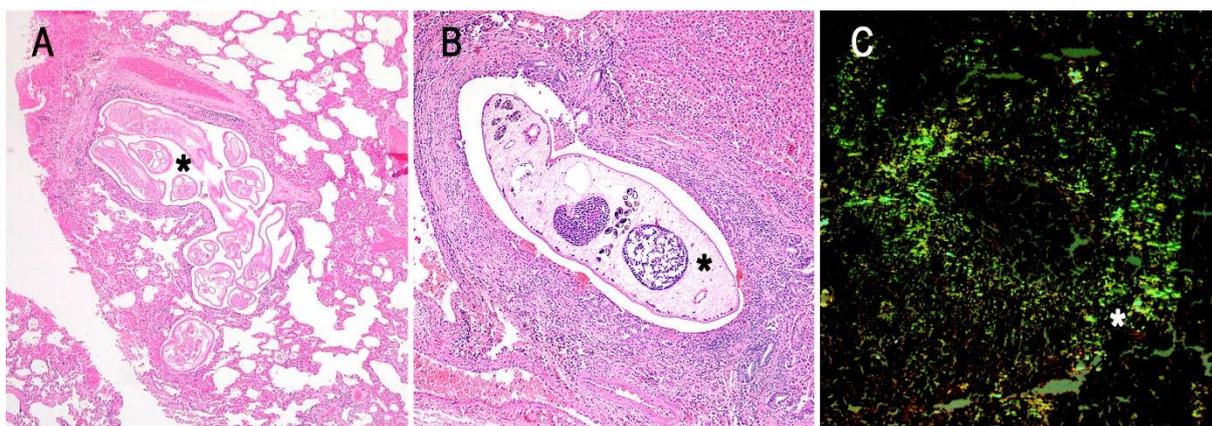
Fígado: moderada (>15/campo40x/hotspot)

Baço: moderada (>20/campo40x/hotspot)

ANEXO B – Imagens dos géis de eletroforese da genotipagem por PCR-RFLP referente às amostras completamente genotipadas.



## ANEXO C – Outros achados histopatológicos.



Legenda: A – Pulmão. Nematódeo, asterisco (HE, 10x). B – Fígado. Trematódeo, asterisco (HE, 20x). C – Baço. Amiloidose esplênica, destacada por coloração verde refringente, asterisco (Vermelho Congo, sob luz polarizada, 10x).

ANEXO D – ANOVA de fator único referente à associação entre o grau de imunomarcção hepática para *T. gondii* e os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real.

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
IHQ baixa	18	623,74	34,65222	17,35565
IHQ moderada	15	495,61	33,04067	13,13144
IHQ alta	20	593,49	29,6745	10,74526

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	245,6702	2	122,8351	8,991715	0,000462	3,18261
Dentro dos grupos	683,0461	50	13,66092			
Total	928,7163	52				

ANEXO E – ANOVA de fator único referente à associação entre o sucesso da genotipagem os valores de Cq obtidos na PCR em tempo real.

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Amostras não-genotipadas	38	1257,04	33,08	15,87722
Amostras genotipadas	21	647,73	30,84429	14,32696

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	67,60573	1	67,60573	4,409088	0,040186	4,009868
Dentro dos grupos	873,9963	57	15,33327			
Total	941,602	58				