

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

***Sarcocystis bertrami* EM TECIDOS DE EQUINOS DA BAHIA:
FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO, ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E
BIOENSAIO EM CÃES**

CAROLINE DANTAS PRIMO MARQUES

Salvador – BA

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

***Sarcocystis bertrami* EM TECIDOS DE EQUINOS DA BAHIA:
FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO, ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E
BIOENSAIO EM CÃES**

**CAROLINE DANTAS PRIMO MARQUES
MÉDICA VETERINÁRIA**

Salvador – BA
2022

CAROLINE DANTAS PRIMO MARQUES

***Sarcocystis bertrami* EM TECIDOS DE EQUINOS DA BAHIA:
FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO, ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E
BIOENSAIO EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim

Salvador – BA
2022

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Marques, Caroline Dantas Primo.

Sarcocystis bertrami em tecidos de equinos da Bahia: frequência de infecção, análise ultraestrutural e bioensaio em cães / Caroline Dantas Primo Marques. - 2022.
90 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Medicina veterinária. 2. Parasitologia veterinária. 3. Relação hospedeiro-parasito. 4. Coccídio. 5. Cavalos - Doenças. I. Gondim, Luís Fernando Pita. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.1089
CDU - 636.1

Sarcocystis bertrami em tecidos de equinos da Bahia: frequência de infecção, análise ultraestrutural e bioensaio em cães

Caroline Dantas Primo Marques

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 28 de fevereiro de 2022

Comissão examinadora:

**Dr. Luís Fernando Pita
Gondim Presidente
(UFBA)**

Documento assinado digitalmente:
 LUIS FERNANDO PITA GONDIM
Data: 23/02/2024 16:20:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
(UFPR)**

Documento assinado digitalmente:
 ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH
Data: 30/11/2023 15:20:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Leucio Câmara Alves
(UFRPE)**

Documento assinado digitalmente:
 LEUCIO CAMARA ALVES
Data: 23/02/2024 11:47:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Alexandre Dias Munhoz
(UESC)**

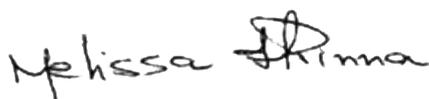
Documento assinado digitalmente:
 ALEXANDRE DIAS MUNHOZ
Data: 13/12/2023 09:01:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Fernanda Silveira Flôres Vogel
(UFSM)**

Documento assinado digitalmente:
 FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Data: 02/02/2024 11:57:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Luís Fernando Pita Gondim
Orientador
EMEVZ / UFBA**

Documento assinado digitalmente:
 LUIS FERNANDO PITA GONDIM
Data: 23/02/2024 16:20:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



**Melissa Hanzen Pinna Valentim
Vice-Coordenadora PPGCAT
EMEVZ / UFBA**

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pela proteção divina e por me permitir ter paciência e perseverança para realizar os meus objetivos.

Aos meus pais, Edite Marques e Pedro Marques e ao meu irmão Igor Marques por todo o infinito amor, carinho, apoio e compreensão concedidos a mim. Tenho imensa gratidão aos esforços dedicados para que eu alcançasse os meus sonhos.

A meu companheiro Franciesco Pinto por todo apoio, carinho, amor e dedicação.

À minha família, pelo apoio e carinho, em especial a minha madrinha Juty.

Ao meu orientador pela oportunidade, paciência, ensinamentos e apoio.

Aos meus queridos amigos por todo apoio e carinho.

Aos queridos companheiros de Laboratório Aline, Taynar, Waléria, Rogério, Leandro, Bruno e Yuri pelos momentos de alegrias, apoio e, sobretudo pelos conhecimentos compartilhados;

À toda a equipe da coordenação da pós-graduação que me deu todo suporte ao longo desses anos.

À UFBA, ao HOSPMEV e a todos os funcionários que me auxiliaram ao longo do experimento.

À CAPES pela concessão bolsa para que eu tivesse condições de concluir os meus estudos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, e assim, para o meu crescimento profissional.

RESUMO

Equinos são hospedeiros intermediários de protozoários do gênero *Sarcocystis*, reconhecidamente das espécies *S. bertrami* (sinônimo: *S. fayeri*) e *S. neurona*. *S. bertrami* apresenta baixa patogenicidade para os equinos, associada, esporadicamente, à ocorrência de miosite; enquanto em humanos, tem sido relatada como possível responsável por quadros de toxinfecção após consumo de carne equina crua ou mal-passada, contendo cistos viáveis do parasito. *S. neurona*, por sua vez, é o principal agente da mieloencefalite protozoária equina (EPM), uma doença de curso neurológico que causa grande debilidade ao animal. O objetivo deste estudo foi caracterizar por métodos morfológico, ultraestrutural e molecular *Sarcocystis bertrami* em músculos de equinos obtidos no estado da Bahia. Bem como, a realização de bioensaio em cães para a avaliação morfológica e molecular das formas parasitárias de *S. bertrami* excretadas nas fezes caninas. Para a realização do estudo, foram colhidos de um frigorífico 245 fragmentos musculares (masseter, língua, esôfago, coração, diafragma e glúteo) de 51 equinos, os quais foram avaliados através de cinco diferentes técnicas como *squash*, maceração tecidual, digestão por pepsina ácida, histologia e microscopia eletrônica de transmissão - MET. A análise molecular dos tecidos foi direcionada para o marcador COX-1. Parte do tecido muscular positivo para a presença de cistos foi administrada para os cães do bioensaio na proporção de 40 gramas/animal ao longo de três dias consecutivos. A avaliação molecular dos esporocistos obtidos a partir da excreção foi direcionada para o gene do 18S rRNA e ITS-1. Foi verificada uma frequência de 100% de infecção por

S. bertrami nos equinos avaliados através da técnica de maceração tecidual. Na avaliação histológica visibilizou-se sarcocistos septados, dispersos de forma aleatória no interior das fibras musculares. Por meio da MET foi realizada uma avaliação ultraestrutural do cisto, o qual apresentava-se delimitado pela membrana ondulada do vacúolo parasitóforo, a camada granular com espessura variável dependendo da região de observação, e em algumas regiões, notavam-se projeções vilosas digitiformes inclinadas ou dobradas. Devido a essas características, o cisto foi classificado como tipo 11. A análise molecular das amostras de tecidos musculares individualizados observou-se até 99% de coverage/identidade com sequências de *S. bertrami* disponíveis no *Genbank*. Os cães dois infectados experimentalmente excretaram oocistos e/ou esporocistos por 13 e 47 dias, com períodos pré-patentes de 13 e 23 dias. Os esporocistos apresentavam dimensões semelhantes entre si, com tamanhos de 12,78 - 15,28 (14,19 ± 0,53) x 8,95 - 10,86 (10,06 ± 0,44) µm. A excreção de oocistos/esporocistos ao longo dos dias foi bastante variável e com uma quantidade média diária de 1,8 x 10³ esporocistos/µL. O sequenciamento obtido a partir do fragmento 18S apresentou 100% de coverage/identidade a sequências homólogas de *Sarcocystis bertrami* (*S. fayeri*) disponíveis no *GenBank*. A elevada frequência de infecção por *S. bertrami* em fragmentos musculares de equinos destinados ao consumo humano pode representar um risco à saúde pública, devido ao potencial enterotoxigênico deste parasito para humanos. Os cães atuam como importantes disseminadores do parasito no ambiente, fato comprovado no presente estudo, em que se verificou um padrão de excreção relativamente longo (47 dias), quando comparado a outras espécies de coccídios excretados por cães, como

Neospora caninum e *Hammondia heydorni*, cujas patências são aproximadamente uma a duas semanas.

Palavras-chave: Equídeos, Sarcocystidae, Saúde pública.

ABSTRACT

Horses are hosts of protozoa from the genus *Sarcocystis*, whose species are known as *S. bertrami* (synonymous: *S. fayeri*) and *S. neurona*. The first one has low pathogenicity for horses, being associated, sporadically, with the occurrence of myositis in this animal species; in humans, intoxication has been reported after consumption of raw or undercooked equine meat, containing viable cysts of the parasite. *S. neurona*, in turn, is the main agent of equine protozoal myeloencephalitis (EPM). The aim of the study was to characterize by morphological and molecular methods, *Sarcocystis* spp. with potential for the development of sarcocysts in equine muscles obtained in the state of Bahia, as well as the performance of a bioassay in dogs for morphological and molecular evaluation of the parasitic forms of *Sarcocystis* spp. excreted in canine stool. The study was carried out using muscle fragments collected from 51 horses, which were inspected macro- and microscopically through techniques such as squash, tissue maceration, acid pepsin digestion, histology and transmission electron microscopy - TEM for the presence of cysts or bradyzoites. Aliquots of these samples were processed for DNA extraction and molecular analysis. Part of the muscle tissue that had cysts was administered to the dogs in the bioassay, using the proportion of 40 grams/animal over three consecutive days. Infection by *Sarcocystis* spp. reached a frequency of 100% in the evaluated horses. In histological evaluation, several sarcocysts were noted, which were highly septate, randomly dispersed within the muscle fibers, with variable sizes and shapes according to the section of the cut. Through TEM, each cyst was delimited by the membrane of the parasitophorous vacuole, whose shape was wavy and covered by an electron-dense layer, a granular layer with variable thickness depending on the region of observation, and in some regions, projections were noted slanted or bent digitiform villous. Due to these characteristics, the cyst was classified as type 11. The dogs used in the bioassay received muscle fragments and excreted oocysts and/or sporocysts for 13 and 47 days, with pre-patent periods of 13 and 23 days. Inside the oocysts, two sporocysts, each containing four sporozoites, residual granules and absence of Stieda's body were observed. The sporocysts had similar dimensions to each other, with sizes of 12.78 - 15.28 (14.19 ± 0.53) × 8.95 - 10.86 (10.06 ± 0.44) µm. The excretion of oocysts/sporocysts over the days was quite variable, with an daily average amount of 1.8 × 10³ sporocysts/µL. The high frequency of infection by *Sarcocystis* spp. in muscle fragments of horses destined for human consumption may represent a risk to public health, due to the enterotoxigenic potential of this parasite for humans. Dogs act as large disseminators of the parasite in the environment, a proven fact in this present study, in which a relatively long excretion pattern (47 days) was observed when compared to other species of coccidia excreted by dogs, such as *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni*, whose patent periods are approximately one to two weeks.

Keywords: Equides, Sarcocystidae, Public health.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ciclo de vida genérico das espécies de *Sarcocystis*25
- Figura 2: Cisto de *Sarcocystis bertrami* obtido de macerado tecidual da língua. Notam-se as protrusões vilares digitiformes sinalizadas pela seta46
- Figura 3: Cisto de *Sarcocystis bertrami* com as septações evidentes livre no macerado do fragmento de língua equina47
- Figura 4: Bradizoítos de *Sarcocystis bertrami* livres no macerado de língua equina 47
- Figura 5: Fotomicrografia Corada em H.E. objetiva 10x da língua de equino evidenciando um cisto de *Sarcocystis bertrami*, os septos são visualizados como estruturas não coradas (claras).....49
- Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão das paredes do sarcocisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino. A membrana do vacúolo parasitóforo (mvp) é revestida por camada eletrodensa, protrusões vilares (pv) notando-se microtúbulos (mt) no seu interior e uma camada mais espessa da substância granular (sg).....50
- Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão das paredes do sarcocisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino. Na imagem observa-se as protusões vilosas (vp) inclinadas, a substância granular (sg) menos espessa e microtúbulos (mt) em corte diagonal na sg.....51
- Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do cisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino, observando-se bradizoítos (br) em diferentesseções, com grânulos de amilopectina mais claros, vários grânulos densos mais escuros (dg), núcleo (nu) e septos. (se) separando os grupos de bradizoítos. 52
- Figura 9:Microscopia eletrônica de transmissão do cisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino evidenciando o polo apical de um bradizoíto (br). Na imagem nota-se o conóide (co), numerosas micronemas (mn) e a membrana citoplasmática (mc) composta por duas camadas.....53
- Figura 10: Bradizoítos de *Sarcocystis bertrami* do músculo glúteo de um equino obtidos após a digestão com solução de pepsina ácida a 2,5%.....54

- Figura 11: Esporocisto de *Sarcocystis* sp. excretado por um cão 01 do bioensaio. É possível notar esporozoítos (seta) bem definidos e um grânulo residual (*) em seu interior.69
- Figura 12: Autofluorescência do oocisto eliminado pelo cão 01 com exposição a comprimento de onda de 359nm.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação de DNA extraído dos tecidos equinos colhidos no frigorífico para a PCR.	44
Tabela 2: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação de DNA extraído de esporocistos excretados pelos cães	67
Tabela 3: Morfometria dos esporocistos de <i>Sarcocystis</i> sp. excretados pelos cães em diferentes dias de eliminação (n=50).....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Padrão de excreção de oocistos e/ou esporocistos de <i>Sarcocystis bertrami</i> no animal 01 (Yorkshire).	71
Gráfico 2: Padrão de excreção de oocistos e/ou esporocistos de <i>Sarcocystis bertrami</i> no animal 02 (Pinscher) durante os dias.	72

LISTA DE SIGLAS

AA	Antibiótico associado a antimicótico
AcMo	Anticorpos monoclonais
AP	Reação apical
bp	Pares de bases de nucleotídeos
Blastn	Nucleotide BLAST
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COX-1	Gene da subunidade I do citocromo c oxidase
d	Densidade
dpi	Dias pós-infecção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
G	Escala Gauge
g	Gramma
<i>g</i>	Unidade de aceleração da gravidade
HD	Hospedeiro definitivo
HI	Hospedeiro intermediário
ITS-1	Espaçador interno 1
kDa	QuiloDaltons
M	Molaridade
mg	Miligramma
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µg	Microgramma
MPE	Mieloencefalite protozoária equina
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pmol	Picomol
PAS	Reação de Schiff ao ácido periódico
PBS	Tampão salino fosfatado

RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPP	Período pré-patente
PP	Período patente
SAG	Antígeno de superfície
SnSAG	Antígeno de superfície de <i>Sarcocystis neurona</i>
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 HIPÓTESES	20
4 REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1 GÊNERO <i>SARCOCYSTIS</i>	21
4.1.1 Histórico e classificação	21
4.1.2 Importância de <i>Sarcocystis</i> spp. na saúde pública e na produção animal	21
4.1.3 Ciclo biológico	23
4.2 <i>Sarcocystis</i> spp. EM EQUINOS	26
4.2.1 Morfologia das formas infectantes de <i>Sarcocystis</i> spp. em equinos	27
4.2.2 Sinais clínicos	29
4.2.3 Epidemiologia	30
4.2.4 Diagnóstico	32
5. CAPÍTULO 1: <i>Sarcocystis bertrami</i> em equinos: frequência de infecção e identificação de espécie por morfologia, ultraestrutura e testes moleculares	36
5.1 RESUMO	36
5.2 ABSTRACT	38
5.3 INTRODUÇÃO	40
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.4.1 Amostras	41
5.4.2 Avaliação macroscópica	41
5.4.3 Avaliação microscópica dos tecidos frescos e não corados	41
5.4.4 Análise histológica e por microscopia eletrônica de transmissão	42
5.4.5 Digestão dos tecidos por pepsina ácida	43
5.4.6 Análise molecular	43
5.4.7 Reação em cadeia de polimerase convencional	43
5.4.8 Purificação dos amplicons	45
5.4.9 Sequenciamento do material genético	45
5.5 RESULTADOS PRELIMINARES	45
5.5.1 Avaliação macroscópica	45

5.5.2 Avaliação microscópica	46
5.5.3 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.....	49
5.5.4 Observação de bradizoítos em tecidos digeridos por pesina.....	53
5.5.5 Avaliação molecular.....	54
5.6 DISCUSSÃO.....	55
5.7 CONCLUSÃO	58
5.8 REFERÊNCIAS.....	59
6. Capítulo 2: Excreção de <i>Sarcocystis bertrami</i> em cães: bioensaio e caracterização morfológica e molecular	61
6.1 RESUMO	61
6.2 ABSTRACT.....	62
6.3 INTRODUÇÃO	63
6.4 Materiais e métodos.....	63
6.4.1 Bioensaio com cães.....	63
6.4.2 Análise das amostras fecais	64
6.4.3 Concentração, purificação, contagem e mensuração dos esporocistos	65
6.4.4 Análise estatística.....	65
6.4.5 Extração do material genético.....	65
6.4.6 Reação em cadeia de polimerase convencional.....	66
6.4.7 Purificação dos amplicons	67
6.4.8 Sequenciamento do material genético.....	67
6.5 RESULTADOS PRELIMINARES	68
6.5.1 Bioensaio em cães.....	68
6.5.2 Análise molecular.....	72
6.6 DISCUSSÃO.....	73
6.7 CONCLUSÕES.....	75
6.8 REFERÊNCIAS.....	76
7. Considerações Finais.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9. ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equídeos da América Latina, com aproximadamente 5,8 milhões de cabeças, sendo considerado o terceiro maior rebanho mundial. O agronegócio equino movimenta cerca de 16 bilhões ao ano, com atividades que se estendem desde a pecuária comercial até os setores de lazer e esporte (MAPA, 2016). Apesar do consumo de carne equina ser insignificante, o país ocupa a sexta posição em volume de abate, destacando-se como o 14º exportador de carne equina (FAO, 2018). No Brasil não há um sistema de criação de equinos com foco para o aproveitamento de carne, dificultando a rastreabilidade, entrave importante para a ascensão do país no mercado de exportação (LIMA et al., 2006).

A comercialização de carne equina apresenta-se como um mercado promissor, uma vez que ainda é desconhecido por parte da população. No entanto, há evidências de que o consumo de carne de cavalo seja um hábito bastante antigo, relacionado com as atividades de caça na era paleolítica (10.000 a.C.) (EDWARDS, 1998; HINTZ, 1995). Ao longo da história, por questões religiosas, culturais e/ou sociais, a utilização desta carne na alimentação humana foi interrompida. Atualmente, a relação destes animais com os seres humanos tornou-se mais estreitada de forma que hoje eles são considerados como animais de estimação, fato este que reduziu ainda mais a possibilidade de inserção na alimentação dessa fonte alternativa de proteína animal, inclusive no Brasil (FERNÁNDEZ DE LABASTIDA, 2012).

Em alguns países da Europa e Ásia a carne de cavalo é bastante consumida, seja na forma in natura ou na forma de embutidos. No Japão tem sido utilizada como fonte alternativa para a produção de sushi (SOUZA e SEREIA, 2009). Frente a essa forma de consumo, há uma grande preocupação com relação aos riscos à saúde humana, uma vez que os equinos atuam como hospedeiros de diversos agentes biológicos que podem se manter viáveis quando a carne não passa por um processamento térmico adequado. Surto de triquinelose e quadros de intoxicação associados a presença de sarcocistos de *Sarcocystis bertrami* têm sido relatados onde a carne de cavalo é consumida de forma crua (HARADA et al., 2013; KAMATA et al., 2014; POZIO et al., 1988).

Sarcocystis spp. são parasitos coccídios que pertencem ao filo Apicomplexa e apresentam ciclo de vida heteroxeno obrigatório (FAYER et al., 2015). Os equinos são

os hospedeiros intermediários naturais conhecidos da espécie *Sarcocystis bertrami* (sinônimo *S. fayeri*), a qual tem como hospedeiros definitivos os cães (DUBEY et al., 2015). Com relação a infecção por *S. neurona*, os cavalos, neste caso, atuam como hospedeiros intermediários aberrantes. Duas espécies de gambás do gênero *Didelphis* foram identificadas como hospedeiros definitivos de *S. neurona* (DUBEY et al., 2001a).

A infecção por *S. bertrami* em equinos promove o desenvolvimento de sarcocistos na musculatura. Geralmente, a detecção de sarcocistos é considerada um achado incidental, devido ao baixo potencial patogênico dessa espécie (DUBEY et al., 2015). A prevalência de sarcocistos na musculatura de equinos, inclusive, em cortes musculares destinados ao consumo humano, representa uma preocupação à saúde humana. Apesar do homem não atuar como hospedeiro de *S. bertrami*, têm sido relatados quadros de toxinfecção alimentar em humanos que possivelmente estão associados ao consumo de carne equina crua (FURUKAWA et al., 2016; KAMATA et al., 2014).

No Brasil, não há até o momento nenhum estudo destinado a avaliar a frequência de sarcocistos promovidos por *S. bertrami* (sinônimo *S. fayeri*) na musculatura de equinos. Desse modo, a prevalência de infecção por *S. bertrami* no Brasil é ainda desconhecida. A investigação realizada no presente estudo é de grande importância para o meio científico, permitindo o conhecimento do grau de infecção presente nos equinos no Brasil, as características morfológicas, ultraestruturais e moleculares, além de partilhar informações a cerca da infecção nos cães envolvidos no bioensaio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Caracterizar espécies do gênero *Sarcocystis* capazes de formar cistos teciduais em músculos de equinos obtidos no estado da Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar por métodos morfológicos, moleculares, *Sarcocystis bertrami* obtidos a partir de músculos de equinos.
- Utilizar cães como modelo experimental de hospedeiros definitivos para *Sarcocystis bertrami* isolados de músculos de equinos.
- Determinar os períodos patência e pré-patência em cães que consumiram tecidos de equinos contendo cistos de *Sarcocystis bertrami*.

3 HIPÓTESES

- Equinos do estado da Bahia são infectados por *S. bertrami*.
- Cães excretam esporocistos do parasito após o consumo de tecidos equinos contendo sarcocistos.
- Isolados de *S. bertrami* possuem sequências dos marcadores genéticos COX-1 quase idênticas a isolados oriundos de outros continentes.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 GÊNERO *SARCOCYSTIS*

4.1.1 Histórico e classificação

A primeira descrição de protozoários do gênero *Sarcocystis* ocorreu em 1843 na Suíça. Miescher, ao analisar a musculatura esquelética de um camundongo, notou estruturas brancas em formato filiforme. Estas estruturas foram nomeadas como túbulos de Meischer (LINDSAY e WEISS, 2004). Entretanto, a discussão a respeito do enquadramento do gênero desse novo parasito ocorreu somente em 1882, o qual foi então nomeado como *Sarcocystis*, devido a característica morfológica dos cistos presentes na musculatura que se assemelham com vesículas (DUBEY et al., 2015a).

Sarcocystis spp. são parasitos coccídios pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasida, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae e subfamília Sarcocystinae (LEVINE, 1986). Os parasitos que compõe o filo Apicomplexa possuem como característica comum a presença de um complexo apical que se localiza no polo anterior do corpo do organismo, cuja importância relaciona-se ao processo de fixação e penetração nas células hospedeiras (CURRENT et al., 2019)

Na literatura são descritas cerca de 200 espécies do gênero *Sarcocystis* (VERMA et al., 2017), todavia, a completa elucidação do ciclo biológico só foi apresentada para cerca de 26 espécies (DUBEY et al., 2015a). *Sarcocystis* spp. são parasitos considerados heteroxenos obrigatórios, pois é necessária a participação de dois hospedeiros para a conclusão do seu ciclo biológico (FAYER et al., 2015).

4.1.2 Importância de *Sarcocystis* spp. na saúde pública e na produção animal

As espécies de *Sarcocystis* possuem ampla distribuição entre os seres humanos assim como nos animais, sendo descritas espécies que podem atuar ora como hospedeiro definitivo (HD) ora como hospedeiro intermediário (HI), distribuídas nos diferentes grupos de animais, como répteis, anfíbios, aves, peixes e mamíferos (DUBEY et al., 2015a). A sarcocistose apresenta relativa importância com relação a saúde pública, bem como na produção animal (FAYER et al., 2015).

Os seres humanos podem atuar tanto como hospedeiros definitivos como intermediários para algumas espécies do gênero *Sarcocystis*, no entanto, os estudos sobre as consequências dessa relação ainda são muito escassos. Sabidamente, duas espécies são conhecidas por infectar humanos, fazendo-os atuar como hospedeiros definitivos e causando a sarcocistose intestinal, a saber, *S. hominis*, através do consumo de carne bovina, e *S. suihominis*, pelo consumo carne suína.

Quando no papel de hospedeiro intermediário acidental ou aberrante, os seres humanos assumem o papel de predador de determinados animais, adentrando ao ciclo de forma errática para algumas espécies de *Sarcocystis*: dessa forma, desenvolve o quadro de sarcocistose muscular, sendo visualizados cistos em músculos liso, esquelético e cardíaco (FAYER et al., 2015). Não há evidência de que humanos se infectem com *S. bertrami* (sinônimo: *S. fayeri*), contudo, o consumo de carne equina com cistos do parasito tem sido associado a distúrbios gastrointestinais, e que pode representar um fator de risco à saúde humana (KAMATA et al., 2014).

No Japão, onde o consumo de carne crua de equinos é um hábito muito comum, têm relatado casos de toxiinfecções alimentar causados por *Sarcocystis* sp..Em um estudo realizado no país, verificou-se que a intoxicação por *S. bertrami* (sinônimo: *S. fayeri*) está relacionada à uma proteína de 15kDa que é considerada como enterotoxigênica (HARADA et al., 2013). Tal proteína foi associada a diarreia sanguinolenta e morte em coelhos alimentados experimentalmente com fragmentos musculares de equinos com cistos de *S. bertrami* (sinônimo: *S. fayeri*), confirmado por exames moleculares para o gene do 18S rRNA do parasito (KAMATA et al., 2014).

Geralmente os surtos de intoxicação associados a carne equina têm um tempo de latência especialmente curto. Observa-se que tanto os cistos quanto os bradizoítos, formas infectantes presentes no interior dos cistos, induzem respostas enterotóxicas. No entanto, o tratamento térmico reduz a enterotoxicidade da proteína de 15kDa, substância que possivelmente seja a responsável pela promoção dos sinais clínicos observados nos casos de toxiinfecções alimentar em humanos (KAMATA et al., 2014).

Quando se trata da sarcocistose nos animais de produção, como em bovinos e pequenos ruminantes, observa-se um impacto econômico relativo. *Sarcocystis cruzi*, *S. capracanis*, e *S. tenella* são espécies consideradas como patogênicas. O quadro clínico é verificado na fase aguda, quando ocorre a esquizogonia de segunda geração nos vasos sanguíneos (DUBEY e LINDSAY, 2006). A doença geralmente cursa com alterações inespecíficas como febre, anorexia, anemia, emagrecimento e áreas de

alopecia, particularmente, na garupa e cauda em bovinos, e dependendo da debilidade do animal, pode levar ao óbito. Em animais prenhes podem ocorrer partos prematuros, abortos ou natimortos (DUBEY e LINDSAY, 2006). Em animais de abate quando intensamente parasitados há uma elevação no descarte de carcaças devido a presença de cistos visualizados na inspeção macroscópica da musculatura (BORJI et al., 2010; TENTER, 1995).

Nos equinos, a infecção causada por *Sarcocystis neurona* tem sido relatada como uma doença que ocasiona um considerável déficit neurológico por causa do desenvolvimento da mieloencefalite protozoária equina (EPM). A EPM cursa com sinais clínicos variáveis de acordo com a localização do parasito no sistema nervoso do animal, bem como as alterações secundárias causadas pela resposta inflamatória (DUBEY et al., 2001c). A sobrevivência dos animais é condicionada a severidade do quadro clínico apresentando, de modo a trazer prejuízos tanto com relação a redução do plantel como também relacionados aos custos terapêuticos (SILVA et al., 2003).

4.1.3 Ciclo biológico

Sarcocystis spp. são parasitos intracelulares com ciclo de vida heteroxeno obrigatório, de modo que para o seu desfecho é necessário a participação de dois hospedeiros. A reprodução sexuada ocorre apenas nos hospedeiros considerados como definitivos, geralmente predadores, onívoros ou carnívoros. Nos HI o parasito se multiplica de forma assexuada, sendo representados principalmente por herbívoros e onívoros. Nos HI ocorre a formação de sarcocistos em tecidos musculares e/ou no sistema nervoso central (SNC) (FAYER, 2004; LINDSAY et al., 1995).

Os HD se infectam após a ingestão de músculos ou tecido nervoso infectado com sarcocistos. A ruptura dos cistos é iniciada pela digestão no estômago e no intestino, há a liberação dos bradizoítos, formas infectantes de multiplicação lenta presente no interior dos cistos. Os bradizoítos livres penetram em enterócitos, geralmente em células caliciformes, se diferenciam em microgamontes e macrogamontes, gametas sexuais masculino e feminino, respectivamente. Os macrogamontes são estruturas alongadas a arredondadas com um núcleo único, enquanto os microgamontes apresentam numerosos núcleos. No processo de maturação do gameta masculino, cada núcleo se desenvolve em um único microgameta. Nestes são observados um núcleo compacto e um par de centríolos que

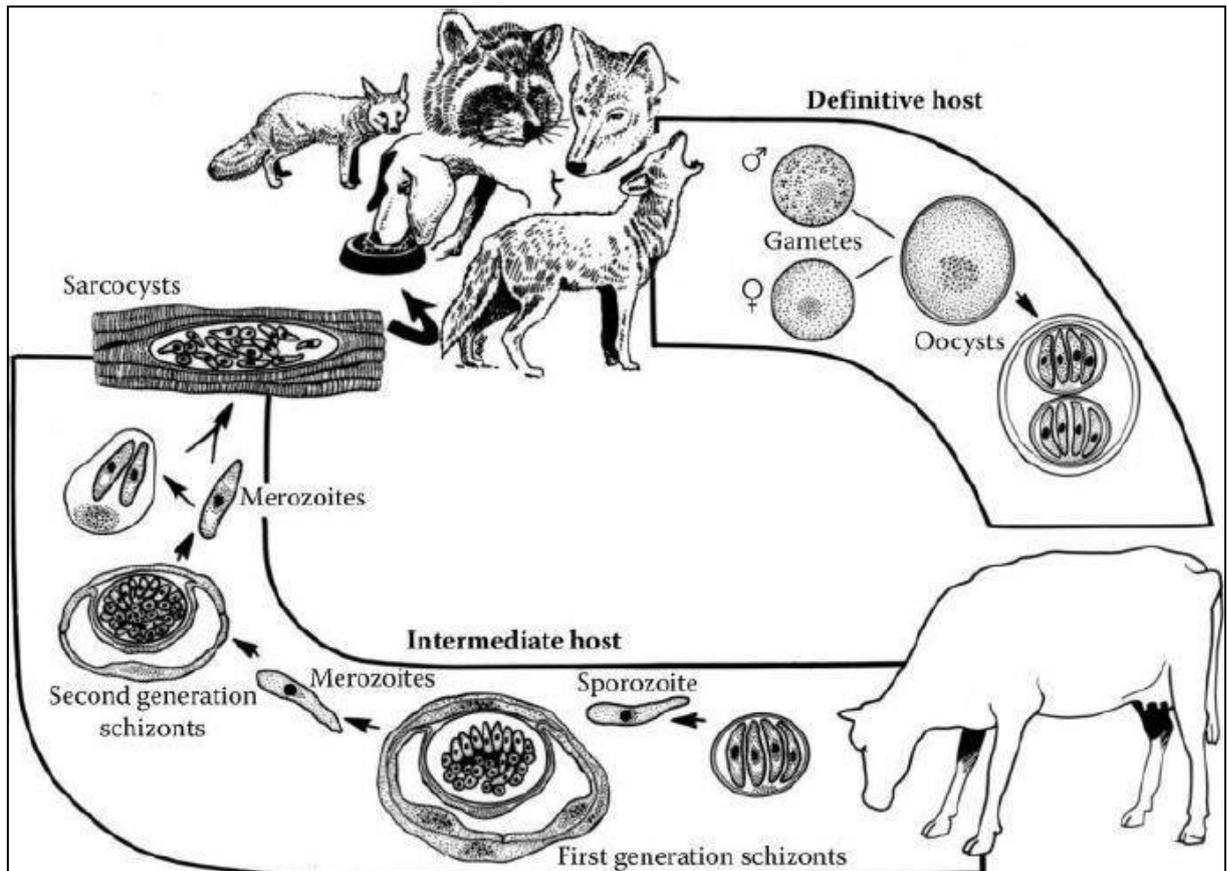
formam corpos basais dando origem a dois flagelos, os quais se projetam para fora do gamonte. A fecundação se inicia pela migração dos microgametas até a região periférica dos macrogametas, assim, ocorre a fusão das membranas e apenas o núcleo do gameta masculino passa para o gameta feminino, assim, gera o zigoto, que posteriormente será denominado como oocisto não esporulado (DUBEY et al., 2015a; LINDSAY et al., 2004).

O oocisto não esporulado apresenta um núcleo grande com um ou dois nucléolos evidentes e vários grânulos PAS-positivos. À medida em que o oocisto inicia o processo de esporulação, que ocorre na lâmina própria do intestino, o núcleo do oocisto se alonga e se dispõe paralelo ao eixo longitudinal. O núcleo se divide dando origem a dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. A esporulação ocorre de modo assíncrono, possibilitando a visualização de oocistos esporulados e não esporulados em um mesmo animal. Dada à fina parede que envolve os oocistos de *Sarcocystis* sp., frequentemente eles se rompem ainda no trato intestinal, de modo que nas fezes dos animais tanto oocistos em diferentes fases de desenvolvimento como também esporocistos livres são visualizados. O período pré-patente é variável de acordo com as espécies de *Sarcocystis*, o que normalmente ocorre em um período de 7 a 14 dias após a ingestão de bradizoítos pelos hospedeiros definitivos. Esses estágios do parasito excretados nas fezes contaminam o ambiente como o solo, os alimentos e a água (LINDSAY et al., 2004).

Os HI são infectados por meio da ingestão de água e/ou outros alimentos contaminados com esporocistos e/ou oocistos (Figura 1). A exposição à tripsina e a bile promove a separação das paredes dessas formas infectantes, liberando quatro esporozoítos móveis. No intestino delgado os esporozoítos adentram a mucosa intestinal, e por meio da circulação sanguínea e/ou linfática, infectam o endotélio dos vasos sanguíneos, caracteriza-se a primeira fase de um ciclo de pelo menos quatro fases de reprodução assexuada, denominados como merogonia ou esquizogonia. A esquizogonia resulta na formação dos esquizontes imaturos, que quando maduros, darão origem aos merozoítos. A divisão dos esquizontes é caracterizada por uma forma de multiplicação do tipo endopoligenia, na qual uma célula-mãe ao se dividir, dá origem a mais de dois merozoítos. A produção dos merozoítos é observada nas gerações seguintes, essas estruturas são móveis e possuem um formato de meia-lua, semelhante aos esporozoítos, que são liberados na corrente sanguínea e propagam-se para os tecidos de maior tropismo, como a musculatura esquelética, cardíaca e

lisa, bem como para o tecido nervoso central (DUBEY et al., 2015a; LINDSAY et al., 2004; SPEER e DUBEY, 2001).

Figura 1: Ciclo de vida genérico das espécies de *Sarcocystis*.



Fonte: (DUBEY et al., 1989)

Nos tecidos-alvos os merozoítos intracelulares são circundados por um vacúolo parasitóforo (VP), no citoplasma da célula hospedeira, onde se formará o sarcocisto. Por meio da multiplicação assexuada, que acontece na forma de endodiogenia, fissão binária, os merozoítos se diferenciarão em metrócitos, ao mesmo tempo em que o sarcocisto cresce e se desenvolve a parede, isolando-se do tecido hospedeiro. Nos sarcocistos jovens são visualizados apenas metrócitos, que são células arredondadas de rápida multiplicação. Após o processo de divisão celular no interior do sarcocistos, que culmina na formação de algumas gerações, há produção de zoítos em formatos alongados, que lembram a forma de bananas, denominados como bradizoítos (DUBEY et al., 2015a; DUBEY et al., 2001a; SPEER e DUBEY, 2001). Internamente nos cistos, os bradizoítos podem apresentar-se compartimentalizados por meio de septos, cuja origem parece ser a mesma da própria parede externa. Os sarcocistos

imaturos não são considerados infectantes para os HD, adquirindo esta capacidade após um período em torno de 75 dias pós-infecção, o que pode variar de acordo com as espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 2015a; DUBEY et al., 2001a).

4.2 *Sarcocystis* spp. EM EQUINOS

A primeira espécie de *Sarcocystis* relatada em equinos foi nomeada como *Sarcocystis bertrami* em 1901 (DOFLEIN, 1901). Posteriormente, foi descrita a espécie *S. equicanis*, a partir da detecção de sarcocistos que apresentavam paredes delgadas encontrados no esôfago de equinos provenientes da Alemanha; neste estudo foi possível a conclusão do ciclo de vida do parasito, ao se determinar os cães como HD, por meio da visualização da excreção de esporocistos nas fezes destes animais e um período pré-patente de cerca de oito dias após a ingestão do tecido equino infectado com sarcocistos (ROMMEL e GEISEL, 1975). No entanto, observou-se que devido à grande semelhança morfológica entre *S. equicanis* e *S. bertrami*, concluiu-se que se tratava do mesmo parasito. Dessa forma, *S. equicanis* tornou-se sinônimo de *S. bertrami* (DUBEY et al., 2015a).

Nos Estados Unidos, a primeira descrição de *Sarcocystis* em equinos ocorreu em Ohio, a partir de fragmentos musculares obtidos em frigorífico. Na descrição da nova espécie, nomeada como *S. fayeri*, foi relatado um tamanho de esporocisto menor que *S. bertrami*, período pré-patente mais longo, de 12-15 dias, e cistos de paredes mais densas, quando comparada com *S. bertrami* (DUBEY et al., 1977). Nos ciclos biológicos das duas espécies, os cães foram identificados como HD (LEVINE, 1986). Em um estudo recente, em que foram investigados os aspectos morfológicos e moleculares de *S. bertrami* e *S. fayeri*, observou-se que as duas espécies são indistinguíveis. Dessa forma, foi proposta a unificação das espécies como *S. bertrami* (sinônimo *S. fayeri*) (ZENG et al., 2018).

Sarcocystis neurona foi inicialmente isolado em 1991 a partir da medula espinhal de um cavalo naturalmente infectado, cuja nomenclatura da espécie foi proposta em razão da localização restrita dos esquizontes ao SNC. O tropismo desta espécie pelo SNC a difere das outras espécies de *Sarcocystis* já conhecidas, incluindo *S. bertrami*, em que os equinos atuam como HI. *S. neurona* possui grande relevância em equinos, pois é o principal agente etiológico da mieloencefalite protozoária equina

(EPM), uma doença que cursa com alterações neurológicas altamente debilitante para os cavalos (DUBEY et al., 1991).

Os gambás do gênero *Didelphis* são os únicos HD conhecidos de *S. neurona*, encontra-se restritos às Américas. O gambá norte-americano, *Didelphis virginiana*, foi o primeiro HD identificado (FENGER et al., 1995), seguido pela identificação no Brasil de esporocistos de *S. neurona* em *D. albiventris*, confirmou esta espécie como um segundo HD do parasito (DUBEY et al., 2001b).

Uma ampla variedade de HI e aberrantes já foi identificada albergando *S. neurona*. São considerados como HI aqueles hospedeiros onde os sarcocistos têm possibilidade de ser formados. Dentre os HI já conhecidos, tem-se o gato doméstico (*Felis catus*) (DUBEY et al., 2000), guaxinim (*Procyon lotor*) (DUBEY et al., 2001d), tatu (*Dasypus novemcinctus*) (CHEADLE et al., 2001a), lontra marinha (*Enhydra lutris*) (DUBEY et al., 2001e), o gambá listrado (*Mephitis mephitis*) (CHEADLE et al., 2001b) e a ave *Molothrus atler* (MANSFIELD et al., 2008). Dentre os hospedeiros considerados como aberrantes, destacam-se os equinos, nos quais ocorre o desenvolvimento do ciclo errático do parasito, com a observação apenas de estágios assexuados nesses animais (DUBEY et al., 2000). Embora haja a descrição de sarcocistos em um potro de 4 meses naturalmente infectado com *S. neurona* e com quadro clínico de EPM (MULLANEY et al., 2005), é ainda incerta a possibilidade dos cavalos contribuírem de forma direta como HI do parasito (REED et al., 2016).

4.2.1 Morfologia das formas infectantes de *Sarcocystis* spp. em equinos

Nos HI, as formas infectantes correspondem aos esquizontes e os sarcocistos. Os esquizontes dividem-se por endopoligenia, e por sua vez, dão origem aos merozoítos, que posteriormente formarão os sarcocistos (DUBEY et al., 2015a). A descrição morfológica da parede dos sarcocistos é bastante empregada para diferenciar as espécies de *Sarcocystis* nos animais. No entanto, seu uso ainda gera grande discussão no meio científico, uma vez que os cistos podem apresentar diferenças de acordo com o emprego das diferentes técnicas de processamento, no tipo de microscopia utilizado ou até mesmo devido a idade dos sarcocistos analisados (DUBEY et al., 2015a). Os oocistos e/ou esporocistos são as formas infectantes excretadas exclusivamente pelos HD (FAYER et al., 2015).

Os sarcocistos observados nos equinos foram classificados de duas formas diferentes, uma vez que *S. fayeri* e *S. bertrami* eram classificadas como espécies distintas. Por este motivo, nas informações prestadas a seguir, são utilizados os nomes originalmente propostos para cada uma dessas duas espécies. Os cistos de paredes espessas foram considerados como *S. fayeri*, representando o cisto do tipo 11a, e os de paredes finas, classificados como do tipo 11c, representavam exemplares de *S. bertrami* (sinônimo *S. equicanis*) (DUBEY et al., 2015a).

Os cistos de *S. bertrami* têm um comprimento de até 15 mm e espessura da parede variável. As protrusões vilares são dobradas na parede do cisto, o que confere uma aparência fina, sendo enquadrada no tipo 11c. Na avaliação por microscopia eletrônica de transmissão observam-se protrusões vilares de até 11 μm de comprimento e menos de 0,5 μm de largura. Os bradizoítos, presentes no interior dos cistos, possuem 8 – 10 μm de comprimento por 2,5 – 3,5 μm de largura (DUBEY et al., 2015a; HINAIDY e LOUPAL, 1982; ROMMEL e GEISEL, 1975).

Com relação a *S. fayeri*, os cistos apresentam em média 990 x 136 μm , com paredes estriadas radialmente com 1 – 3 μm de espessura, enquadradas na classificação 11a. No interior dos cistos estão compactados os metrócitos e bradizoítos; estas estruturas estão separadas em grupos divididos por septos. Os metrócitos estão geralmente dispostos na periferia dos cistos com citoplasma de aparência menos densa do que dos bradizoítos. Os bradizoítos de *S. fayeri* apresentam dimensões de 12 - 16 x 2,8 - 3,8 μm (DUBEY et al., 1977; TINLING et al., 1980). Os estudos de descrição das formas infectantes eliminadas pelos HD determinam que esporocistos de *S. bertrami* possuem dimensões de 15 - 16,3 x 8,8 - 11,3 μm . Em contrapartida, os esporocistos de *S. fayeri* são relativamente menores apresentando um tamanho em torno de 11–13 x 7–8,5 μm (DUBEY et al., 1977).

Os sarcocistos maduros de *S. neurona* se apresentam de forma microscópica com até 700 x 50 μm à microscopia óptica. A parede possui 1 - 2 μm de espessura com diminutas protrusões vilares, cujas dimensões são em torno de 2,8 x 0,4 μm . Dentro dos sarcocistos, os metrócitos e bradizoítos se dispõem de forma perpendicular. Os bradizoítos são delgados e estão compartimentalizados no interior dos cistos, possuindo tamanhos de 4,8 – 6,5 x 1,0 – 1,3 μm . No interior dos bradizoítos observam-se inúmeras micronemas, com rotrias geralmente em menor número, porém ambas dispostas mais frequentemente na porção anterior, próxima a extremidade do conoide. O núcleo localiza-se no terço posterior do parasito. Nota-se

a presença de grânulos densos dispostos na região anterior ao núcleo, enquanto os grânulos de amilopectina estão distribuídos por todo o bradizoíto. Diferentemente, os metrócitos possuem poucos ou nenhum grânulo de amilopectina e micronemas (DUBEY et al., 2001a).

Em equinos naturalmente infectados com *S. neurona*, os equizontes podem ser encontrados tanto em células do SNC assim como em células inflamatórias, os quais podem se apresentar com diferentes estágios de maturidade, o que configura um ciclo esquizogônico assíncrono. Essas formas infectantes maduras podem apresentar morfologia arredondada, alongada e irregular, com tamanho médio de 30 µm de comprimento. Os merozoítos apresentam tamanho de 7,7 × 3,1 µm ou quando delgados, 7,3 × 1,7 µm, e possuem as mesmas organelas descritas nos merozoítos de outras espécies de *Sarcocystis*, inclui a ausência de roptrias (SPEER e DUBEY, 2001).

Os esporocistos de *S. neurona* começam a ser excretados pelos gambás didelfídeos de 11 – 13 dias após o consumo de alimento com sarcocistos. Os esporocistos apresentam tamanhos em torno de 10,5–12,0 x 6,5–8,0 µm (DUBEY et al., 2000). A morfologia se apresenta delgada e têm 2–4 roptrias, mas nenhum corpo cristalóide (LINDSAY et al., 2004).

4.2.2 Sinais clínicos

As espécies *S. bertrami* e *S. fayeri* em equinos não costumam promover quadros clínicos significativos. Esporadicamente, a infecção por estes parasitos relaciona-se com o aparecimento de anemia, febre, perda de peso, disfagia, rigidez, dor muscular leve a grave, entretanto, essa sintomatologia pode variar conforme a cepa ou até mesmo a suscetibilidade do animal (DUBEY et al., 2015a).

A presença de sarcocistos nos músculos dos equinos tem sido considerado um achado incidental, de forma que não é observada lesões na musculatura. No entanto, de forma muito esporádica, relatam-se quadros de miosite eosinofílica e/ou granulomatosa em equinos associados a *Sarcocystis* spp. (HERD et al., 2015; TRAUB-DARGATZ et al., 1994). A doença neuromuscular é um raro achado nos casos de sarcocistose em equinos. Em um estudo clínico em equinos, observou-se que em animais que apresentavam sarcocistos em músculos esqueléticos, a doença neuromuscular é significativamente mais prevalente quando comparado com cavalos

saudáveis (ALEMAN et al., 2016); estes autores também notaram que a quantidade de cistos observadas era maior naqueles que apresentavam tal desordem, variando de dois a 21 cistos por músculo examinado, enquanto que nos cavalos saudáveis, observou-se um único sarcocisto por músculo.

Em contrapartida às espécies *S. bertrami* e *S. fayeri*, a infecção por *S. neurona* pode promover o desenvolvimento da doença conhecida como mieloencefalite protozoária equina (EPM) (MAYHEW et al., 1976). A EPM é uma das doenças neurológicas de grande importância e gravidade relatada nos equinos (DUBEY et al., 2001c). A patogênese relacionada ao envolvimento do SNC pelo *S. neurona* não está esclarecida, mas acredita-se que ocorre infecção de células endoteliais e leucócitos o que facilita a disseminação e infecção do tecido nervoso (LEWIS et al., 2014; LINDSAY et al., 2006; SPEER et al., 2000).

Os sinais clínicos observados na EPM variam de agudo a crônico, com início insidioso de curso focal ou multifocal, que se estende por regiões do encéfalo, tronco cerebral e medula espinhal ou associação dessas. Inicialmente, os animais podem apresentar disfagia, convulsões, funções respiratórias alteradas, quando gravemente afetados é observado uma dificuldade de locomoção ou até mesmo de se manter em estação, a doença pode progredir rapidamente (DUBEY et al., 2001c).

A variabilidade dos sinais clínicos dos equinos está diretamente relacionada a localização da infecção. As lesões, quando localizadas no encéfalo, estão associadas a alterações de comportamento, depressão, convulsões e diminuição da acuidade visual. O tronco encefálico também pode ser parasitado, gerando sinais clínicos compatíveis com lesões de nervos cranianos como disfagia, assimetria e atrofia facial de músculos masseter e temporal, paralisia facial, protrusão, flacidez e paralisia da língua. Entretanto, quando o acometimento ocorre na medula espinhal, são observadas alterações na locomoção, acometendo um ou mais membros, o que resulta em ataxia, incoordenação, atrofia e fraqueza muscular assimétrica (HOWE et al., 2014; REED et al., 2016).

4.2.3 Epidemiologia

Nos equinos a prevalência de *Sarcocystis* spp. é bastante variável. Infecções causadas por *S. neurona* estão confinadas às Américas, uma vez que o HD do

parasito está restrito ao continente americano. Diferentemente, a infecção por *Sarcocystis bertrami* (sinônimo *S. fayeri*) é descrita em outras partes do mundo como Europa e Ásia (DUBEY et al., 2015a; KAMATA et al., 2014; MA et al., 2020; MATUSCHKA, 1983).

A observação de sarcocistos na musculatura de equinos tem sido muito frequente, uma vez que esses animais se comportam como HI em relação a *S. fayeri* e *S. bertrami*. Apesar dessas espécies serem descritas como pouco patogênicas, têm sido associadas ao desenvolvimento de alterações como miosite e desordens neuromusculares (ALEMAN et al., 2016; HERD et al., 2015; TRAUB-DARGATZ et al., 1994).

A prevalência do parasito na musculatura de equinos é bastante variável, apresenta relatos entre 4 a 93%. Acredita-se que alguns fatores estão diretamente relacionados com a prevalência de sarcocistos, como a exposição ambiental aos HD, possibilita uma maior disseminação de formas infectantes do parasito, outro fator é a idade dos animais, nas quais verifica-se uma carga parasitária elevada nos equinos com idade superior a oito anos, e sobretudo, o tipo muscular empregado em cada estudo. Sabe-se que em músculos como língua, diafragma e semimembranoso são observados maiores números de cistos teciduais (GUNN e FRAHER, 1992; SAVILLE et al., 2004).

Um levantamento realizado a partir de fragmentos musculares de cavalos saudáveis destinados para o consumo humano, obtidos de frigoríficos na Mongólia, demonstrou que 93% dos animais estavam infectados por *Sarcocystis* sp.. O músculo da língua apresentava a taxa mais alta (97,5%) de infecção. A distribuição de sarcocistos nos músculos foi positivamente correlacionada com a idade dos cavalos, acometendo, em maior número, animais mais velhos (FUKUYO et al., 2002).

SAVILLE et al. (2004) infectaram pôneis e equinos com esporocistos de *S. fayeri* e observaram que os animais apresentaram quadro de miosite, cursando com marcha rígida, e elevado número de cistos na musculatura esquelética dos animais. Valentine et al. (2008) realizaram uma avaliação de um compilado de amostras musculares nas quais observou-se uma prevalência de 8% (18/229) de cistos do parasito, relatada pelos autores como a terceira alteração histológica mais presente neste tipo de tecido.

As investigações de sarcocistos na musculatura de equinos no Brasil é bastante restrita, descrito apenas um estudo, no qual utilizou amostras de 197 miocárdios de

cavalos abatidos em frigorífico. Nesse estudo não foram observados cistos e nem alterações histopatológicas nos fragmentos analisados (PORTELLA et al., 2017).

O ciclo biológico de *S. neurona* ainda apresenta muitas lacunas. Os levantamentos sorológicos realizados demonstram uma alta exposição dos equinos a *S. neurona* nas Américas, principalmente nos Estados Unidos, Brasil e Argentina, justificado pela presença do HD, exclusivamente nessa região (DUBEY et al., 1999a; DUBEY et al., 2001e; FAYER et al., 1990). Nos Estados Unidos a soroprevalência tem variado entre 15% a 89% (BENTZ et al., 2003; BENTZ et al., 1997; SAVILLE et al., 1997; TILLOTSON et al., 1999).

4.2.4 Diagnóstico

Estudos epidemiológicos apontam que a exposição de equinos às espécies de *Sarcocystis* é bastante elevada, com percentual de mais de 50%, mas não necessariamente correlacionada com a apresentação de doença clínica (DUBEY et al., 2001c; HOWE et al., 2014). O diagnóstico clínico da sarcocistose é especialmente difícil, uma vez que os sinais clínicos em animais infectados são bastante inespecíficos e comuns em outras enfermidades (HOWE et al., 2008). Muitas técnicas já foram padronizadas para o diagnóstico da sarcocistose nos equinos, como testes sorológicos, parasitológicos e moleculares.

O emprego de técnicas sorológicas é uma ferramenta essencial no diagnóstico *ante mortem*, realizada para confirmar a presença de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. A identificação de imunoglobulinas nos soros dos animais não determina a presença de infecção ativa, mas sim, a exposição ao agente. A detecção de anticorpos pode ser realizada através dos materiais biológicos como soro ou liquor, utiliza-se técnicas como o teste de aglutinação direta (SAT), teste de imunofluorescência indireta (IFI) Western blot (WB) e os ensaios enzimáticos (ELISA).

O SAT foi uma técnica desenvolvida inicialmente para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*, adaptada, posteriormente, para *S. neurona*. A técnica foi realizada com soros de camundongos experimentalmente infectados para a avaliação de parâmetros como especificidade e sensibilidade, observado um percentual de 90% e 100%, respectivamente (LINDSAY e DUBEY, 2001). Contudo, o uso da SAT em equinos não obteve resultados satisfatórios, cujo emprego nesta espécie animal não tem sido recomendado. Já a reação

imunofluorescência indireta, é um teste no qual empregam-se antígenos do parasito fixados em superfície de vidro e marcação das reações antígeno-anticorpo por meio de anti-anticorpos; nesta técnica é possível determinar, nas amostras positivas, a titulação de anticorpos de um determinado animal (DUARTE et al., 2003). O emprego da técnica exige o estabelecimento de critérios, como o ponto de corte utilizado, visto que pontos de corte mais altos maximizam a especificidade, ao passo que pontos de corte mais baixos maximizam a sensibilidade do teste. O emprego da técnica é bastante simples, entretanto, possui algumas limitações, como a experiência do observador e a possibilidade de reações cruzadas com outros parasitos do filo Apicomplexa (DUARTE et al., 2003).

Dentre as variadas finalidades do WB ou immunoblot, destaca-se o reconhecimento de proteínas imunodominantes específicas do parasito. As técnicas sorológicas são de grande valor diagnóstico, no entanto, devido ao compartilhamento de antígenos pelas diferentes espécies de *Sarcocystis*, há grande possibilidade de reações cruzadas. Para o diagnóstico de *S. neurona* priorizava-se a identificação de proteínas de 22, 13 e 10,5 kDa de peso molecular (GRANSTROM et al., 1993). Posteriormente, foram identificadas proteínas dominantes na faixa de 30 e 17kDa, o que foi resultante de modificações na técnica a fim de incrementar as suas especificidade e sensibilidade (ROSSANO et al., 2000).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) apresentam uma grande facilidade de execução, combinada com a possibilidade de alta reprodutibilidade e interpretação mais objetiva dos resultados. Além disso, o uso de antígenos recombinantes no ELISA isenta a necessidade de propagação de parasitos em culturas de tecidos, que conseqüentemente, reduz bastante o custo da técnica. Os antígenos de superfície são importantes fatores de virulência expressos nos parasitos do filo Apicomplexa e participam na interação dos estágios infectantes com as células hospedeiras.

Os exames coproparasitológicos podem ser realizados com fezes dos HD, visto que esses excretam oocistos intactos ou esporocistos. A detecção de *Sarcocystis* spp. nas fezes dos HD pode ser obtida por meio de exames convencionais de flutuação. Oocistos e esporocistos são concentrados por meio de soluções supersaturadas de sal ou açúcar, ou também podem ser usados soluções de sulfato de zinco, com densidade igual ou superior a 1,15 g/cm³, para promover a liberação dessas estruturas dos debrís fecais e deslocamento dos parasitos para a região mais superficial das soluções (DUBEY et al., 2015a).

Nos HI, cistos do parasito são formados no tecido muscular e a pesquisa dessas estruturas pode ser realizada com tecido a fresco, preparado para avaliação histopatológica ou microscopia eletrônica. Quando os cistos são macroscópicos, podem ser observados por inspeção visual do tecido, enquanto a observação microscópica pode ser realizada por meio de técnicas como *squash*, que consiste em comprimir um fragmento de tecido entre duas lâminas de microscopia, com posterior observação microscópica. Em tecidos fixados e preparados para avaliação histológica, pode ser empregada coloração com hematoxilina e eosina (HE), como também outros corantes como o ácido periódico de Schiff ou o corante Giemsa (FAYER, 2004).

Os cistos de *Sarcocystis* foram categorizados de acordo com a sua morfologia, determinada pela microscopia de luz ou eletrônica, técnicas originalmente utilizadas para distinguir as espécies que têm os equinos como hospedeiros. No entanto, sabe-se que os cistos podem sofrer alterações de acordo com a técnica empregada na avaliação, de modo que o exame microscópico pouco sensível devido a impossibilidade de diferenciação entre as espécies de *Sarcocystis* spp. e pela limitação de áreas teciduais a serem avaliadas, assim técnicas mais complexas de microscopia ou até mesmo análises moleculares são necessárias para uma identificação mais precisa (DUBEY et al., 2015a)

Os métodos moleculares têm ganhado marcada evidência no diagnóstico de infecções por *Sarcocystis* spp., seja na detecção de DNA nos tecidos dos hospedeiros, assim como nas fezes dos HD, dando suporte aos estudos morfológicos e biológicos. Além disso, os dados moleculares permitem a inferência das relações filogenéticas e identificação de possíveis hospedeiros relacionados (DAHLGREN e GJERDE, 2010).

As análises genômicas de *Sarcocystis* spp., em sua maioria, estão direcionadas à subunidade 18S do rRNA, onde é realizada em menor proporção da subunidade maior 28S do rRNA e o espaçador transcrito interno 1 (ITS-1). Entretanto, quando se trata de variações moleculares intra-espécies, a análise das sequências do 18S rRNA torna-se limitada, devido a este gene ser altamente conservado (TENTER, 1995). O emprego do 18S é mais informativo quando se deseja identificar espécies distantes (HEBERT e GREGORY, 2005). Assim, a utilização associada do 28S rRNA representa uma solução quando se trabalha com espécies muito correlacionadas (MUGRIDGE et al., 2000).

A utilização do ITS-1 nas análises moleculares de *Sarcocystis* spp. ainda não é tão frequente, no entanto, seu potencial na diferenciação de espécies tem sido mais explorado nos últimos anos, por ser uma região menos conservada no rDNA quando comparada aos genes 18S e 28S. Recentemente, o uso de genes mitocondriais, em particular, o da subunidade I do citocromo C oxidase (COX 1), foi padronizado como marcador de código de barras (DNA *barcoding*) e tem se tornado uma alternativa na identificação e delimitação das espécies muito próximas (GJERDE, 2013). Embora, a finalidade principal do emprego do COX-1 seja a identificação de espécies, as sequências geradas por meio do DNA *barcoding*, podem ser usadas também para inferir relações filogenéticas (HEBERT e GREGORY, 2005).

5. CAPÍTULO 1: *Sarcocystis bertrami* EM EQUINOS: FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE POR MORFOLOGIA, ULTRAESTRUTURA E TESTES MOLECULARES.

5.1 RESUMO

MARQUES, C.D.P. *Sarcocystis bertrami* em equinos: frequência de infecção e identificação de espécie por morfologia, ultraestrutura e testes moleculares, 2021. p. 98 Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia.

Sarcocystis spp. são parasitos considerados heteroxenos obrigatórios, apresenta um ciclo de vida do tipo predador-presa. Os equinos comportam-se como hospedeiros intermediários naturais da espécie *Sarcocystis bertrami* (sinônimo *Sarcocystis fayeri*), que apresenta os cães como hospedeiros definitivos. Os equinos, quando infectados com *S. bertrami* desenvolvem um quadro de sarcocistose muscular, o que pode cursar com alterações neuromusculares nessa espécie animal. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* em equinos do nordeste do Brasil, destinados ao consumo humano, bem como descrever as características morfológicas e moleculares da espécie encontrada. Para a realização do estudo, foram colhidos de um frigorífico 245 fragmentos musculares (masseter, língua, esôfago, coração, diafragma e glúteo) de 51 equinos, os quais foram avaliados através de cinco diferentes técnicas como squash, maceração tecidual, digestão por pepsina ácida, histologia e microscopia eletrônica de transmissão - MET. O DNA foi extraído da bradizoítos obtidos pela digestão dos tecidos em pepsina ácida, assim análise molecular desses tecidos foram direcionadas para o marcador COX-1. Foi verificada uma frequência de 100% de infecção por *S. bertrami* nos equinos avaliados através da técnica de maceração tecidual. Na avaliação histológica visibilizou-se sarcocistos septados, dispersos de forma aleatória no interior das fibras musculares. Por meio da MET foi realizada uma avaliação ultraestrutural do cisto, o qual apresentava-se delimitado pela membrana ondulada do vacúolo parasitóforo, a camada granular com espessura variável dependendo da região de observação, e em algumas regiões, notavam-se projeções vilosas digitiformes inclinadas ou dobradas. Devido a essas características, o cisto foi classificado como tipo 11. A análise molecular das amostras de tecidos musculares individualizados observou-se até 99%

de *coverage*/identidade com sequências de *S. bertrami* disponíveis no Genbank. A análise genética associados ao marcador mitocrandial COX-1, revelou sequências com alta identidade com *Sarcocystis bertrami* isolado em outros continentes. A avaliação ultraestrutural por microscopia de transmissão e a análise genética foram ferramentas essenciais na identificação da espécie de *Sarcocystis* envolvida na infecção dos cavalos oriundos do Nordeste brasileiro. De acordo com a literatura consultada até a presente data, o estudo corrente corresponde à primeira descrição morfológica e molecular de *Sarcocystis bertrami* (*S. fayeri*) em equinos do Brasil.

Palavras-chave: sarcocistose; saúde pública; equídeos; Brasil.

5.2 ABSTRACT

MARQUES, C.D.P. *Sarcocystis* spp. in equides: frqueency of infection and species identification by morphology, ultrastructural, and molecular methodes in Bahia, Brazil, Salvador, Salvador, 2021. p. 98 Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia.

Sarcocystis spp. are obligatory heteroxenes parasites, presenting a predator-prey life cycle. Horses behave as natural intermediate hosts of the species *Sarcocystis bertrami* (synonymous *Sarcocystis fayeri*), which has dogs as definitive hosts. Horses infected with *S. bertrami* develop muscular sarcocystosis, which can lead to neuromuscular clinical signs in this animal species. Equine meat is highly appreciated in European and Asian countries, which is consumed raw or undercooked and may have viable cysts of the parasite. The consumption of meat containing *S. bertrami* cysts has been associated with gastrointestinal disorders in humans. The present study aimed to determine the frequency of infection by *Sarcocystis* spp. in horses from Bahia, Brazil, destined for human consumption, as well as describing the morphological and molecular characteristics of the observed species. In this study, muscle fragments were collected from 51 horses, during three different seasons of the year, from a slaughterhouse in the state of Bahia. The samples were prepared for macroscopic and microscopic evaluation, using tissue maceration, squash, histology and transmission electron microscopy techniques. A frequency of 100% of infection by *Sarcocystis* spp. was observed in the evaluated horses. Histological examination revealed several highly septated sarcocysts, with variable sizes and shapes and randomly dispersed within the muscle fibers. When parasites were evaluated by transmission electron microscopy, the cyst was delimited by the membrane of the parasitophorous vacuole, whose shape was wavy and covered by an electron-dense layer. The villar protrusions were digitiform, inclined or bent, allowing the morphological classification of their cystic wall as type 11. The frequency of infection by *Sarcocystis* spp. in horses from Bahia, Brazil, destined for human consumption, it was quite high. Transmission microscopy for ultrastructural evaluation was essential to identify the *Sarcocystis* spp. involved in horses' infection. According to the literature consulted until now, the current study

corresponds to the first morphological and molecular description of *Sarcocystis bertrami* (*S. fayeri*) in horses from Brazil.

Keywords: sarcocystosis; public health; horses; Brazil

5.3 INTRODUÇÃO

A demanda por fontes alternativas de proteínas de origem animal tem proporcionado uma nova visão a respeito do consumo de carne equina, promovendo uma maior consolidação no mercado mundial (LORENZO et al., 2014). Países da Europa Ocidental e Ásia são os mais representativos em relação ao consumo de carne de cavalo, cuja origem, em sua maioria, é oriunda das Américas, e em menor proporção, da Europa Oriental (DUPOUY-CAMET, 2015; MURRELL et al., 2004).

Em alguns países, o consumo de carne de cavalo é realizado, geralmente, de forma crua ou com cozimento mínimo, elevando o risco do consumidor em adquirir infecções ou intoxicações. Os equinos são hospedeiros de alguns agentes etiológicos que oferecem risco a saúde humana, como bactérias, nematódeos e protozoários. Dentre os protozoários, há um especial destaque para *Sarcocystis* spp., pois devido ao consumo de carne crua ou semi-crua, aumenta-se a probabilidade da ingestão de cistos musculares viáveis desses parasitos (BOIREAU et al., 2000).

Sarcocystis spp. são parasitos considerados heteroxenos obrigatórios, apresentando um ciclo de vida do tipo predador-presa. Os equinos comportam-se como hospedeiros intermediários (HI) naturais da espécie *S. bertrami* (sinônimo *Sarcocystis fayeri*), que apresenta os cães como hospedeiros definitivos (HD). Quando os equinos ingerem esporocistos de *Sarcocystis* sp. excretados nas fezes de cães, ocorre o desenvolvimento de cistos contendo bradizoítos em seus tecidos musculares (DUBEY et al., 2015a).

No Brasil a grande maioria dos estudos epidemiológicos a cerca de *Sarcocystis* spp. em equinos são sorológicos, há apenas um estudo com pesquisa de sarcocistos na musculatura miocárdica. De modo que as informações a respeito da infecção por *S. bertrami* em equinos são escassas, assim como, as possíveis lesões causadas pelo parasito em equinos, como miosites, e até mesmo possíveis toxiinfecções em humanos. A fim de responder a algumas dessas questões, objetivou-se, com o estudo corrente, determinar a frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* em equinos de abatedouro da Bahia, bem como as características morfológicas e moleculares dos parasitos detectados.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia registrado com o nº 81/2019.

5.4.1 Amostras

Fragmentos musculares de 51 equinos foram adquiridos de um frigorífico de Inspeção Federal do Estado da Bahia, em três diferentes períodos, entre os meses de janeiro de 2020 e abril de 2021. A primeira colheita ocorreu em janeiro de 2020, a segunda, em outubro de 2020, e a última, em abril de 2021. Foram colhidos 275 fragmentos musculares individuais de equinos, os quais continham cerca de 200 g de cada tecido. Sendo 51 fragmentos de língua, 51 de masseter, 31 de esôfago, 51 de coração, 51 de diafragma e 40 de músculo glúteo. Os fragmentos musculares foram acondicionados em embalagens plásticas, identificados individualmente e transportados em caixa isotérmica até o Laboratório de Protozoários Coccídios, localizado no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, onde as amostras foram mantidas sob refrigeração até o seu processamento.

5.4.2 Avaliação macroscópica

Um total de 275 fragmentos musculares foram analisados por meio do exame macroscópico. A avaliação foi realizada a partir de pelo menos dez cortes transversais em cada fragmento de músculos da língua, coração, masseter, diafragma e glúteo. O esôfago foi longitudinalmente seccionado para a exposição do lúmen esofágico e das paredes externas e internas, a fim de serem analisadas macroscopicamente.

5.4.3 Avaliação microscópica dos tecidos frescos e não corados

A avaliação microscópica dos cistos foi realizada por meio de *squash* e maceração. Para o *squash* os tecidos frescos foram cortados em fragmentos de 5mm de espessura, firmemente pressionados entre duas lâminas de microscopia e

visualizados em microscópio óptico com uma ampliação de 40x e 100x. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada tecido.

A avaliação microscópica para a presença de cistos e/ou bradizoítos foi realizada por meio da maceração de aproximadamente 50 g de cada um dos tecidos com o auxílio de cadinho e pistilo, adicionando-se cerca de 5 a 10 mL de PBS (pH 7,2). O material foi homogeneizado, filtrado em gaze, sendo acondicionado em tubo Falcon de 50mL. Ao filtrado, adicionava-se PBS (pH 7,2) até a completude do volume de 45 mL, submetendo-o à centrifugação (600 x g por 10 minutos). O sobrenadante foi então descartado, e ao sedimento, adicionado 1,5 mL de PBS (pH 7,2). Após a homogeneização, três esfregaços foram realizados para a visualização em microscópio óptico (aumento 40x). Os cistos encontrados foram coletados com o auxílio de uma agulha de seringa (19G) e transferidos para tubos de 1,5mL, livres de DNase/RNase, e estocados a - 20° C para análise posterior. Os cistos detectados, assim como bradizoítos, foram mensurados e fotografados em microscópio Nikon Cli com o auxílio do software NSI Elements (Nikon) e câmera acoplada.

5.4.4 Análise histológica e por microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de cada fragmento muscular foram fixadas em formol tamponado a 10%, embebidas em parafina, seccionadas na espessura de 5 µm e coradas por hematoxilina-eosina (HE). As secções foram examinadas por microscopia de luz para a presença de formas infectantes de *Sarcocystis* spp. Para a avaliação por microscopia eletrônica de transmissão os cistos extraídos da língua do cavalo foram fixados em solução de glutaraldeído a 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), por 2 horas a temperatura ambiente, e posteriormente, armazenados a 4° C até o processamento. Após a fixação, os tecidos foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em diferentes soluções de acetona (30, 40, 50, 70, 90 e 100%) e tratados em bloco com 1% de idofosfotúngstico e 1% de acetato de uranilo. Em seguida, a acetona a 100% foi substituída por resina Polybed, que foi polimerizada em estufa a 60°C. Cortes semifinos foram realizados para observação dos cistos de *Sarcocystis* spp. em microscópio de luz, e em seguida, cortes ultrafinos foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900®.

5.4.5 Digestão dos tecidos por pepsina ácida

Os fragmentos musculares foram pesados em uma proporção de 100 gramas de tecido para cada 400 mL de solução de pepsina ácida (2,5 g de pepsina [0,7 U-FIP / mg] e 10 mL de HCl em 1 L de água solução). A mistura foi colocada em um agitador magnético por 20 min a 37°C, e após essa etapa, foi filtrada através de peneiras de 300, 150 e 53 µm em tubos Falcon de 50 mL e centrifugada a 500 x *g* por 5 min. Os sobrenadantes e a camada superior do sedimento foram descartados. Procedeu-se a lavagem do sedimento, três vezes, com PBS (pH 7,2). O pellet formado foi então purificado em coluna de Sephadex® G-25, lavado com PBS e concentrado por centrifugação por 1500 *g* por 5 minutos. Os bradizoítos, foram mensurados e fotografados em microscópio Nikon Cli com o auxílio do software NSI Elements (Nikon) e câmera acoplada. Em seguida, foram contados em hemocítmetro e armazenados em tubos de 1,5mL, livres de DNase/RNase a -20° C para análise posterior (LUNDE e FAYER, 1977)

5.4.6 Análise molecular

Para a análise molecular foram utilizadas quatro amostras de bradizoítos recuperados por meio da solução de digestão com pepsina (amostra 01 o fragmento utilizado na digestão foi o glúteo do cavalo 46, a amostra 02, amostra 03 obtida do fragmento do glúteo do cavalo de número 17, uma amostra de cisto extraído da língua do cavalo de número 31, macerado da língua do cavalo de número 48. O controle positivo consistiu de DNA extraído de merozoítos de *S. neurona* SN-138 (LINDSAY et al., 2004), e como controle negativo, foi empregada água ultrapura. O DNA das amostras foi extraído pelo kit comercial Easy-DNA (Invitrogen®, Carlsbad, EUA). O produto final contendo DNA do parasito foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até a sua utilização.

5.4.7 Reação em cadeia de polimerase convencional

A análise do material genético foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase convencional (PCR). Para amplificação do DNA, foi selecionada sequência do gene mitocondrial COX-1 (~1.060 pb) e ITS-1 (~1038pb).

As sequências dos primers utilizados estão disponíveis na tabela 1. As reações foram conduzidas utilizando-se um volume total de 50 µL, contendo 2 µL de cada parte primer (10pmol), 25 µL de mix comercial para PCR (Master Mix, Promega, Madison, WI), 2 µL do DNA teste e 19 µL de água (H₂O) ultrapura para PCR. Para o gene ITS-1 as condições do termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) para a amplificação do DNA consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 90 segundos), e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Enquanto, para o gene COX-1. Para o gene COX-1 as condições do termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) para a amplificação do DNA consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por um minuto), e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos (GJERDE et al., 2013).

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação de DNA extraído dos tecidos equinos colhidos no frigorífico para a PCR.

Primer	Sequência	Região	Fonte
SU1F	5'- GATTGAGTGTTCGGTGAATTATT - 3'	ITS-1	(GJERDE, 2014a)
5.8SR2	5'- AAGGTGCCATTTGCGTTCAGAA -3'	ITS-1	(GJERDE, 2014a)
SF1	5'- ATGGCGTACAACAATCATAAAGAA - 3'	COX-1	(GJERDE, 2013)
SR9	5'-ATATCCATACCRCCATTGCCCAT-3'	COX-1	(GJERDE, 2014b)

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O SYBER Gold foi utilizado como marcador de DNA, e uma escada de 100 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) foi empregada para avaliar o tamanho molecular dos produtos. Alíquotas de 5 µL dos amplicons foram misturadas a 2 µL da solução de SYBER Gold e tampão (1:1), e depositados no gel de agarose imerso em tampão Tris-borato-EDTA (TBE). Após a eletroforese, o gel foi direcionado ao transiluminador, com auxílio da emissão ultravioleta, para a visualização das bandas de diferentes tamanhos moleculares.

5.4.8 Purificação dos amplicons

Para a purificação, os produtos de PCR passaram por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Posteriormente, um kit comercial (PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification, Thermofischer Scientific) foi utilizado para a extração de DNA a partir das bandas de DNA excisionadas do gel de agarose, de acordo com as recomendações do fabricante.

5.4.9 Sequenciamento do material genético

O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos de PCR será realizado pelo método de Sanger com o emprego de didesoxinuclotídeos marcados com fluorescência, disponíveis no kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Thermofischer Scientific, em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser, Life Technologies, Applied Biosystems. Os cromatogramas foram analisados visualmente com auxílio do software FinchTV version 1.4.0. Em seguida, as sequências nucleotídicas obtidas de cada produto de PCR foram salvas em formato Fasta. As sequências finais de cada marcador (ITS-1 e COX-1) foram comparadas como dado interrogante a outras disponíveis na plataforma NCBI *GenBank* através do Nucleotide BLAST (Blastn).

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Avaliação macroscópica

Foram avaliados cerca de seis fragmentos musculares, perfazendo um total de 275 amostras, oriundas de 51 equinos. As amostras foram oriundas de um frigorífico de Inspeção Federal do Estado da Bahia, obtidas ao longo do período de janeiro de 2020 a abril de 2021. Foram colhidos fragmentos de língua, masseter, esôfago, diafragma, glúteo e coração. Na análise macroscópica dos fragmentos musculares não foram observadas quaisquer estruturas císticas ou lesões inflamatórias associadas com *Sarcocystis bertrami*.

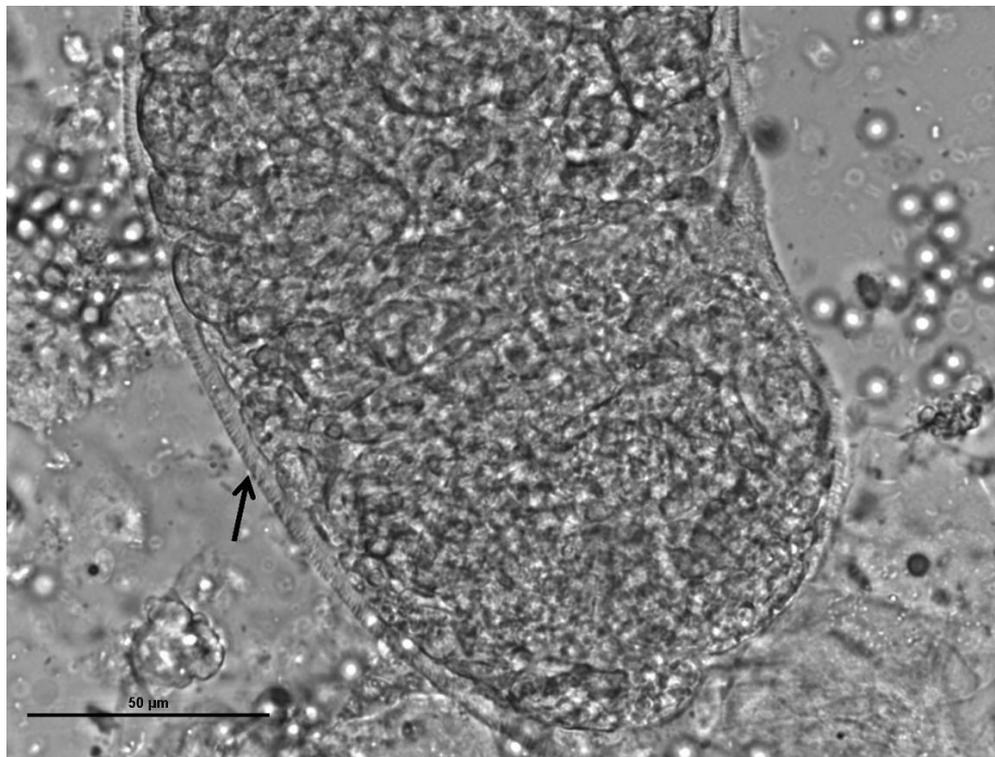
5.5.2 Avaliação microscópica

Na avaliação por *squash* não foram visualizados cistos nos 275 fragmentos dos 51 equinos avaliados. Em contrapartida, pelo método de maceração, foram visualizados, em pelo menos um dos fragmentos analisados dos 51 equinos, bradizoítos livres e/ou cistos, resultando num total de 100% dos animais infectados com *Sarcocystis bertrami*. A maior frequência verificada foi no músculo do glúteo, representando 97,50% (39/40), seguida de esôfago, 90,32% (28/31), da língua, com 90,19% (46/51), 66,70% (34/51) no diafragma, 17,64% (9/51) no masseter e 3,92% (2/51) no coração.

Os sarcocistos eram filiformes, com protrusões vilares digitiformes (figura 3), e altamente septados, de forma que os bradizoítos visualizados no interior apresentavam-se compartimentalizados (figura 4).

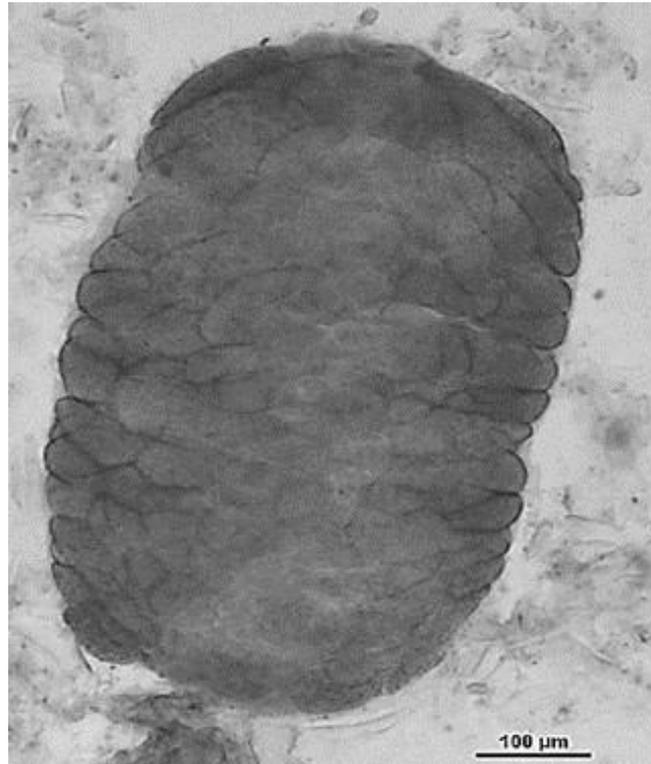
Os bradizoítos (figura 5) visualizados no macerado apresentavam uma aparência delgada de formato semilunar, e ao corte longitudinal, apresentavam dimensões de 14,03 - 17,64 (16,16 \pm 1,03) x 3,86 - 5,84 (4,88 \pm 0,54) μ m (n=20).

Figura 2: Cisto de *Sarcocystis bertrami* obtido de macerado tecidual da língua. Notam-se as protrusões vilares digitiformes sinalizadas pela seta.



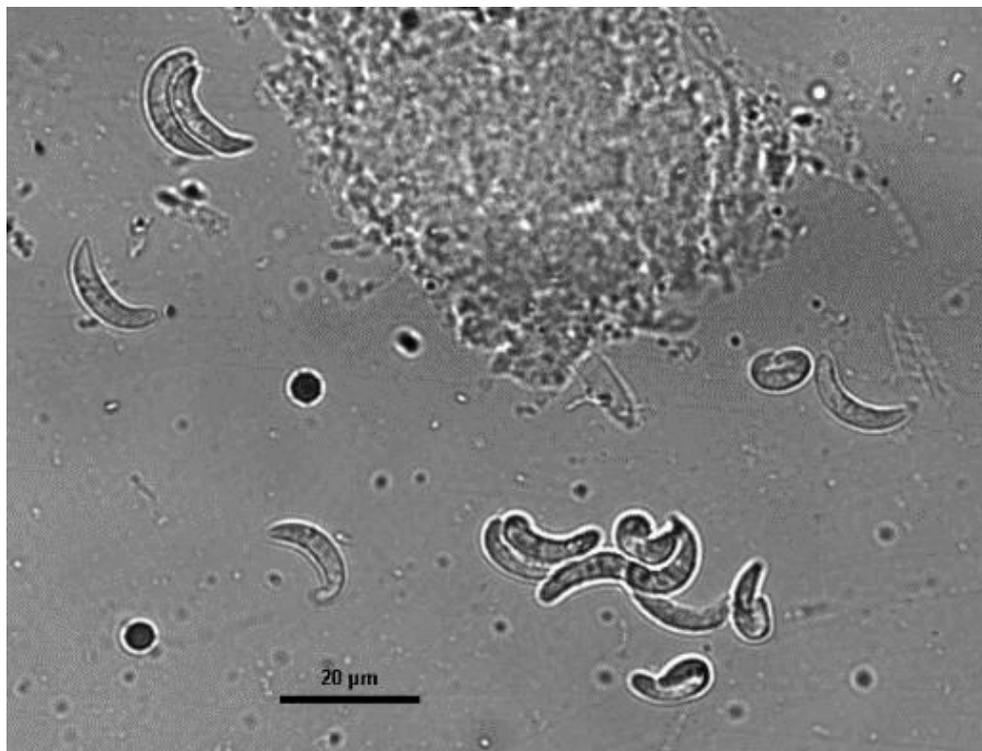
Fonte: ACERVO PESSOAL (2020).

Figura 3: Cisto de *Sarcocystis bertrami* com as septações evidentes livre no macerado do fragmento de língua equina.



Fonte: ACERVO PESSOAL (2020).

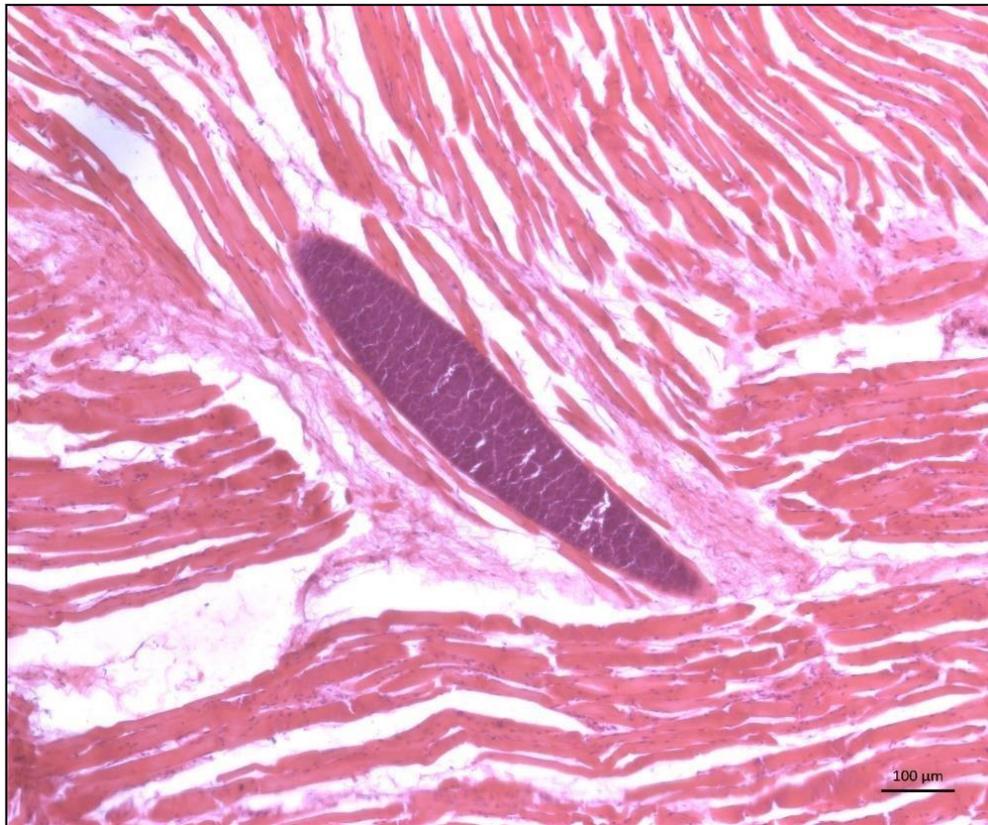
Figura 4: Bradizoítos de *Sarcocystis bertrami* livres no macerado de língua equina.



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

Os fragmentos musculares destinados à avaliação histológica, corados com H&E, não apresentaram alterações patológicas macroscópicas. A presença dos sarcocistos não estava associada a inflamação ou necrose, porém, as fibras musculares afetadas apresentavam um aumento em seus tamanhos. Microscopicamente, notaram-se diversos sarcocistos dispersos de forma aleatória no interior das fibras musculares, com tamanhos e formatos variáveis. Essas variações estavam, em grande parte, associadas ao ângulo em que os tecidos foram seccionados. Quando em corte longitudinal, apresentavam dimensões 300,15 - 1.084,79 (526,89 ± 231,00) x 36,78 - 260,29 (103,70 ± 59,78) µm (n=15), e quando em corte transversal, 69,95 - 190,80 (125,62 ± 41,22) 29,96 - 126,95 (73,08 ± 28,36) µm (n=15). As formas císticas visualizadas apresentavam morfologia arredondada, elíptica ou alongada (figura 6). No interior dos cistos, observavam-se numerosos zoítos compartimentalizados, separados por septos. As paredes dos cistos eram evidentes à microscopia óptica, quando em maior aumento (1000×), no entanto, não era possível visualizar os detalhes de suas protruções vilares neste tipo de microscopia.

Figura 5: Fotomicrografia Corada em H.E. objetiva 10× da língua de equino evidenciando um cisto de *Sarcocystis bertrami*, os septos são visualizados como estruturas não coradas (claras).

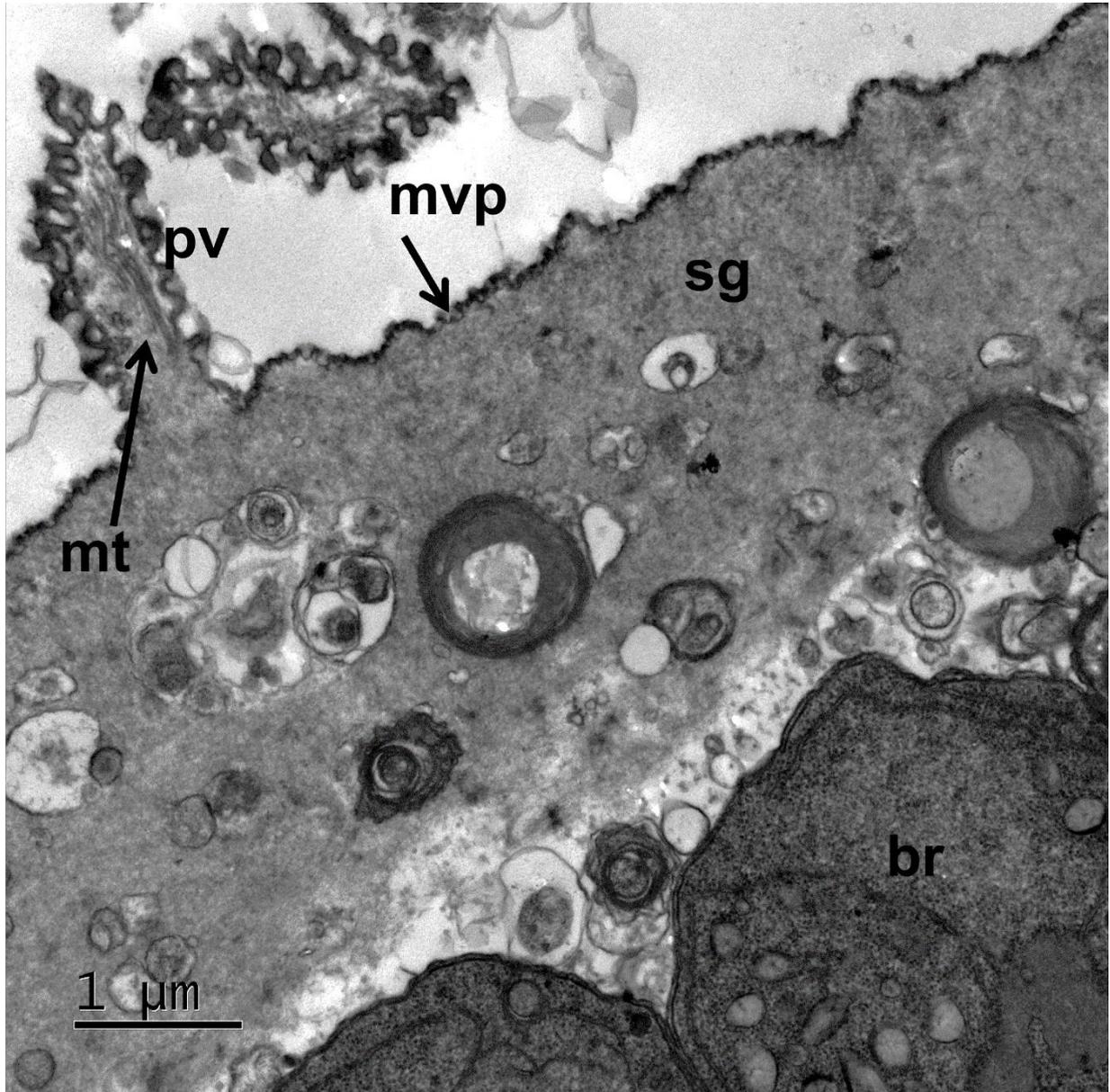


Fonte: ACERVO PESSOAL (2020).

5.5.3 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão

Em observação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, notou-se que o cisto estava delimitado pela membrana do vacúolo parasitóforo (mvp) que apresentava um formato ondulada e revestida por uma camada eletrodensa, apresentando em algumas regiões reentrâncias na mvp, garantindo um aspecto ondulado, enquadrada no tipo de parede 11c de acordo com a descrição criada por Dubey et al. (2015). A substância granular (sg) apresentava uma variação na sua espessura, dependendo da região de observação apresentando 0,65 - 2,63 µm (figura 6). As protruções vilares longas (pv) eram visualizadas em algumas regiões do cisto, mas não ao longo de toda a parede, que se apresentavam digitiformes, inclinadas em relação ao eixo da parede cística, e por vezes, dobradas, e com comprimentos variáveis 0,97 – 4,09 µm. Microtúbulos foram observados tanto nas protruções vilares, bem como dispersos na substância granular (figuras 7 e 8).

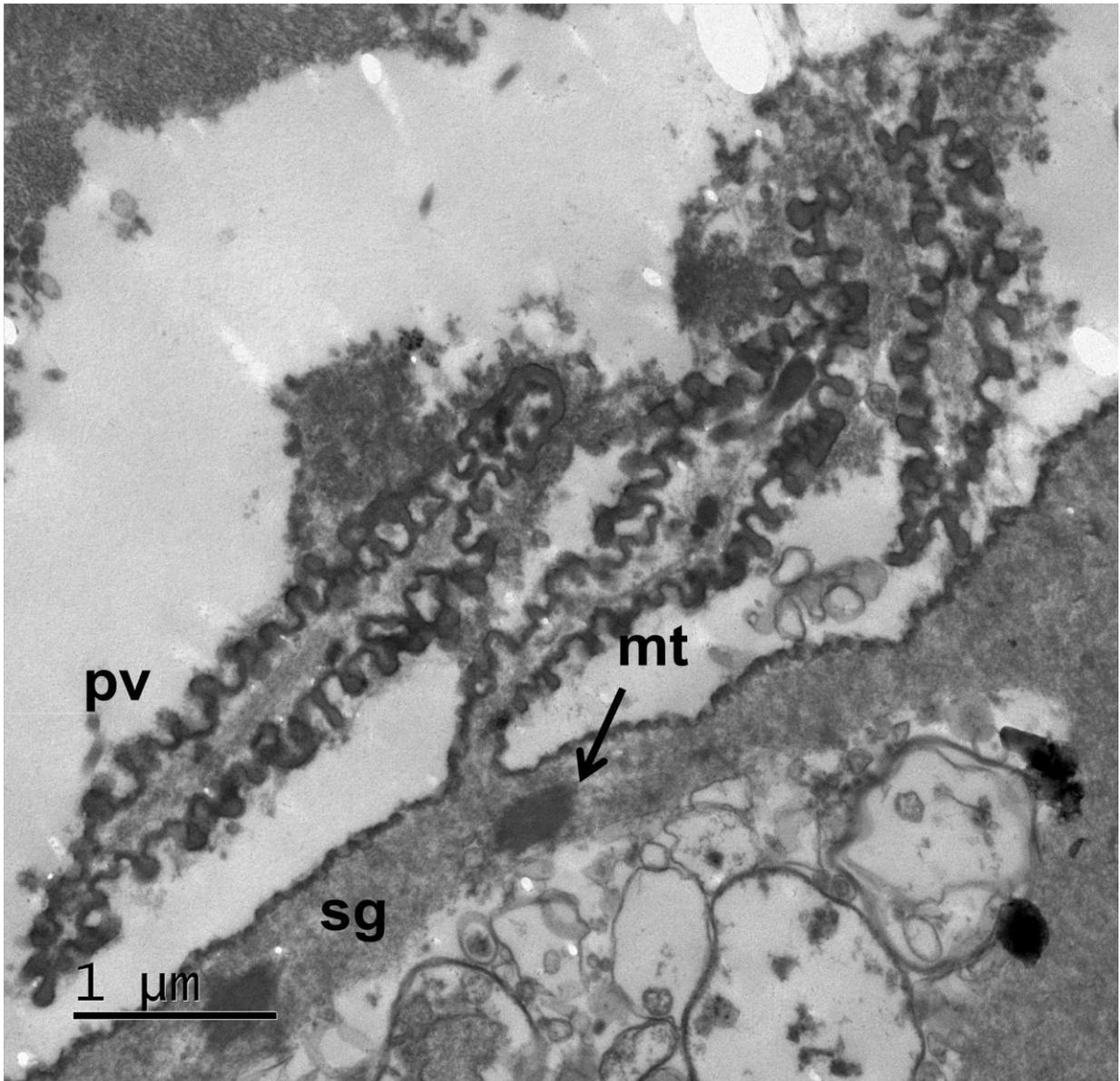
Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão das paredes do sarcocisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino. A membrana do vacúolo parasitóforo (mvp) é revestida por camada eletrodensa, protrusões vilares (pv) notando-se microtúbulos (mt) no seu interior e uma camada mais espessa da substância granular (sg).



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021)

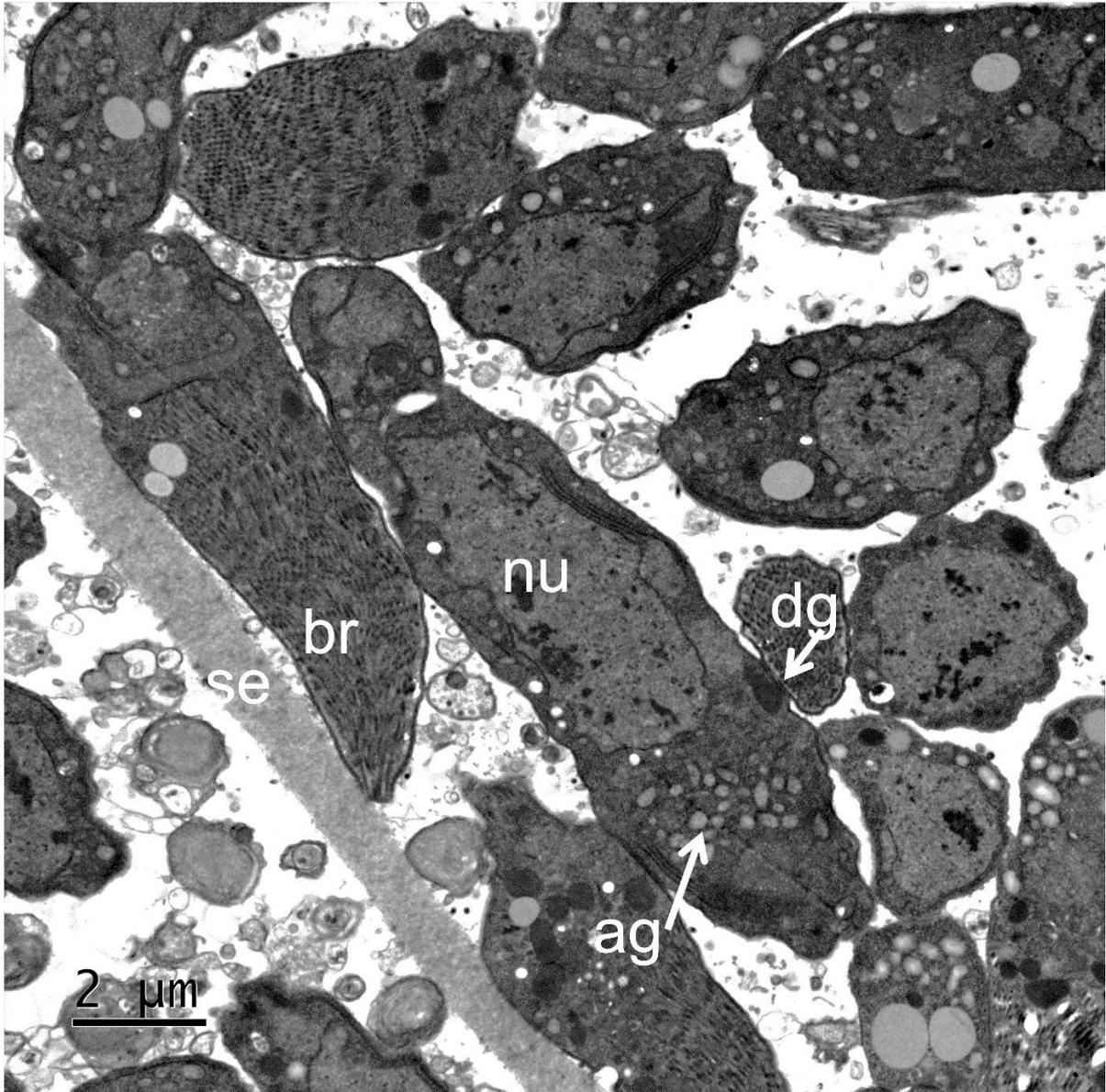
No interior dos cistos observaram-se septos que separavam os zoítos como grupos individualizados. Inúmeros bradizoítos alongados foram visualizados, nesses eram evidentes uma quantidade significativa grânulos de amilopectina e de micronemas, e em menor proporção, roptrias (figura 9). Em alguns bradizoítos, o conóide era visível no polo anterior (figura 10).

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão das paredes do sarcocisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino. Na imagem observa-se as protusões vilosas (vp) inclinadas, a substância granular (sg) menos espessa e microtúbulos (mt) em corte diagonal na sg.



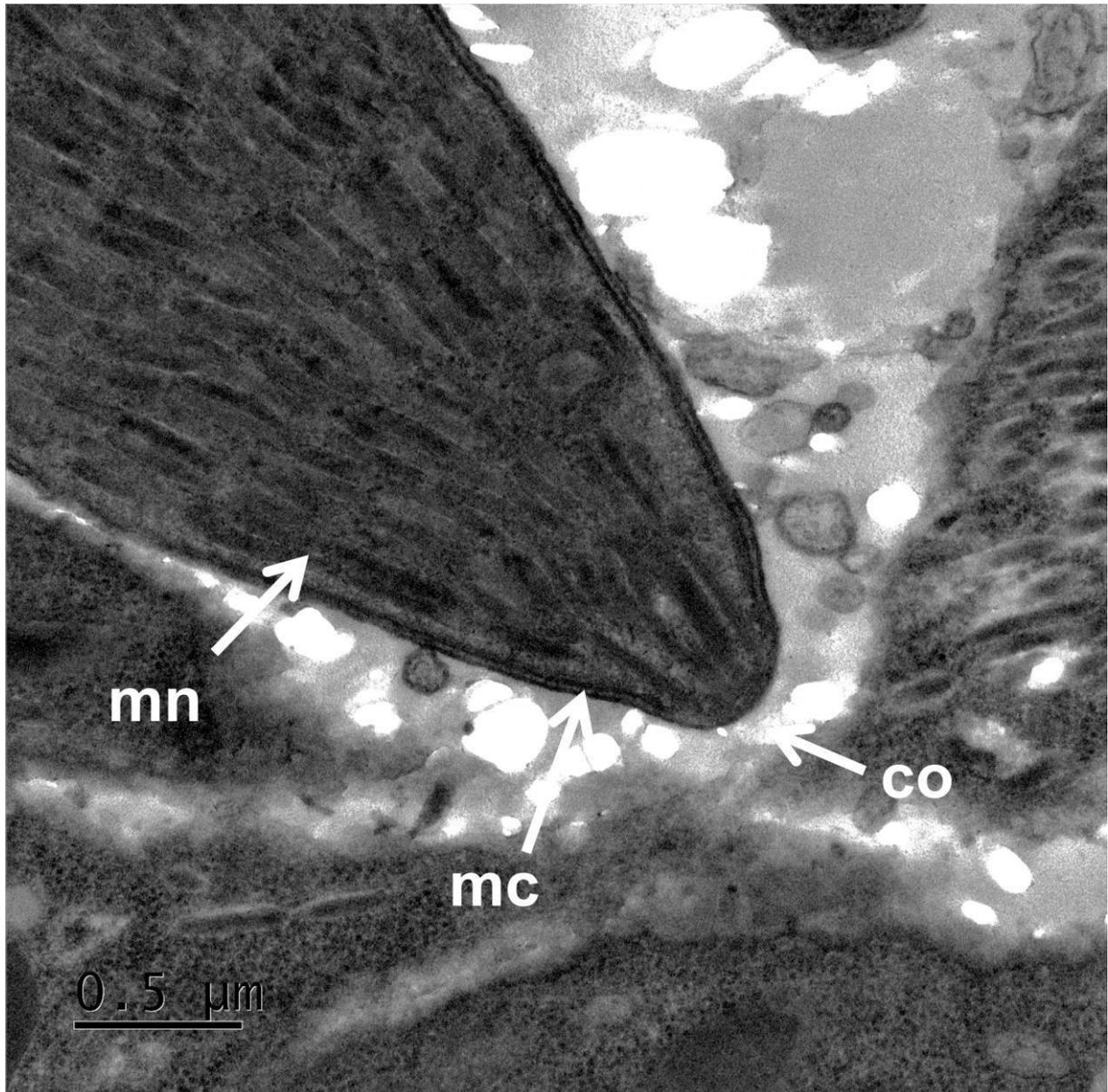
Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do cisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino, observando-se bradizoítos (br) em diferentes seções, com grânulos de amilopectina mais claros, vários grânulos densos mais escuros (dg), núcleo (nu) e septos. (se) separando os grupos de



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão do cisto de *Sarcocystis bertrami* extraído da língua de um equino evidenciando o polo apical de um bradizoíto (br). Na imagem nota-se o conóide (co), numerosas micronemas (mn) e a membrana citoplasmática (mc) composta por duas camadas.

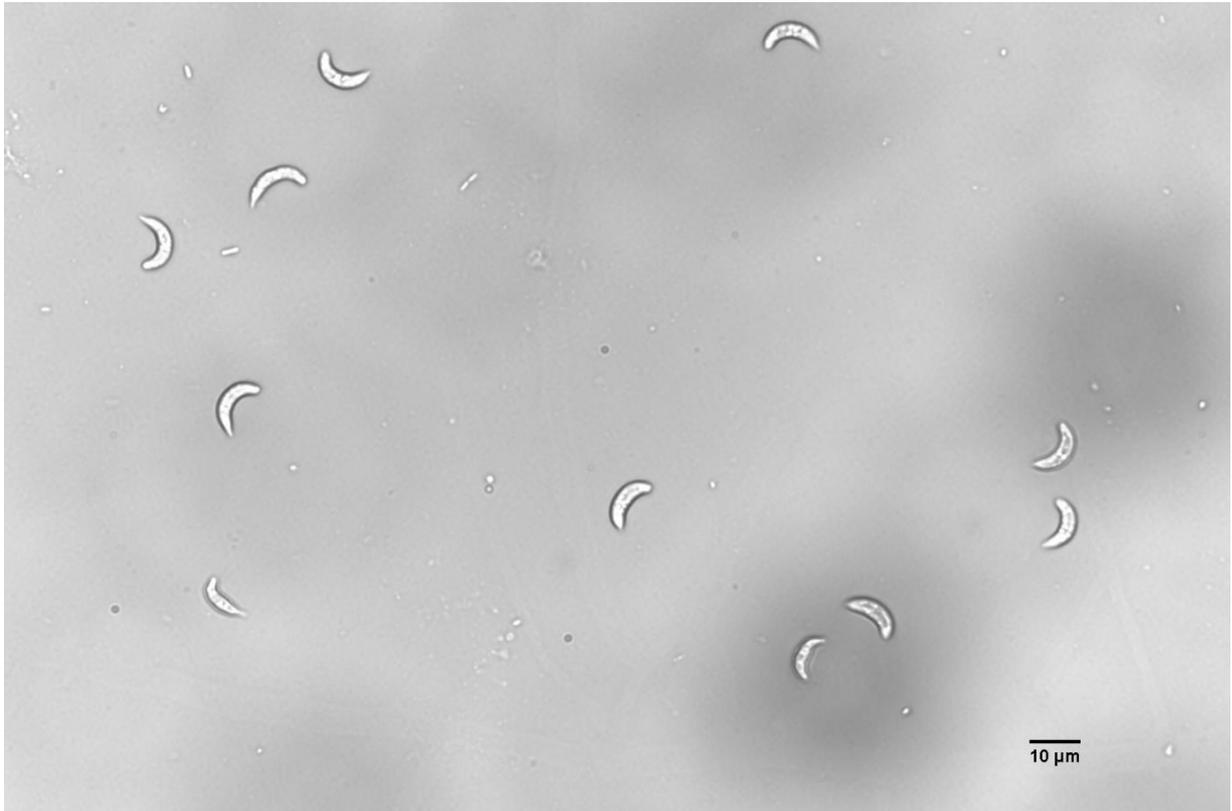


Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

5.5.4 Observação de bradizoítos em tecidos digeridos por pepsina

A digestão de fragmentos musculares com solução de pepsina ácida possibilitou visualização de bradizoítos livres (figura 11) em uma proporção de 3 - 4 x 10⁷ bradizoítos por microlitro/50gramas de tecido. Esses bradizoítos foram posteriormente utilizados para a realização das análises moleculares.

Figura 10: Bradizoítos de *Sarcocystis bertrami* do músculo glúteo de um equino obtidos após a digestão com solução de pepsina ácida a 2,5%.



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

5.5.5 Avaliação molecular

A avaliação molecular foi realizada da amostra de bradizoítos obtidos pela digestão com pepsina. Realizou-se a amplificação do DNA com o marcador do gene mitocondrial COX-1. O amplicon apresentou o tamanho próximo ao esperado na eletroforese, com banda única de aproximadamente 963 pb. A análise seguiu-se por meio da purificação do gel e envio da amostra para o sequenciamento do DNA. Com o resultado do sequenciamento, analisou-se os cromatogramas, os quais contribuíram para edição das sequências e obtenção das fitas consenso. As sequências consenso de cada marcador foram submetidas à busca por identidade no banco de dados do *Genbank*.

O gene mitocondrial COX-1 demonstrou 96% de *coverage* com as sequências homólogas, KY399759, disponíveis no *GenBank*. A sequência isolada do cavalo apresentou 99,46% de identidade com outras sequências de *Sarcocystis bertrami* identificadas em tecidos musculares de equinos e asininos. Também apresentou

similaridade com 4 sequências cujo *coverage* foi de 99% e identidade de 82,37% de carne de cavalo no Japão (LC171850; LC171840; LC171857; LC171856)

5.6 DISCUSSÃO

A taxonomia das espécies de *Sarcocystis* em equídeos tem gerado conclusões conflitantes ao longo dos anos. Desde 1983, já se cogitava existir apenas uma única espécie de *Sarcocystis* induzindo à formação de cistos musculares em equinos e asininos (MATUSCHKA, 1983). Por meio de evidências morfológicas e moleculares, *S. bertrami* e *S. fayeri* foram consideradas uma única espécie, sugerindo-se o nome *S. bertrami* (sinônimo: *S. fayeri*), uma vez que sua descrição na literatura foi anterior a *S. fayeri*. Os equinos atuam como HI naturais da espécie integralizada como *S. bertrami* (sinônimo *S. fayeri*), que promove o desenvolvimento do quadro de sarcocistose muscular (ZENG et al., 2018); MA et al., 2020). No Brasil é desconhecida a frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* em tecidos de equinos, assim como, possíveis variações genéticas entre os isolados brasileiros e de outros países.

No presente estudo examinaram-se 275 fragmentos musculares de regiões distintas como masseter, língua, esôfago, coração, diafragma e glúteo de 51 cavalos abatidos em um frigorífico no estado da Bahia, cujos animais são oriundos de diferentes municípios baianos. Foram colhidas amostras dos equinos em três diferentes momentos (meses de janeiro de 2020, outubro de 2020 e abril de 2021), o que tende a minimizar a possível influência da sazonalidade em relação aos resultados do estudo. Verificou-se uma frequência de infecção de 100% (n = 51) dos cavalos examinados neste trabalho. O emprego de cerca de seis diferentes tecidos, cinco técnicas diagnósticas, assim como a utilização de animais de descarte, que geralmente são mais idosos possibilitando um aumento no risco de infecção o longo da vida, possivelmente influenciaram a elevada taxa de infecção observada. No único estudo publicado no Brasil sobre a pesquisa de *Sarcocystis* spp. em músculos de equinos, os autores utilizaram somente músculo cardíaco e não observaram qualquer cavalo infectado dos 197 animais examinados (PORTELLA et al., 2017). Contudo, sabe-se, atualmente, que *S. bertrami* tem baixo tropismo por músculo cardíaco. Em um estudo realizado na China, os autores observaram 73,9% (34/46) de equinos infectados por *S. bertrami*, entretanto, o parasito não foi observado em nenhum dos 46 tecidos cardíacos avaliados (MA et al., 2020).

Quando comparada a frequência do estudo vigente com outras pesquisas e com diferentes métodos diagnósticos, observa-se que a detecção de infecção foi superior a estudos realizados na China, onde foram detectados 15% (5/32) (ZENG et al., 2018) e 74% (34/46) (MA et al., 2020) de sarcocistos de *Sarcocystis* spp., porém, nos estudos chineses os autores realizaram um número limitado de técnicas. Em Marrocos, a frequência de infecção nos cavalos variou de acordo com o método empregado; por triquinoscopia a prevalência foi menor, 17,6% (21/119), enquanto na histologia foi 46,2% (55/119) (KIRMSE, 1986). A partir dessa avaliação, observa-se que dependendo do método diagnóstico empregado, há variações na detecção de *Sarcocystis* spp. em músculos de equinos.

A elevada frequência de *S. bertrami* em equinos na Bahia pode estar relacionada a determinadas características regionais. Sabe-se que cães são HD de *S. bertrami* (*S. fayeri*), e que além de equinos, jumentos também são HI de *S. fayeri* (SAVILLE et al., 2004). Nos estados do Nordeste brasileiro, incluindo o estado da Bahia, os jumentos tinham, por muitas décadas, uma grande importância como animais de trabalho, em particular, para o transporte de cargas e montaria. Ao longo dos anos, dado aos adventos da maior facilidade em se adquirir veículos motorizados, mecanização agrícola e o desenvolvimento urbano, fizeram com que as atividades tradicionais dos jumentos fossem continuamente reduzidas, de forma que se observa um maior número de animais abandonados nas áreas rurais, levando à morte desses animais por falta de água e alimentos, e em menor escala, por atropelamentos em rodovias (SALLES et al., 2013; MITCHELL, 2018). Essa disponibilidade de carcaças possibilita o acesso pelos HD, como os cães, garantindo que esses sejam infectados por *S. bertrami* com maior frequência a partir da ingestão destes tecidos de jumentos ou de equinos. Com isso, esporocistos excretados pelos cães favorecem a infecção dos HI e a continuidade do ciclo biológico do parasito. É desconhecido se algum canídeo no Brasil, além de cães domésticos, sejam HD de *S. bertrami*.

A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão foi crucial para a identificação da espécie *S. bertrami* (sinônimo *S. fayeri*). Observou-se que o cisto apresentava uma parede ondulada com aparentes reentrâncias e protruções vilares inclinadas, sendo enquadrado como uma parede do tipo 11. As características encontradas eram equivalentes com os achados de outros estudos realizados (DUBEY et al., 2015c; ZENG et al., 2018).

A característica morfológica da parede dos cistos é um dado complementar na taxonomia das espécies de *Sarcocystis* em um determinado hospedeiro, já sendo descritas mais de 40 tipos morfológicos de paredes (DUBEY et al., 2015a). O tamanho e a característica dos cistos bem como das protruções vilares podem sofrer alterações conforme a idade. Nota-se que cistos mais velhos apresentam um encurtamento nas protruções e maiores dimensões que cistos jovens, uma vez que com o envelhecimento, continuam a crescer, garantindo o aumento das suas proporções nas fibras musculares. Essa capacidade dos cistos se modificarem ao longo do seu processo de maturação pode ser o motivo de tantas descrições confusas com relação a taxonomia das espécies de *Sarcocystis* em equídeos.

A análise genética realizada no isolado do estudo demonstrou ser uma ferramenta essencial para identificar a espécie de *Sarcocystis* envolvida na infecção dos equinos do Nordeste brasileiro. De modo que, as sequências obtidas do gene mitocondrial COX-1 se mostraram serem muito semelhantes quando comparada às sequências homólogas no Blastn, apresentando *coverage* de 96% e identidade de 99,46% com a sequência KY399759 encontrada em outro estudo realizado na China. Um percentual de *coverage* elevado associado com a alta identidade possibilita uma confiabilidade maior nos resultados, pois reduz a variabilidade. A aplicação da análise por meio do gene mitocondrial COX-1, é uma possibilidade aprimorada na identificação de espécies de *Sarcocystis* sp. muito próximas ou que compartilhem o mesmo hospedeiro.

Diante da elevada frequência de *S. bertrami* detectada no estudo corrente, inclusive em cortes musculares destinados ao consumo humano, cuidados devem ser tomados para se prevenir possíveis danos à saúde humana causados pela ingestão de *S. bertrami* em carne equina. Nos países onde o consumo de carne equina é mais elevado, é comum o seu consumo de forma crua ou após um breve cozimento, o que favorece a permanência de formas viáveis do parasito (BOIREAU et al., 2000). Desse modo, a possibilidade de intoxicações provocadas pelo consumo de carne equina é um risco à saúde humana, supostamente devido a uma proteína enterotoxigênica já identificada nos cistos do parasito (KAMATA et al., 2014).

5.7 CONCLUSÃO

A frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* em equinos do Nordeste brasileiro, destinados ao consumo humano, foi de 100%. A microscopia de transmissão para a avaliação ultraestrutural foi essencial para auxiliar na identificação da espécie de *Sarcocystis* envolvida. No entanto, a avaliação molecular é consideravelmente mais elucidativa, agregando dados mais concisos a respeito da espécie que infecta equinos no Brasil, além de sustentar a hipótese de que os isolados brasileiros se apresentam semelhantes aos de outros continentes. Este o primeiro relato de *Sarcocystis bertrami* em equinos do Brasil com identificação ultraestrutural e molecular do parasito.

5.8 REFERÊNCIAS

- BARTA, J. R.; MARTIN, D. S.; LIBERATOR, P. A.; DASHKEVICZ, M.; ANDERSON, J. W.; FEIGHNER, S. D.; ELBRECHT, A.; PERKINS-BARROW, A.; JENKINS, M. C.; DANFORTH, H. D. J. T. J. o. p. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. p. 262-271, 1997.
- BOIREAU, P.; VALLÉE, I.; ROMAN, T.; PERRET, C.; MINGYUAN, L.; GAMBLE, H. R.; GAJADHAR, A. *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. **Vet Parasitol**, 93, n. 3-4, p. 309-320, Dec 1 2000.
- DUBEY, J.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.; SPEER, C.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and humans**. CRC Press, 2015a. 1498710158.
- DUBEY, J.; STREITEL, R.; STROMBERG, P. C.; TOUSSANT, M. J. T. J. o. p. *Sarcocystis fayeri* sp. n. from the horse. p. 443-447, 1977.
- DUBEY, J. P.; VAN WILPE, E.; VERMA, S. K.; HILALI, M. Ultrastructure of *Sarcocystis bertrami* sarcocysts from a naturally infected donkey (*Equus asinus*) from Egypt. 2015b.
- DUPOUY-CAMET, J. [History of trichinellosis in the history of the catalog of the French National Library]. **Hist Sci Med**, 49, n. 3-4, p. 411-420, Jul-Dec 2015.
- FAYER, R.; ESPOSITO, D. H.; DUBEY, J. P. Human infections with *Sarcocystis* species. **Clin Microbiol Rev**, 28, n. 2, p. 295-311, Apr 2015.
- FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; STAMPER, S.; DONAHUE, J. M.; PATTERSON, J. S.; GAJADHAR, A. A.; MARTENIUK, J. V.; XIAOMIN, Z.; DUBEY, J. P. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **J Parasitol**, 81, n. 6, p. 916-919, Dec 1995.
- FISCHER, S.; ODENING, K. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. **J Parasitol**, 84, n. 1, p. 50-54, Feb 1998.
- GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **Int J Parasitol**, 43, n. 7, p. 579-591, Jun 2013.
- GJERDE, B. Molecular characterisation of *Sarcocystis rileyi* from a common eider (*Somateria mollissima*) in Norway. **Parasitol Res**, 113, n. 9, p. 3501-3509, Sep 2014a.
- GJERDE, B. *Sarcocystis* species in red deer revisited: with a re-description of two known species as *Sarcocystis elongata* n. sp. and *Sarcocystis truncata* n. sp. based on mitochondrial *cox1* sequences. **Parasitology**, 141, n. 3, p. 441-452, Mar 2014b.
- KAMATA, Y.; SAITO, M.; IRIKURA, D.; YAHATA, Y.; OHNISHI, T.; BESSHO, T.; INUI, T.; WATANABE, M.; SUGITA-KONISHI, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. **J Food Prot**, 77, n. 5, p. 814-819, May 2014.

- KIRMSE, P. Sarcosporidiosis in equines of Morocco. **Br Vet J**, 142, n. 1, p. 70-72, Jan-Feb 1986.
- LINDSAY, D. S.; MITCHELL, S. M.; VIANNA, M.; DUBEY, J. J. J. o. P. *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. 90, n. 3, p. 461-465, 2004.
- LORENZO, J. M.; SARRIÉS, M. V.; TATEO, A.; POLIDORI, P.; FRANCO, D.; LANZA, M. Carcass characteristics, meat quality and nutritional value of horsemeat: a review. **Meat Sci**, 96, n. 4, p. 1478-1488, Apr 2014.
- LUNDE, M. N.; FAYER, R. Serologic test for antibody to *Sarcocystis* in cattle. **J Parasitol**, 63, n. 2, p. 222-225, Apr 1977.
- MA, C. L.; YE, Y. L.; WEN, T.; HUANG, Z. M.; PAN, J.; HU, J. J.; TAO, J. P.; SONG, J. L. Prevalence and morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis bertrami* in horses in China. **Parasite**, 27, p. 1, 2020.
- MATUSCHKA, F. R. Infectivity of sarcocystis from donkey for horse via sporocysts from dogs. **Z Parasitenkd**, 69, n. 3, p. 299-304, 1983.
- MITCHELL, P. **The donkey in human history: an archaeological perspective**. Oxford University Press, 2018. 0198749236.
- MURRELL, K. D.; DJORDJEVIC, M.; CUPERLOVIC, K.; SOFRONIC, L.; SAVIC, M.; DJORDJEVIC, M.; DAMJANOVIC, S. Epidemiology of *Trichinella* infection in the horse: the risk from animal product feeding practices. **Vet Parasitol**, 123, n. 3-4, p. 223-233, Sep 2 2004.
- PORTELLA, L. P.; CADORE, G. C.; SANGIONI, L. A.; PELLEGRINI, L. F. V.; FIGHERA, R.; RAMOS, F.; VOGEL, F. S. F. J. R. B. d. P. V. Antibodies against Apicomplexa protozoa and absence sarcocysts in heart tissues from horses in southern Brazil. 26, p. 100-103, 2017.
- SALLES, P. d. A.; DE OLIVEIRA SOUSA, L.; BARBOSA, L. P.; GOMES, V. V. B.; DE MEDEIROS¹, G. R.; DE SOUSA, C. M.; WELLER, M. J. J. o. B. Analysis of the population of equidae in semiarid region of Paraíba. 4, n. 3, p. 269-275, 2013.
- SAVILLE, W. J.; DUBEY, J. P.; OGLESBEE, M. J.; SOFALY, C. D.; MARSH, A. E.; ELITSUR, E.; VIANNA, M. C.; LINDSAY, D. S.; REED, S. M. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. **J Parasitol**, 90, n. 6, p. 1487-1491, Dec 2004.
- VASHISHT, K.; LICHTENSTEIGER, C. A.; MILLER, L. A.; GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M. Naturally occurring *Sarcocystis neurona*-like infection in a dog with myositis. **Vet Parasitol**, 133, n. 1, p. 19-25, Oct 10 2005.
- ZENG, W.; SUN, L.; XIANG, Z.; LI, N.; ZHANG, J.; HE, Y.; LI, Q.; YANG, F.; SONG, J.; MORRIS, J.; ROSENTHAL, B. M.; SUN, L.; LIU, H.; YANG, Z. Morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis bertrami* from horses and donkeys in China. **Vet Parasitol**, 252, p. 89-94, Mar 15 2018.

6. CAPÍTULO 2: EXCREÇÃO DE *SARCOCYSTIS BERTRAMI* EM CÃES: BIOENSAIO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

6.1 RESUMO

MARQUES, C.D.P. Excreção de *Sarcocystis bertrami* em cães: bioensaio e caracterização morfológica e molecular 2021. p. 98, Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia.

Sarcocystis bertrami (sinônimo: *Sarcocystis fayeri*) é um parasito coccídeo pertencente ao filo Apicomplexa. Os cães são descritos como hospedeiros definitivos e os equinos como hospedeiros intermediários naturais. Quando os cães se alimentam com tecidos musculares de equinos contendo cistos de *S. bertrami*, ocorre a reprodução sexuada do parasito e excreção de oocistos e/ou esporocistos nas fezes. O presente estudo teve como objetivo a realização de um bioensaio em cães para analisar o padrão de excreção de *S. bertrami* nestes animais. Foram determinadas as características morfológicas e moleculares das formas parasitárias excretadas pelos cães. Para isso, utilizou-se três cães com idades entre 30 e 60 dias, os quais após a desmama, só haviam consumido ração comercial. Dois dos cães foram alimentados com fragmentos musculares de equinos, colhidos em frigorífico do Estado da Bahia, contendo cistos de *S. bertrami*, e um dos cães atuou como controle negativo. A oferta da carne equina foi realizada durante três dias consecutivos, cujo volume por animal correspondeu a 40g por dia, totalizando 120g por animal. Os dois animais que receberam os fragmentos musculares excretaram oocistos e/ou esporocistos do parasito. Os períodos pré-patentes e patentes foram 13 e 47 dias para o cão 1, e 23 e 14 dias para o cão 2. Os esporocistos continham quatro esporozoítos, grânulos residuais, e ausência do corpo de Stieda. Os esporocistos apresentaram tamanho médio de 14,2 x 10,0 µm. O longo período de patência observado em um dos cães (48 dias) contrasta com os dados até então observados na literatura, que descrevem períodos de patência mais curtos. A análise molecular foi realizada dos esporocistos eliminados pelos cães, utilizando como marcadores genéticos o 18S, ITS-1 e o gene mitocondrial COX-1. As sequências revelaram 100% de identidade/covarege com *Sarcocystis bertrami*.

Palavras-chave: Sarcocistose, canídeos, esporocistos.

6.2 ABSTRACT

MARQUES, C.D.P. Excretion of *Sarcocystis bertrami* in dogs: bioassay and morphological and molecular characterization. 2021. p.98, Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia.

Sarcocystis bertrami (synonym: *Sarcocystis fayeri*) is a coccidian parasite belonging to the phylum Apicomplexa. Dogs are described as definitive hosts and equines as natural intermediate hosts. Therefore, when dogs are fed with muscle tissue from equine that contains *S. bertrami* cysts, the parasite's sexual reproduction occurs and culminates with excretion of oocysts and/or sporocysts in canine feces. The present study aimed to perform a bioassay in dogs to analyze the excretion pattern of *S. bertrami* in dogs, its morphological and molecular characteristics, as well as the potential invasion of sporozoites in Vero and DH82 cells. For this purpose, three dogs with ages between 30 and 60 days and that were exclusively fed commercial dog food post-weaning were employed in the experiment. Two dogs were fed with equine muscle fragments, harvested from a slaughterhouse in the State of Bahia, containing cysts of *S. bertrami*, and a dog served as negative control. Equine meat offering was accomplished during three consecutive days, and the daily volume *per* dog corresponded to 40g, totalizing 120g *per* animal. The two animals who have received equine tissue fragments excreted oocysts and/or sporocysts of the parasite. Prepatent periods were 13 and 23 days. Patent periods were 14 and 48 days, Sporocysts had four sporozoites, residual granules and lack of Stieda body. Sporocysts showed average of 14.2 x 10.0 μ m. The long patent period observed in one of the dogs (48 days) contrasts with data noticed in literature that describes shorter patent periods.

Keywords: Sarcocystosis, canids, esporocystis

6.3 INTRODUÇÃO

A domesticação dos animais de companhia, dentre eles os cães (*Canis familiaris*) permitiram que esses animais se difundissem amplamente entre os seres humanos e vivessem em proximidade com outros animais de criação, garantindo um estreitamento dessas relações sociais. Atualmente, os cães exercem um importante papel na sociedade, seja em interações afetivas, ou auxiliando em atividades instrumentais, prestando algum tipo de serviço à sociedade (CATALA et al., 2019). No entanto, essas relações mais próximas favorecem o compartilhamento de determinados agentes biológicos, que podem, inclusive, ser prejudiciais à saúde humana, representando um fator de risco considerável à saúde pública.

Os cães são os hospedeiros definitivos (HD) conhecidos da espécie *Sarcocystis bertrami* (sinônimo *Sarcocystis fayeri*), sendo os equinos os hospedeiros intermediários (HI) naturais. *Sarcocystis* spp. são protozoários do filo Apicomplexa, que possuem um ciclo de vida do tipo presa-predador. Assim, os equinos se infectam por meio da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos e/ou esporocistos eliminados pelos cães, e dessa forma, ocorre a formação de sarcocistos na musculatura equina. Os cistos contendo bradizoítos são infectantes para os HD.

Diante da escassez de dados acerca de *S. bertrami* no Brasil, objetivou-se com o presente estudo realizar um bioensaio com cães para analisar o padrão de excreção do parasito, as características morfológicas e moleculares das formas parasitárias excretadas pelos cães.

6.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, registrado com o nº 81/2019.

6.4.1 Bioensaio com cães

Para a realização do bioensaio, foram utilizados três cães, obtidos de criadores comerciais, com idades entre quatro e oito semanas, mantidos em canis individualizados no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da

Bahia. Foram utilizados dois cães da raça Pinscher, da mesma ninhada, e um cão da raça Yorkshire, os quais, após o desmame, foram alimentados, exclusivamente com ração comercial para filhotes. Realizou exame físico, bem como avaliação coproparasitológica nos animais ao longo de três dias consecutivos, através da técnica de centrífugo-flutuação para confirmar a ausência de *Sarcocystis* spp. em suas fezes.

Dois cães (um Yorkshire – cão 01; e um Pinscher – cão 02) foram alimentados fragmentos musculares de equinos, colhidos em frigorífico do Estado da Bahia, contendo cistos de *S. bertrami*. O terceiro animal (controle negativo), recebeu ração comercial como placebo. A oferta da carne equina foi realizada durante três dias seguidos, em um volume de 40g por dia, totalizando 120g por animal. Os animais foram mantidos nos canis individuais ao longo de 58 dias.

Ao segundo dia após a administração da carne equina, foi iniciada a colheita das fezes dos três animais diariamente para a pesquisa de oocistos e/ou esporocistos. As fezes eram colhidas de forma individualizada em coletores universais, devidamente identificados, encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa de Protozoários Coccídios para a realização dos exames coproparasitológicos, em no máximo, 72 horas.

6.4.2 Análise das amostras fecais

A técnica de diagnóstico para a detecção de oocistos e/ou esporocistos nas fezes foi a centrífugo-flutuação em solução de sacarose (densidade =1,15g/mL). As amostras de fezes colhidas eram inicialmente identificadas e registrados os volumes totais de cada amostra. Posteriormente, fracionavam-se as amostras em 5 g de cada animal, que eram homogeneizadas com 12 mL de água destilada, e em seguida, filtradas em tãmis e centrifugadas em tubos de 15 mL. Caso necessário, o volume total do tubo era completado com água. A solução filtrada era centrifugada em temperatura ambiente a 1200 g por 10 minutos e com freio de desaceleração 3. Ao fim deste processo, o sobrenadante era removido com auxílio de uma bomba de sucção sob pressão mínima. Em seguida, a solução de sacarose era adicionada até um volume final de 14 mL, homogeneizando-a com o sedimento no tubo, e novamente realizada a centrifugação a 1200 g por 10 minutos (GONDIM et al., 2019). Ao fim deste processo, cerca de eram recolhidos 30 µl da região superficial da solução com o auxílio de uma alça descartável e adicionados a uma lâmina de microscopia recoberta

com lamínula. A leitura era realizada em microscópio óptico com aumento de pelo menos 200 x (DUBEY et al., 2015a).

6.4.3 Concentração, purificação, contagem e mensuração dos esporocistos

Para as amostras em que eram observados esporocistos e/ou oocistos, procedia-se com a recuperação de 5 mL do sobrenadante, transferindo a solução para um tubo de centrifuga de 50 mL e diluindo-a em água destilada 1:10 (DUBEY et al., 2015a). Para a remoção da solução de sacarose e concentração dos esporocistos, a amostra era centrifugada a 1600 g por 10 minutos com freio 1, e em seguida, realizadas três lavagens sucessivas com água destilada. O sedimento obtido era armazenado a 4 °C em solução comercial de antibiótico e antimicótico (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina, e 25 µg/mL de anfotericina B (GONDIM et al., 2019)

A contagem dos esporocistos foi realizada em hemocitômetro. Os esporocistos das amostras positivas foram avaliados morfometricamente (n=50), mensurando-se o seu comprimento e largura. As análises foram realizadas empregando-se um microscópio calibrado Nikon Eclipse Ci acoplado a uma câmera Nikon DS-Qi2 utilizando-se o software NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.).

6.4.4 Análise estatística

A análise estatística aplicada às mensurações dos esporocistos foi executada utilizando-se o software SPSS aplicando a análise descritiva, expressos como tamanhos médios, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e amplitudes de variação.

6.4.5 Extração do material genético

Para a análise molecular, a princípio, foi feito um pool de uma amostra dos esporocistos de cada animal do bioensaio. O DNA dos esporocistos de *Sarcocystis bertrami* dos cães foram obtidos utilizando-se um kit comercial de extração de DNA fecal (ZR Fecal DNA MiniPrep™, USA). O protocolo foi baseado nas recomendações do fabricante, porém, com pequenas modificações. Nas instruções do fabricante é

recomendada a utilização de 150 mg de fezes, entretanto, como os esporocistos já estavam isolados, optou-se por quantificar o número de esporocistos a serem processados. Assim, o DNA foi extraído de amostras de 150 µL de solução de antibiótico/antimicótico contendo entre 100 - 1.000 esporocistos. O produto final da extração foi suspenso no tampão de armazenamento do kit e mantido sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

6.4.6 Reação em cadeia de polimerase convencional

A análise do material genético foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase convencional (PCR). Para amplificação do DNA, foram selecionadas sequências do espaçador interno (ITS-1) (~1.038 pb) e do gene mitocondrial COX-1 (~1.060 pb). Um NESTED-PCR foi realizado para o gene 18S do rRNA.

As sequências genéticas dos primers utilizados estão disponíveis na tabela 2. As reações foram conduzidas utilizando-se um volume total de 50 µL, contendo 2 µL de cada par de primer (10pmol), 25 µL de mix comercial para PCR (Master Mix, Promega, Madison, WI), 2 µL do DNA teste e 19 µL de água (H₂O) ultrapura para PCR. As condições do termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) para a amplificação do DNA foram de acordo com (VERMA et al., 2016), consistindo em uma desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por um minuto), e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para o NESTED-PCR o ciclo para as reações de PCR foi efetuado em termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems (ABI) com o seguinte programa: (i) desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; (ii) desnaturação a 94°C por 30 segundos; (iii) hibridização dos primers a 56°C por 30 segundos; (iv) extensão a 72°C por 50 segundos. Foram realizados 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Como controle positivo da amostra, foi utilizado DNA de merozoítos de *S. neurona* SN-138 (LINDSAY et al., 2004), e água ultrapura como controle negativo (VERMA et al., 2016). A PCR do controle positivo foi desenvolvida apenas com os marcadores do gene 18S rRNA. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O SYBER Gold foi utilizado como marcador de DNA, e uma escada de 100 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) foi empregada para avaliar o

tamanho dos produtos amplificados. Alíquotas de 5 µL dos amplicons foram misturadas a 2 µL da solução de SYBER Gold e tampão (1:1), e depositados no gel de agarose imerso em tampão Tris-borato-EDTA (TBE). Após a eletroforese, pôde-se visualizar bandas com diferentes tamanhos moleculares com auxílio de um transiluminador com emissão ultravioleta.

Tabela 2: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação de DNA extraído de esporocistos excretados pelos cães.

Primer	Sequência	Região	Fonte
ITS1DF	CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC	ITS-1	(ŚLAPETA et al., 2002)
CT2c	CTGCAATTCACATTGCGTTTCGC		(SOARES et al., 2011)
18S9L	GGATAACCGTGGTAATTCTATG	18S	
18S1H	GGCAAATGCTTTCGCAGTAG		(LI et al., 2002)

6.4.7 Purificação dos amplicons

Os produtos obtidos com os ensaios de amplificação mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100pb DNA Ladder) foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Após a corrida eletroforética a 100V, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL) por 20 a 30 minutos e a visualização das bandas foi realizada por meio de transiluminação com luz ultravioleta (365nm).

6.4.8 Sequenciamento do material genético

O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos de PCR será realizado pelo método de Sanger com o emprego de didesoxinucleotídeos marcados com fluorescência, disponíveis no kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Thermofischer Scientific, em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser, Life Technologies, Applied Biosystems. Os cromatogramas serão analisados visualmente com auxílio do software FinchTV version 1.4.0. As sequências finais de cada marcador

(ITS-1 e 18S) serão comparadas como dado interrogante a outras disponíveis na plataforma NCBI *GenBank* através do Nucleotide BLAST (Blastn).

6.5 RESULTADOS

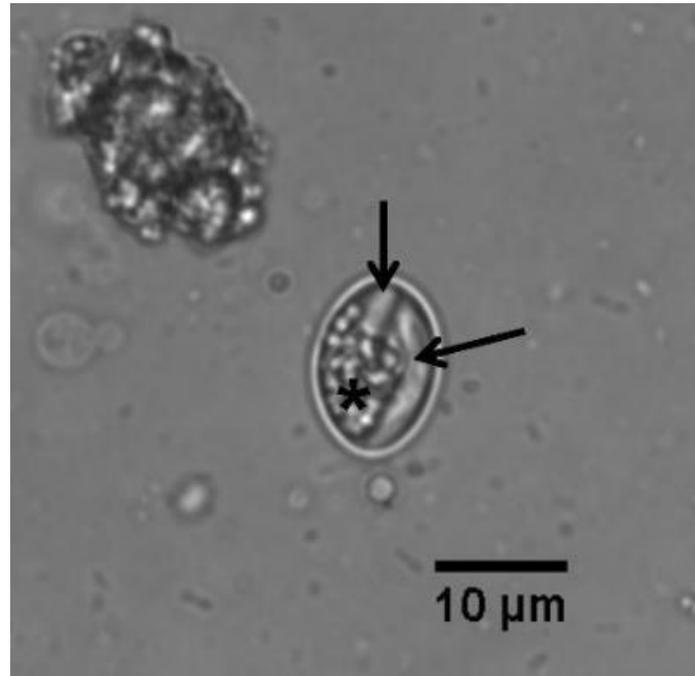
6.5.1 Bioensaio em cães

Os cães que receberam os fragmentos musculares de equinos contendo cistos de *S. bertrami* excretaram oocistos e/ou esporocistos após períodos pré-patentes de 13 e 23 dias. A infecção por *Sarcocystis* spp. foi confirmada por meio da técnica de centrifugo-flutuação. A aplicação da técnica foi iniciada ao segundo dia após a administração da carne infectada. Os dois animais que excretaram os parasitos apresentaram fezes amolecidas durante 10 dias (animal 01 - Yorkshire) e sete dias (animal 02 - Pinscher) após a ingestão de tecidos equinos.

No exame coproparasitológico para a identificação de *Sarcocystis* spp. levou-se em consideração a morfologia dos oocistos e/ou esporocistos, em que se observam oocistos com dois esporocistos, e cada esporocisto contendo quatro esporozoítos, grânulos residuais, e ausência do corpo de Stieda no seu interior (figura 12). Quando os oocistos e/ou esporocistos foram examinados microscopicamente empregando-se um comprimento de onda ultravioleta de 330-385 nm, eles apresentaram autofluorescência (figura 13).

Os cães foram mantidos em canis individualizados onde permaneceram após a inoculação durante um período de 58 dias, visto que um dos animais manteve a excreção de oocistos e/ou esporocistos por 47 dias. O volume total das fezes foi processado inteiramente a fim de se obter a máxima recuperação de esporocistos. O perfil de excreção foi bastante variável entre os dias e entre os animais inoculados. O cão 01 (Yorkshire) excretou em média $1,8 \times 10^3$ oocistos ou esporocistos/ μ L no período analisado, ao passo que o cão 02 (Pinscher) excretou em média $9,74 \times 10^2$ oocistos ou esporocistos/ μ L. No gráfico 1 e 2 estão exibidos os padrões de excreção dos animais 01 e 02, respectivamente. Ao longo dos dias de avaliação coproparasitológica não foi encontrado nenhum oocisto e/ou esporocistos no animal controle.

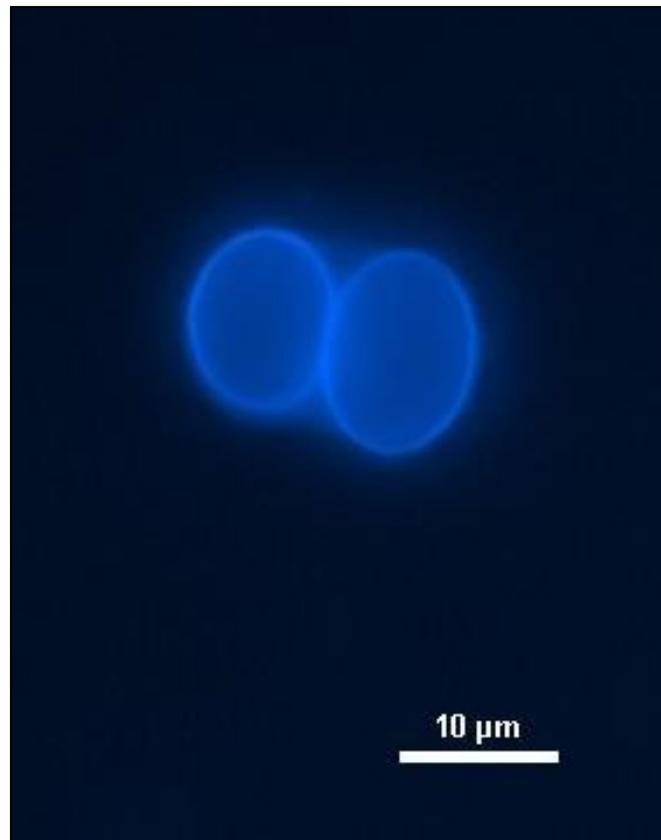
Figura 11: Esporocisto de *Sarcocystis* sp. excretado por um cão 01 do bioensaio. É possível notar esporozoítos (seta) bem definidos e um grânulo residual (*) em seu interior.



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

Para a morfometria foram mensurados 50 esporocistos de diferentes dias de excreção. Observou-se que os esporocistos apresentavam dimensões entre 12,78 - 15,28 ($14,19 \pm 0,53$) x 8,95 - 10,86 ($10,06 \pm 0,44$) μm (tabela 3).

Figura 12: Autofluorescência do oocisto eliminado pelo cão 01 com exposição a comprimento de onda de 359nm.



Fonte: ACERVO PESSOAL (2021).

Tabela 3: Morfometria dos esporocistos de *Sarcocystis* sp. excretados pelos cães em diferentes dias de eliminação (n=50).

	Largura (μm)	Comprimento (μm)
Média	10,06	14,19
Desvio Padrão	0,44	0,54
Valor mínimo	8,95	12,78
Valor máximo	10,86	15,28
Amplitude	1,91	2,5
IC (95%)	(9,94 – 10,19)	(14,04 – 14,34)

Gráfico 1: Padrão de excreção de oocistos e/ou esporocistos de *Sarcocystis bertrami* no animal 01 (Yorkshire).

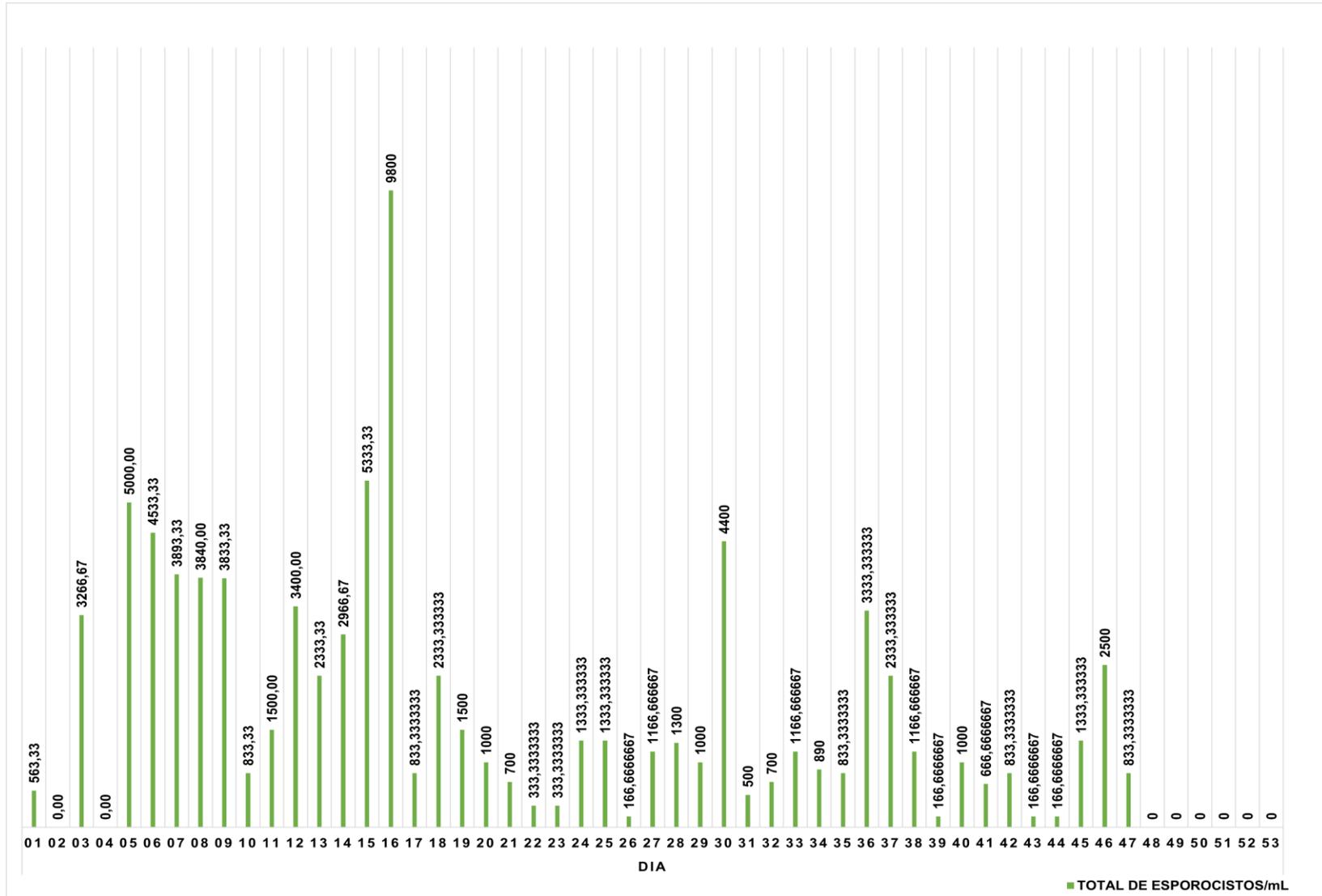
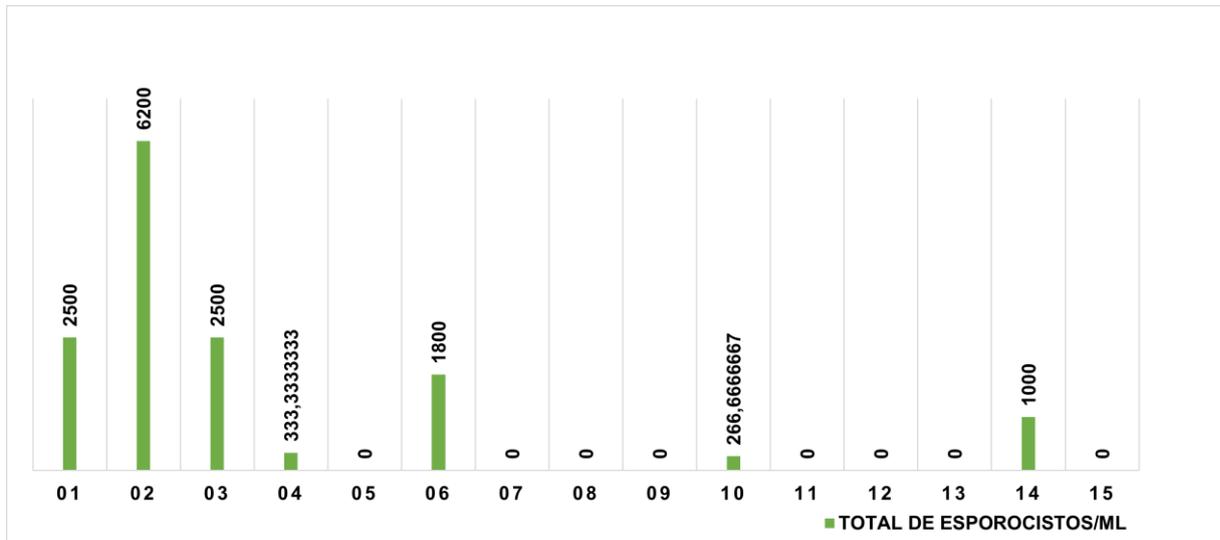


Gráfico 2: Padrão de excreção de oocistos e/ou esporocistos de *Sarcocystis bertrami* no animal 02 (Pinscher) durante os dias.



6.5.2 Análise molecular

A avaliação molecular foi realizada para um total de duas amostras (esporocistos excretados do animal 01 e do animal 02). A amplificação do DNA dos esporocistos foi através dos marcadores ITS-1 e 18S. Os amplicons obtidos apresentaram tamanho esperado na eletroforese, com banda de aproximadamente 800 – 900pb para 18S. A análise seguiu-se por meio da purificação do gel e envio da amostra para o sequenciamento do DNA. Com o resultado do sequenciamento, analisou-se os cromatogramas, os quais contribuíram para edição das sequências e obtenção das fitas consenso. As sequências consenso de cada marcador foram submetidas à busca por identidade no banco de dados do *Genbank*.

O sequenciamento do fragmento de ITS1 não foi bem sucedido porque houve a ocorrência de picos duplos, provavelmente devido a heterozigose de sequência alélica (cópias não idênticas de um mesmo alelo), por mistura de amostra (outra sequência concorrente no produto de PCR) ou por formação de estruturas secundárias que possam perturbar a reação de sequenciamento. Entretanto, a busca BLAST com estes segmentos curtos com qualidade aproveitável revelaram maior identidade com *Sarcocystis bertrami*, para as duas amostras. O sequenciamento dos produtos obtidos com primers 18S foram bem sucedidos para duas amostras. As sequências finais de 18S das amostras (total de 759 nucleotídeos sequenciados) foram idênticas à sequências homólogas de *Sarcocystis bertrami*.

6.6 DISCUSSÃO

Os cães têm sido associados como hospedeiros definitivos de pelo menos 21 espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 2015a; DUBEY, 2009). Geralmente, os cães infectados não apresentam sinais clínicos da sarcocistose, sendo, em sua maioria, infecções assintomáticas. No entanto, já foram descritos quadro de febre, linfopenia, trombocitopenia e miosite associados a dor generalizada e perda de massa muscular em cães infectados por *Sarcocystis* spp. (SYKES et al., 2011). Quadros mais severos, com o desenvolvimento de encefalite, hepatite e coccidiose generalizada foram descritos em filhotes de cães infectados com *Sarcocystis canis* (DUBEY e SPEER, 1991), assim como miosite já foi observada como consequência de infecção por *S. neurona* em um cão (VASHISHT et al., 2005).

De acordo com a literatura científica consultada, este parece ser o primeiro bioensaio na América do Sul em que cães são utilizados para a investigação de *Sarcocystis* sp. oriundo de equinos. A escolha de cães de raça de pequeno porte (Pinscher e Yorkshire) visou otimizar os espaços para a manutenção dos animais, assim como facilitar a doação dos cães após o término do experimento. Uma vez que o trabalho foi conduzido em uma cidade populosa e bastante verticalizada, o uso de cães maiores limitaria as possibilidades de adoção dos animais. Por outro lado, os autores têm consciência que cães de porte reduzido, consomem uma menor quantidade de tecidos contendo cistos parasitários, e como resultado, tendem a excretar quantidades menores de parasitos quando comparados a cães de maior porte.

No estudo corrente, verificou-se que os cães excretaram oocistos e/ou esporocistos após um período pré-patente variável entre os animais. A grande maioria das formas parasitárias excretadas correspondeu a esporocistos, porém, oocistos com paredes bastante finas eram eventualmente observados. Essa observação mais rara é dada a fragilidade existente na parede externa do oocisto que propicia o seu rompimento ainda no trato intestinal do hospedeiro (FAYER, 2004).

A primeira visualização das formas parasitárias ocorreu ao 13º dia após a ingestão de tecidos, ratificando a participação dos cães como hospedeiros definitivos de *S. bertrami*. Observou-se que 13 dias (Yorkshire) e sete dias (Pinscher) após administração dos fragmentos musculares os animais apresentaram alteração intestinal, sendo notado uma modificação na consistência das fezes, que passou a se

apresentar mais pastosa durante o período de cinco dias para o Pinscher e 10 dias para o Yorkshire. O quadro intestinal foi concorrente com a transição do período pré-patente (PPP) para o período patente (PP). Estudos indicam que o PPP é bastante variável de acordo com as espécies de *Sarcocystis*, ocorrendo entre sete e 14 dias (DUBEY et al., 2015a), como foi observado no estudo.

Em estudos prévios, o período de patência de *S. bertrami*/*S. fayeri* em cães identificado foi de 12 a 15 dias (DUBEY et al., 1977). Contudo, no presente trabalho, um dos cães excretou oocistos/espocistos por 47 dias, o que é muito superior aos resultados já encontrados. Os autores não acreditam que os isolados de *S. bertrami* brasileiros sejam tão distintos daqueles do resto do mundo, ao ponto de apresentarem períodos de patência mais longos. Cães e equinos são cosmopolitas e estão, historicamente, em trânsito contínuo entre os continentes, o que reduz as chances de grandes diferenças genéticas entre isolados de diferentes países. É provável que em experimentos anteriores, os cães não tenham sido examinados por períodos mais longos. PP longos já foram observados em outras espécies animais como serpentes e em humanos (FAYER et al., 2015; FAYER, 2004; JÄKEL, 1995).

Na análise morfométrica, 50 esporocistos foram mensurados, que apresentaram dimensões entre 12,78 – 15,28 ($14,19 \pm 0,53$) x 8,95 – 10,86 ($10,06 \pm 0,44$) μm , dessemelhantes aquelas relatadas por outros autores (DUBEY et al., 1977; HINAIDY E LOUPAL, 1982). O uso de microscópio de fluorescência para a confirmação de oocistos/espocistos nas amostras caninas foi bastante benéfico e favoreceu a observação da autofluorescência dos parasitos excretados. A emissão de comprimento de onda ultravioleta de 330-385 nm, promove uma autofluorescência nas paredes dos oocistos e/ou esporocistos que está associada a presença de proteínas ricas em tirosina que formam ditirosinas na parede dessas formas parasitárias, tornando a visualização mais fácil (BELLI et al., 2003; FRITZ et al., 2012).

As informações genéticas dos esporocistos excretados pelos cães foram obtidas por meio da PCR das amostras fecais dos animais do bioensaio. A amplificação do DNA foi realizada através dos marcadores ITS-1 e 18S demonstraram-se idênticas à sequências de *S. bertrami* no Genbank. Os estudos genéticos de *Sarcocystis* tem sido, em sua maioria, são direcionados a análises dos genes 18S rRNA e 28S rRNA que são regiões mais conservadas, de modo a dificultar a diferenciação de espécies muito próximas que compartilham morfologia ou hospedeiro (GJERDE, 2013). A utilização de marcadores como ITS-1 tem se mostrado

promissora, uma vez que possibilita inferências mais centradas na espécie de interesse. A análise baseada no uso associado desses marcadores visa reduzir possíveis variações genéticas intraespecíficas que possam surgir em uma análise realizada, exclusivamente, com o ITS-1 (GJERDE e JOSEFSEN, 2015).

Apesar do pequeno número de animais examinados, os resultados aqui observados apontam que cães são importantes disseminadores do parasito, pois são capazes de excretar parasitos em suas fezes por períodos longos, superiores a 30 dias. Apesar dos resultados observados, é necessário a realização de experimentos futuros na América do Sul, a fim de investigar possíveis diferenças entre os isolados sul-americanos do parasito e aqueles de outros continentes.

6.7 CONCLUSÕES

Os cães utilizados no experimento foram hospedeiros definitivos eficientes de *S. bertrami*, apesar da pequena quantidade de tecido equino ingerido, excretaram formas parasitárias do coccídio em um longo intervalo de tempo e não apresentaram alterações clínicas severas. O tempo de excreção observado no corrente estudo foi consideravelmente elevado comparado a outros estudos. No entanto, os animais de modo geral apresentaram uma baixa densidade de excreção de formas parasitárias ao longo do período de eliminação.

6.8 REFERÊNCIAS

BARTA, J. R.; MARTIN, D. S.; LIBERATOR, P. A.; DASHKEVICZ, M.; ANDERSON, J. W.; FEIGHNER, S. D.; ELBRECHT, A.; PERKINS-BARROW, A.; JENKINS, M. C.; DANFORTH, H. D. J. T. J. o. p. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. p. 262-271, 1997.

BARUTZKI, D.; SCHAPER, R. Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. **Parasitol Res**, 109 Suppl 1, p. S45-60, Aug 2011.

BELLI, S. I.; WALLACH, M. G.; LUXFORD, C.; DAVIES, M. J.; SMITH, N. C. Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and dityrosine- and 3,4-dihydroxyphenylalanine-mediated protein cross-linking in development of the oocyst wall in the coccidian parasite *Eimeria maxima*. **Eukaryot Cell**, 2, n. 3, p. 456-464, Jun 2003.

CATALA, A.; GRANDGEORGE, M.; SCHAFF, J. L.; COUSILLAS, H.; HAUSBERGER, M.; CATTET, J. Dogs demonstrate the existence of an epileptic seizure odour in humans. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 4103, Mar 28 2019.

DUBEY, J.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.; SPEER, C.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and humans**. CRC Press, 2015. 1498710158.

DUBEY, J. P. The evolution of the knowledge of cat and dog coccidia. **Parasitology**, 136, n. 12, p. 1469-1475, Oct 2009.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A. *Sarcocystis canis* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), the etiologic agent of generalized coccidiosis in dogs. **J Parasitol**, 77, n. 4, p. 522-527, Aug 1991.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; STAMPER, S.; DONAHUE, J. M.; PATTERSON, J. S.; GAJADHAR, A. A.; MARTENIUK, J. V.; XIAOMIN, Z.; DUBEY, J. P. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **J Parasitol**, 81, n. 6, p. 916-919, Dec 1995.

FISCHER, S.; ODENING, K. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. **J Parasitol**, 84, n. 1, p. 50-54, Feb 1998.

FRITZ, H. M.; BOWYER, P. W.; BOGYO, M.; CONRAD, P. A.; BOOTHROYD, J. C. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e29955, 2012.

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **Int J Parasitol**, 43, n. 7, p. 579-591, Jun 2013.

GONDIM, L. F. P.; SOARES, R. M.; TAVARES, A. S.; BORGES-SILVA, W.; DE JESUS, R. F.; LLANO, H. A. B.; GONDIM, L. Q. *Sarcocystis falcatula*-like derived from opossum in Northeastern Brazil: In vitro propagation in avian cells, molecular characterization and bioassay in birds. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, 10, p. 132-137, Dec 2019.

HINAIDY, H. K.; LOUPAL, G. [*Sarcocystis bertrami* Doflein, 1901, a sarcosporidia of the horse. *Equus caballus*]. **Zentralbl Veterinarmed B**, 29, n. 9, p. 681-701, Oct 1982.

MCCONNELL, A. R.; BROWN, C. M.; SHODA, T. M.; STAYTON, L. E.; MARTIN, C. E. Friends with benefits: on the positive consequences of pet ownership. **J Pers Soc Psychol**, 101, n. 6, p. 1239-1252, Dec 2011.

ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes Infect**, 4, n. 8, p. 867-873, Jul 2002.

SEVÁ, A. D. P.; PENA, H. F. J.; NAVA, A.; SOUSA, A. O.; HOLSBACK, L.; SOARES, R. M. Endoparasites in domestic animals surrounding an Atlantic Forest remnant, in São Paulo State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, 27, n. 1, p. 13-19, Jan-Mar 2018.

ŠLAPETA, Jan R. et al. Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colley, (1975) 1976 ssrDNA. **Parasitology research**, v. 88, p. 810-815, 2002.

SOARES, R. M., LOPES, E. G., KEID, L. B., SERCUNDES, M. K., MARTINS, J., & RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary parasitology**, 175(1-2), 168-172, Jan 2011.

SYKES, J. E.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, L. L.; PRATO, P.; LAPPIN, M. R.; GUO, L. T.; MIZISIN, A. P.; SHELTON, G. D. Severe myositis associated with *Sarcocystis* spp. infection in 2 dogs. **J Vet Intern Med**, 25, n. 6, p. 1277-1283, Nov-Dec 2011.

YANG, Z. Q., LI, Q. Q., ZUO, Y. X., CHEN, X. W., CHEN, Y. J., NIE, L., ... & ZHANG, Y. P. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 3-4, p. 212-217, 2002.

YASUMURA, Y. J. N. R. Studies on SV40 virus in tissue culture cell. 21, p. 1201-1215, 1963.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* nos equinos do estudo, destinados ao consumo humano, é bastante elevada. A microscopia de transmissão para avaliação ultraestrutural é uma técnica diagnóstica de grande importância para a identificação das espécies de *Sarcocystis*, no entanto a associação com a avaliação molecular torna o diagnóstico mais preciso. Este sendo o primeiro relato de *Sarcocystis bertrami* em equinos do Brasil traz informações valiosas acerca da infecção nos equinos do Brasil.

A realização do bioensaio e a caracterização morfológica e molecular dos esporocistos, permitiu uma complementação do estudo de frequência de infecção por *Sarcocystis bertrami* em equinos do Brasil. Possibilitando inferir que o cão é um hospedeiro de grande difusão, contribuindo para a disseminação de formas infectantes de *Sarcocystis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAN, M.; SHAPIRO, K.; SISÓ, S.; WILLIAMS, D. C.; REJMANEK, D.; AGUILAR, B.; CONRAD, P. A. Sarcocystis fayeri in skeletal muscle of horses with neuromuscular disease. **Neuromuscul Disord**, 26, n. 1, p. 85-93, Jan 2016.

ARIAS, M.; YEARGAN, M.; FRANCISCO, I.; DANGOUDOUBIYAM, S.; BECERRA, P.; FRANCISCO, R.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; HOWE, D. K. Exposure to Sarcocystis spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using Sarcocystis neurona merozoites as heterologous antigen. **Vet Parasitol**, 185, n. 2-4, p. 301-304, Apr 30 2012.

BENTZ, B. G.; EALEY, K. A.; MORROW, J.; CLAYPOOL, P. L.; SALIKI, J. T. Seroprevalence of antibodies to Sarcocystis neurona in equids residing in Oklahoma. **J Vet Diagn Invest**, 15, n. 6, p. 597-600, Nov 2003.

BENTZ, B. G.; GRANSTROM, D. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to Sarcocystis neurona in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. **J Am Vet Med Assoc**, 210, n. 4, p. 517-518, Feb 15 1997.

BOIREAU, P.; VALLÉE, I.; ROMAN, T.; PERRET, C.; MINGYUAN, L.; GAMBLE, H. R.; GAJADHAR, A. Trichinella in horses: a low frequency infection with high human risk. **Vet Parasitol**, 93, n. 3-4, p. 309-320, Dec 1 2000.

BORGES-SILVA, W.; DE JESUS, R. F.; FERREIRA, R.; GONDIM, L. F. P. Reactivity of Horse Sera to Antigens Derived From Sarcocystis falcatula-Like and Sarcocystis neurona. **Front Vet Sci**, 7, p. 573016, 2020.

BORJI, H.; PARANDEH, S. J. A. o. T. M.; PARASITOLOGY. The abattoir condemnation of meat because of parasitic infection, and its economic importance: results of a retrospective study in north–eastern Iran. 104, n. 8, p. 641-647, 2010.

CHEADLE, M. A.; TANHAUSER, S. M.; DAME, J. B.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P. E.; MACKAY, R. J.; GREINER, E. C. The nine-banded armadillo (Dasypus novemcinctus) is an intermediate host for Sarcocystis neurona. **Int J Parasitol**, 31, n. 4, p. 330-335, Apr 2001a.

CHEADLE, M. A.; YOWELL, C. A.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P. E.; MARSH, A. E.; MACKAY, R. J.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. The striped skunk (Mephitis

mephitis) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **Int J Parasitol**, 31, n. 8, p. 843-849, Jun 2001b.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Taxonomy and life cycles. *In: Coccidiosis of man and domestic animals*: CRC Press, 2019. p. 1-16.

DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B. The red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Vulpes lagopus*) are definitive hosts of *Sarcocystis alces* and *Sarcocystis hjorti* from moose (*Alces alces*). **Parasitology**, 137, n. 10, p. 1547-1557, Sep 2010.

DE LABASTIDA MEDINA, I. F. **Caballos de monte y carne de potro. Análisis antropológico de un proceso contemporáneo de construcción identitaria, cultural y económica en la Montaña Alavesa**. 2012. -, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

DOFLEIN, F. **Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger nach biologischen Gesichtspunkten dargestellt**. Fischer, 1901.

DUARTE, P. C.; DAFT, B. M.; CONRAD, P. A.; PACKHAM, A. E.; GARDNER, I. A. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **J Vet Diagn Invest**, 15, n. 1, p. 8-13, Jan 2003.

DUBEY, J.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.; SPEER, C.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and humans**. CRC Press, 2015a. 1498710158.

DUBEY, J.; DAVIS, S.; SPEER, C.; BOWMAN, D.; DE LAHUNTA, A.; GRANSTROM, D.; TOPPER, M.; HAMIR, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M. J. T. J. o. p. *Sarcocystis neurona* n. sp.(Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. p. 212-218, 1991.

DUBEY, J.; STREITEL, R.; STROMBERG, P. C.; TOUSSANT, M. J. T. J. o. p. *Sarcocystis fayeri* sp. n. from the horse. p. 443-447, 1977.

DUBEY, J. P.; HOWE, D. K.; FURR, M.; SAVILLE, W. J.; MARSH, A. E.; REED, S. M.; GRIGG, M. E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Vet Parasitol**, 209, n. 1-2, p. 1-42, Apr 15 2015b.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 215, n. 7, p. 970-972, 1999/10// 1999a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; FRITZ, D.; SPEER, C. A. Structure of *Sarcocystis neurona* sarcocysts. **J Parasitol**, 87, n. 6, p. 1323-1327, Dec 2001a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; ROSENTHAL, B. M. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Vet Parasitol**, 95, n. 2-4, p. 295-304, Feb 26 2001b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Vet Parasitol**, 95, n. 2-4, p. 89-131, Feb 26 2001c.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J.; LINDSAY, D. S.; STICH, R. W.; STANEK, J. F.; SPEERT, C. A.; ROSENTHAL, B. M.; NJOKU, C. J.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; REED, S. M. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. **J Parasitol**, 86, n. 6, p. 1276-1280, Dec 2000.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J.; STANEK, J. F.; LINDSAY, D. S.; ROSENTHAL, B. M.; OGLESBEE, M. J.; ROSYPAL, A. C.; NJOKU, C. J.; STICH, R. W.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; HAMIR, A. N.; REED, S. M. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Vet Parasitol**, 100, n. 3-4, p. 117-129, Oct 24 2001d.

DUBEY, J. P.; SPEER, C.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. CRC Press, Inc., 1989. 0849363640.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; MCKINNEY, J.; PECORARO, M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Vet Parasitol**, 86, n. 1, p. 59-62, Sep 15 1999b.

DUBEY, J. R.; ROSYPAL, A. C.; ROSENTHAL, B. M.; THOMAS, N. J.; LINDSAY, D. S.; STANEK, J. F.; REED, S. M.; SAVILLE, W. J. *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). **J Parasitol**, 87, n. 6, p. 1387-1393, Dec 2001e.

DUPOUY-CAMET, J. [History of trichinellosis in the history of the catalog of the French National Library]. **Hist Sci Med**, 49, n. 3-4, p. 411-420, Jul-Dec 2015.

EDWARDS, E. H. **La Enciclopedia del caballo**. Blume. 1998. (8480761725).

ELLISON, S. P.; OMARA-OPYENE, A. L.; YOWELL, C. A.; MARSH, A. E.; DAME, J. B. Molecular characterisation of a major 29 kDa surface antigen of *Sarcocystis neurona*. **Int J Parasitol**, 32, n. 2, p. 217-225, Feb 2002.

FAYER, R.; ESPOSITO, D. H.; DUBEY, J. P. Human infections with *Sarcocystis* species. **Clin Microbiol Rev**, 28, n. 2, p. 295-311, Apr 2015.

FAYER, R.; MAYHEW, I. G.; BAIRD, J. D.; DILL, S. G.; FOREMAN, J. H.; FOX, J. C.; HIGGINS, R. J.; REED, S. M.; RUOFF, W. W.; SWEENEY, R. W.; ET AL. Epidemiology of equine protozoal myeloencephalitis in North America based on histologically confirmed cases. A report. **J Vet Intern Med**, 4, n. 2, p. 54-57, Mar-Apr 1990.

FAYER, R. J. C. m. r. *Sarcocystis* spp. in human infections. 17, n. 4, p. 894-902, 2004.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; STAMPER, S.; DONAHUE, J. M.; PATTERSON, J. S.; GAJADHAR, A. A.; MARTENIUK, J. V.; XIAOMIN, Z.; DUBEY, J. P. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **J Parasitol**, 81, n. 6, p. 916-919, Dec 1995.

FUKUYO, M.; BATTSETSEG, G.; BYAMBAA, B. Prevalence of *Sarcocystis* infection in horses in Mongolia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 33, n. 4, p. 718-719, Dec 2002.

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **Int J Parasitol**, 43, n. 7, p. 579-591, Jun 2013.

GRANSTROM, D. E.; DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; FAYER, R.; FOX, J. C.; POONACHA, K. B.; GILES, R. C.; COMER, P. F. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **J Vet Diagn Invest**, 5, n. 1, p. 88-90, Jan 1993.

- GUNN, H. M.; FRAHER, J. P. Incidence of sarcocysts in skeletal muscles of horses. **Vet Parasitol**, 42, n. 1-2, p. 33-40, Apr 1992.
- HARADA, S.; FURUKAWA, M.; TOKUOKA, E.; MATSUMOTO, K.; YAHIRO, S.; MIYASAKA, J.; SAITO, M.; KAMATA, Y.; WATANABE, M.; IRIKURA, D.; MATSUMOTO, H.; SUGITA-KONISHI, Y. [Control of toxicity of *Sarcocystis fayeri* in horsemeat by freezing treatment and prevention of food poisoning caused by raw consumption of horsemeat]. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, 54, n. 3, p. 198-203, 2013.
- HEBERT, P. D.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Syst Biol**, 54, n. 5, p. 852-859, Oct 2005.
- HERD, H. R.; SULA, M. M.; STARKEY, L. A.; PANCIERA, R. J.; JOHNSON, E. M.; SNIDER, T. A.; HOLBROOK, T. C. *Sarcocystis fayeri*-Induced Granulomatous and Eosinophilic Myositis in 2 Related Horses. **Vet Pathol**, 52, n. 6, p. 1191-1194, Nov 2015.
- HINAIDY, H. K.; LOUPAL, G. [*Sarcocystis bertrami* Doflein, 1901, a sarcosporidia of the horse. *Equus caballus*]. **Zentralbl Veterinarmed B**, 29, n. 9, p. 681-701, Oct 1982.
- HINTZ, H. F. Thoughts about the history of horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 15, n. 8, p. 336-339, 1995/08/01/ 1995.
- HOANE, J. S.; MORROW, J. K.; SAVILLE, W. J.; DUBEY, J. P.; GRANSTROM, D. E.; HOWE, D. K. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. **Clin Diagn Lab Immunol**, 12, n. 9, p. 1050-1056, Sep 2005.
- HOWE, D. K.; GAJI, R. Y.; MARSH, A. E.; PATIL, B. A.; SAVILLE, W. J.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; GRANSTROM, D. E. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. **Int J Parasitol**, 38, n. 6, p. 623-631, May 2008.
- HOWE, D. K.; MACKAY, R. J.; REED, S. M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Vet Clin North Am Equine Pract**, 30, n. 3, p. 659-675, Dec 2014.
- KAMATA, Y.; SAITO, M.; IRIKURA, D.; YAHATA, Y.; OHNISHI, T.; BESSHO, T.; INUI, T.; WATANABE, M.; SUGITA-KONISHI, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in

raw horsemeat may be responsible for food poisoning. **J Food Prot**, 77, n. 5, p. 814-819, May 2014.

LEVINE, N. D. J. T. J. o. p. The taxonomy of *Sarcocystis* (protozoa, apicomplexa) species. p. 372-382, 1986.

LEWIS, S. R.; ELLISON, S. P.; DASCANIO, J. J.; LINDSAY, D. S.; GOGAL, R. M., Jr.; WERRE, S. R.; SURENDRAN, N.; BREEN, M. E.; HEID, B. M.; ANDREWS, F. M.; BUECHNER-MAXWELL, V. A.; WITONSKY, S. G. Effects of Experimental *Sarcocystis neurona*-Induced Infection on Immunity in an Equine Model. **J Vet Med**, 2014, p. 239495, 2014.

LIMA, R. A. d. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. a. d. C. J. P. E. U. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. 250, p. 347-351, 2006.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; BRAUND, K. G. J. B. M. J. *Sarcocystis* spp. and sarcocystosis. 5, n. 3, p. 249-254, 1995.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. **Vet Parasitol**, 95, n. 2-4, p. 179-186, Feb 26 2001.

LINDSAY, D. S.; MITCHELL, S. M.; VIANNA, M.; DUBEY, J. J. J. o. P. *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. 90, n. 3, p. 461-465, 2004.

LINDSAY, D. S.; MITCHELL, S. M.; YANG, J.; DUBEY, J. P.; GOGAL, R. M., Jr.; WITONSKY, S. G. Penetration of equine leukocytes by merozoites of *Sarcocystis neurona*. **Vet Parasitol**, 138, n. 3-4, p. 371-376, Jun 15 2006.

LINDSAY, D. S.; WEISS, L. M. **Opportunistic infections: Toxoplasma, sarcocystis, and microsporidia**. Springer Science & Business Media, 2004. 1402078145.

MANSFIELD, L.; MEHLER, S.; NELSON, K.; ELSHEIKHA, H.; MURPHY, A.; KNUST, B.; TANHAUSER, S.; GEARHART, P.; ROSSANO, M.; BOWMAN, D. J. V. p. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. 153, n. 1-2, p. 24-43, 2008.

MAYHEW, I.; DE LAHUNTA, A.; WHITLOCK, R.; POLLOCK, R., 1976, **Equine protozoal myeloencephalitis**. 107-114.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; JÄKEL, T.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. **Mol Biol Evol**, 17, n. 12, p. 1842-1853, Dec 2000.

MULLANEY, T.; MURPHY, A. J.; KIUPEL, M.; BELL, J. A.; ROSSANO, M. G.; MANSFIELD, L. S. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. **Vet Parasitol**, 133, n. 1, p. 27-36, Oct 10 2005.

PITEL, P. H.; LINDSAY, D. S.; CAURE, S.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; GARGALA, G.; MITCHELL, S. M.; HARY, C.; THULLIEZ, P.; FORTIER, G.; BALLEET, J. J. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. **Vet Parasitol**, 111, n. 1, p. 1-7, Jan 20 2003.

PITEL, P. H.; PRONOST, S.; GARGALA, G.; ANRIOUD, D.; TOQUET, M. P.; FOUCHER, N.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; FORTIER, G.; BALLEET, J. J. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **Int J Parasitol**, 32, n. 4, p. 481-485, Apr 2002.

POZIO, E.; CAPPELLI, O.; MARCHESI, L.; VALERI, P.; ROSSI, P. Third outbreak of trichinellosis caused by consumption of horse meat in Italy. **Ann Parasitol Hum Comp**, 63, n. 1, p. 48-53, 1988.

REED, S. M.; FURR, M.; HOWE, D. K.; JOHNSON, A. L.; MACKAY, R. J.; MORROW, J. K.; PUSTERLA, N.; WITONSKY, S. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **J Vet Intern Med**, 30, n. 2, p. 491-502, Mar-Apr 2016.

RIBEIRO, M. J.; ROSA, M. H.; BRUHN, F. R.; GARCIA ADE, M.; ROCHA, C. M.; GUIMARÃES, A. M. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, 25, n. 2, p. 142-150, Jun 7 2016.

ROMMEL, M.; GEISEL, O. [Studies on the incidence and life cycle of a sarcosporidian species of the horse (*Sarcocystis equicanis* n. spec)]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, 88, n. 24, p. 468-471, Dec 15 1975.

ROSSANO, M. G.; MANSFIELD, L. S.; KANEENE, J. B.; MURPHY, A. J.; BROWN, C. M.; SCHOTT, H. C., 2nd; FOX, J. C. Improvement of western blot test specificity for detecting equine serum antibodies to *Sarcocystis neurona*. **J Vet Diagn Invest**, 12, n. 1, p. 28-32, Jan 2000.

SAVILLE, W. J.; DUBEY, J. P.; OGLESBEE, M. J.; SOFALY, C. D.; MARSH, A. E.; ELITSUR, E.; VIANNA, M. C.; LINDSAY, D. S.; REED, S. M. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. **J Parasitol**, 90, n. 6, p. 1487-1491, Dec 2004.

SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; HINCHCLIFF, K. W.; KOHN, C. W.; WITTUM, T. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. **J Am Vet Med Assoc**, 210, n. 4, p. 519-524, Feb 15 1997.

SOUZA, L. G.; SEREIA, V. J. Exportações e competitividade do complexo de carne de eqüinos brasileira e paranaense no período 1990 a 2005. 2009.

SPEER, C.; DUBEY, J. J. V. p. Ultrastructure of schizonts and merozoites of *Sarcocystis neurona*. 95, n. 2-4, p. 263-271, 2001.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; MATTSON, D. E. Comparative development and merozoite production of two isolates of *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula* in cultured cells. **J Parasitol**, 86, n. 1, p. 25-32, Feb 2000.

TENTER, A. M. J. I. J. f. P. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. 25, n. 11, p. 1311-1330, 1995.

TILLOTSON, K.; MCCUE, P. M.; GRANSTROM, D. E.; DARGATZ, D. A.; SMITH, M. O.; TRAUB-DARGATZ, J. L. J. J. o. E. V. S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. 19, n. 2, p. 122-126, 1999.

TINLING, S.; CARDINET III, G.; BLYTHE, L.; COHEN, M.; VONDERFECHT, S. J. T. J. o. p. A light and electron microscopic study of sarcocysts in a horse. p. 458-465, 1980.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; SCHLIPF, J. W., Jr.; GRANSTROM, D. E.; INGRAM, J. T.; SHELTON, G. D.; GETZY, D. M.; LAPPIN, M. R.; BAKER, D. C. Multifocal myositis

associated with *Sarcocystis* sp in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, 205, n. 11, p. 1574-1576, Dec 1 1994.

VERMA, S.; LINDSAY, D.; GRIGG, M.; DUBEY, J. J. C. p. i. m. Isolation, culture and cryopreservation of *Sarcocystis* species. 45, n. 1, p. 20D. 21.21-20D. 21.27, 2017.

ZENG, W.; SUN, L.; XIANG, Z.; LI, N.; ZHANG, J.; HE, Y.; LI, Q.; YANG, F.; SONG, J.; MORRIS, J.; ROSENTHAL, B. M.; SUN, L.; LIU, H.; YANG, Z. Morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis bertrami* from horses and donkeys in China. **Vet Parasitol**, 252, p. 89-94, Mar 15 2018.

9. ANEXOS



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais
Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA
Fone: (071) 3283-6701/6702/6718
E-mail: ceua.ufba@hotmail.com

CERTIFICADO
ADITAMENTO/RENOVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Sarcocystis sp. em tecidos de equinos da Bahia: bioensaio, isolamento in vitro, caracterização molecular e sorológica", registrada com o nº 81/2019, sob a responsabilidade do(a) Prof. (a) Luis Fernando Pita Gondim, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSAO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em reunião de 04/11/2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Extensão
Vigência da autorização	04/11/2021 à 04/11/2023
Espécie/linhagem/raça	Equina e canina
Nº de animais	Cães: 5 Equídeos: 60
Peso/Idade	Cães: 10kg / < 2 anos Equídeos: >250kg / > 1 ano
Sexo	Ambos
Origem	Frigorífico Sudoeste (Itapetinga-BA) Frigorífico Cabrafort (Simões Filho -BA)

Salvador, 04 de Novembro de 2021


LÚCIO LEOPOLDO ARAGÃO DA SILVA
Coordenador CEUA/MEVZ