

## INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NA MICRORREGIÃO DE PELOTAS, RS, BRASIL - DADOS PRELIMINARES

JULIA SOMAVILLA LIGNON<sup>1</sup>; TAMIRES SILVA DOS SANTOS<sup>2</sup>; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS<sup>3</sup>; DIEGO MOSCARELLI PINTO<sup>4</sup>; FELIPE GERALDO PAPPEN<sup>5</sup>; FÁBIO RAPHAEL PASCOTI BRUHN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – julialignon@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – myres\_santos@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – dimoscarelli@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – felipepappen@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabio\_rpb@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Animais silvestres de vida livre hospedam uma grande variedade de parasitos, e os distúrbios que causam, estão entre as doenças infecciosas mais prevalentes e importantes na fauna silvestre (Mewius et al., 2021). As investigações sobre enfermidades são cruciais para a conservação destes animais. Ademais, são importantes porque algumas delas também podem acometer animais domésticos e, quando envolvem patógenos potencialmente zoonóticos, podem acometer os humanos (Mewius et al., 2021). O conhecimento sobre parasitos e o impacto causado por eles na vida silvestre ainda é considerado limitado, embora as pesquisas nesta área tenham aumentado nos últimos anos (Ramos et al., 2016; Santos et al., 2022; Benatti et al., 2023).

Protozoários do gênero *Sarcocystis* acometem diversos animais domésticos e silvestres (por exemplo: aves, répteis e mamíferos, incluindo o homem) e são caracterizados por possuírem um ciclo de vida de dois hospedeiros obrigatórios, onde sua transmissão é baseada em relações presa-predador. Os hospedeiros definitivos se infectam através da ingestão de tecidos contendo sarcocistos, que por sua vez, são encontrados em tecidos extra intestinais, principalmente músculos estriados, do hospedeiro intermediário (estágio assexuado). Este, torna-se infectado pela ingestão de oocistos esporulados ou esporocistos, os quais desenvolvem-se no intestino delgado do hospedeiro definitivo (estágio sexuado). Por vezes, hospedeiros definitivos também podem servir como hospedeiros intermediários para outras espécies de *Sarcocystis*, abrigando sarcocistos em sua musculatura (Dubey et al., 2016).

O número de espécies do gênero *Sarcocystis* está aumentando constantemente (Dubey et al., 2016) e atualmente existem aproximadamente 200 espécies válidas (Máca, 2020), embora, muitas delas não tenham seu ciclo completamente elucidado, incluindo a identificação de seus hospedeiros definitivos e/ou intermediários. Portanto, tivemos como objetivo realizar uma investigação epidemiológica e molecular de *Sarcocystis* spp. em mamíferos silvestres na microrregião de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Coleta de animais

Carcaças de animais silvestres mortos por atropelamento foram coletadas nas rodovias das cidades pertencentes a microrregião de Pelotas, no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas entre Agosto de 2022 e Agosto de 2023.

Optou-se, preferencialmente, por animais com vísceras preservadas e não expostas, com tempo estimado entre uma e sete horas. Os animais coletados foram embalados em sacos plásticos, etiquetados com espécie, sexo, data, cidade e local onde foram encontrados e transportados em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório do Grupo de Estudos em Enfermidades Parasitárias da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), onde foram necropsiados. Fragmentos dos tecidos como baço, fígado, rim, coração, pulmão, linfonodos, medula óssea e sangue de todos os animais foram amostrados e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises moleculares.

## 2.2. Extração de DNA e detecção molecular

As extrações de DNA foram realizadas com kits comerciais: PetNAD™ Nucleic Acid Co-Prep Kit para o sangue e ID Gene™ Spin Universal Extraction Kit para tecidos, segundo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV (Thermo Scientific NanoDrop Lite Spectrophotometer, Waltham, Massachusetts, USA), para avaliar a sua qualidade mediante mensuração de sua pureza (260 nm/280 nm), utilizando-se amostras variando de 1,8 a 2,2, e concentração em nanogramas por microlitros (ng/ $\mu\text{L}$ ), as quais foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da PCR. Ainda, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a integridade do material extraído. Para identificar a presença de DNA de *Sarcocystis* spp., a PCR foi realizada usando os seguintes primers: SARCO F (CGCAAATTACCCAATCCTGA 5'-3') e SARCO R (ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG 5'-3') amplificando um fragmento de aproximadamente 700 pb do gene 18S rRNA, segundo Ferreira et al. (2018). Nas reações, foram utilizados 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA (50 ng) e o mix contendo 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10mM), 2,5 $\mu\text{L}$  solução tampão (10X), 1,25  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ ), e 16,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, totalizando 25  $\mu\text{L}$ . As amplificações, em termociclador convencional, foram: desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos,  $54^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado o DNA de sarcocistos de *Sarcocystis gigantea* cedido gentilmente pelo Laboratório do Grupo de Estudos em Enfermidades Parasitárias da Universidade Federal de Pelotas. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura. Amostras em duplicata de cada fragmento de órgão coletado foram avaliadas. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualizados em luz ultravioleta. Utilizou-se o padrão de peso molecular de 100pb (*Ladder* 100 pb 500  $\mu\text{l}$ , Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

## 2.3. Considerações éticas

A coleta de animais silvestres atropelados foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informações sobre Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente sob matrícula nº 82632-3 e o projeto foi liberado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (processo nº 23110.046990/2022-02).

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram coletadas carcaças de 96 animais, incluindo: dois *Hydrochoerus hydrochaeris*, quatro *Leopardus geoffroyi*, 56 *Didelphis albiventris*, um *Procyon cancrivorus*, cinco *Cercopithecus thomasi*, um *Conepatus chinga*, um

*Lycalopex gymnocercus*, três *Mazama gouazoubira*, um *Euphractus sexcinctus*, dois *Dasybus novemcinctus*, 11 *Cavia aperea*, sete *Galictis cuja*, um *Myocastor coypus* e um *Coendou spinosus*. Produtos de 700 pb foram amplificados apenas nas amostras da musculatura cardíaca de *P. cancrivorus*. Esse é o primeiro registro da detecção molecular de *Sarcocystis* spp. na espécie animal.

Embora *P. cancrivorus* seja uma espécie pouco estudada, sabe-se que podem ser parasitados por diversos protozoários como *Babesia* e *Theileria* (Scheer et al., 2022), *Toxoplasma gondii* (Richini-Pereira et al., 2016), *Trypanosoma* (Rocha et al., 2013), *Leishmania* (Voltarelli et al., 2009) e *Hepatozoon* (Schneider, 1968). No entanto, praticamente nada se sabe sobre infecções por *Sarcocystis* nesta espécie, mesmo outros procionídeos (por exemplo, *Procyon lotor*) sendo apontados como hospedeiros definitivos para *S. cruzi*, *S. tarandivulpes*, *S. grueneri* e *S. miescheriana*, e intermediários para *S. neurona*, *S. kirkpatricki* e *S. lutrae* (Dubey et al., 2016; Máca, 2020).

Não há relatos deste protozoário em *P. cancrivorus* no mundo todo. No Brasil, pesquisas realizadas por Richini-Pereira et al. (2016) e Balbino et al. (2022), envolvendo a mesma metodologia, não detectaram a presença de *Sarcocystis* em mamíferos silvestres atropelados, incluindo *P. cancrivorus*, na região Centro-Oeste do estado de São Paulo e no estado do Paraná, respectivamente. Em contrapartida, *Sarcocystis* spp. foi detectado em *D. novemcinctus* (Richini-Pereira et al., 2016) e *M. gouazoubira* (Balbino et al., 2022).

*Procyon cancrivorus* apresenta uma grande adaptação a vários tipos de habitats e especificamente no Brasil, tem presença em todos os biomas (Michalski e Peres, 2005). É um animal muito caçado por sua pele e, de acordo com Rosenthal (2021), os caçadores desempenham papel importante na disseminação de espécies de *Sarcocystis*, incluindo as zoonóticas, pois o fornecimento de vísceras de animais abatidos aos animais domésticos (por exemplo, cães) e restos de carcaças descartados livremente no ambiente podem servir de alimento e transmitir o agente para as diversas espécies que habitam o local.

#### 4. CONCLUSÕES

Este é o primeiro registro da infecção muscular por *Sarcocystis* spp. em *P. cancrivorus*. Novos estudos moleculares envolvendo outros genes e o sequenciamento genético são importantes para identificação da espécie afim de elucidar a epidemiologia do protozoário estudado.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALBINO, L.S.; BERNARDES, J.C.; PASCHOAL, A.T.P. et al. Apicomplexa parasites in the brains of road-killed wild animals in the State of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.43, n.3, p.1365–1372, 2022.

BENATTI, D.; MORAES, M.F.D.; PACHECO, C.A.A. et al. Endoparasites of marsupials in fragments of the Atlantic rainforest, western Paraná State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.32, p.e005823, 2023.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M. et al. **Sarcocystosis of animals and humans**. Flórida: CRC Press, 2016.

FERREIRA, M.S.T.; VOGEL, F.S.F.; SANGIONI, L.A. et al. *Sarcocystis* species identification in cattle hearts destined to human consumption in southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.14, p. 94-98, 2018.

MÁCA, O. Molecular identification of *Sarcocystis lutrae* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, and the common raccoon, *Procyon lotor*, in the Czech Republic. **Parasites & Vectors**, v.13, n.231, p.1-5, 2020.

MEWIUS, A.; LUSA, E.R.; PERTILLE, J.G. et al. Endoparasites in group of wild animals raised in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.41, p.e06758, 2021.

MICHALSKI, F.; PERES, C.A. Anthropogenic determinants of primate and carnivore local extinctions in a fragmented forest landscape of southern Amazonia. **Biological Conservation**, v.124, n.3, p. 383-396, 2005.

RAMOS, D.G.S.; SANTOS, A.R.G.L.O.; FREITAS, L.C. et al. Endoparasites of wild animals from three biomes in the State of Mato Grosso, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.3, p.571-578, 2016.

RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; SILVA, R.C. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.5, 2016.

ROCHA, F.L.; ROQUE, A.L.R.; LIMA, J.S. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): At the top of the *T. cruzi* transmission chain. **PLoS ONE**, v.8, n.7, p.e67463, 2013.

ROSENTHAL, B.M. Zoonotic *Sarcocystis*. **Research in Veterinary Science**, v.136, p.151-157, 2021.

SANTOS, I.G.; BATISTA, A.I.V.; SILVA, W.S.I. et al. Gastrointestinal parasites in captive wild animals from two Brazilian Zoological Gardens. **Research, Society and Development**, v.11, p.e28411426637, 2022.

SCHEER, S.; MACEDO, M.R.P.; SOARES, T.A.L. et al. Molecular analysis on protozoa in wild mammals run over in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.1, p.7037–7046, 2022.

SCHNEIDER, C.R. *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961, in a Panamanian raccoon, *Procyon cancrivorus panamensis* (Goldman). **Revista de Biología Tropical**, v.15, p.123-135, 1968.

VOLTARELLI, E.M.; ARRAES, S.M.A.A.; PERLES, T.F. et al. Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n.9, p.732-744, 2009.