

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Toxoplasmose e alterações comportamentais: efeito na mortalidade de coelhos bravos (*Oryctolagus cuniculus*)

Nina Rita Sousa Pontes

MI 2026



Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto

Nina Rita Sousa Pontes

Toxoplasmose e alterações comportamentais: efeito na mortalidade de coelhos bravos

Área científica: *One Health*

Orientador: Professor Augusto Faustino

Co-orientadores: Doutor Nuno Santos e Doutor Saúl Jiménez Ruiz

Porto, 2026

Resumo

O presente relatório descreve um trabalho de investigação cujo principal objetivo foi avaliar a associação entre a infeção por *Toxoplasma gondii* e a mortalidade de coelhos bravos (*Oryctolagus cuniculus*), testando a hipótese de que as alterações comportamentais induzidas pelo parasita aumentam a suscetibilidade à predação e consequentemente, a mortalidade dos infetados. O *T. gondii* trata-se de um parasita zoonótico com distribuição ubíqua e elevada importância na medicina veterinária. Este estudo fundamenta-se em trabalhos de investigação e artigos onde se encontram descritas alterações comportamentais em vários hospedeiros intermediários do *T. gondii*, com um aumento de comportamentos considerados de risco que deixam os hospedeiros mais suscetíveis à predação. Deste modo, foi necessária a recolha de amostras sanguíneas de coelhos de 3 locais distintos (uns com exposição a predadores outros não), através de campanhas de captura. Nestas realizou-se a identificação individual dos animais e recolha de amostras. Posteriormente, foram selecionadas amostras de soro para deteção de anticorpos específicos, através do teste de aglutinação modificada para *T. gondii* (MAT). Os resultados obtidos foram analisados com recurso à aplicação R, através da interface Rstudio, que permitiu a implementação bayesiana de modelos multi-evento de captura-marcação-recaptura (MECMR), para estimar uma série de parâmetros como, por exemplo, a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico utilizado, a probabilidade de um animal transicionar de seropositivo para seronegativo e, essencialmente, a mortalidade de coelhos bravos seropositivos e seronegativos. Os resultados demonstraram, como foco principal, um aumento evidente da mortalidade de coelhos seropositivos em comparação com os seronegativos. Esta poderá ser justificada pelas alterações comportamentais ou por efeitos diretos da infeção parasitária na mortalidade dos animais, sendo que a distinção entre as duas hipóteses precisará de futura investigação.

Palavras-chave: coelho-bravo, toxoplasmose, mortalidade, modelos captura-recaptura, alterações comportamentais.

Atividades realizadas no estágio

O estágio desenvolveu-se em 3 componentes distintas: uma com enfoque na prática laboratorial, outra na componente teórica dedicada à pesquisa bibliográfica e análise de dados, e o trabalho de campo com as campanhas de captura.

A componente teórica teve início sob a orientação do coorientador, Doutor Nuno Santos, através da pesquisa bibliográfica para enquadramento científico do estudo e da discussão das diferentes abordagens metodológicas. Paralelamente, foi explorada a plataforma E-SURGE, considerada como uma das ferramentas para a realização da análise estatística dos dados obtidos.

O trabalho de campo, compreendeu duas semanas de campanha para captura de coelho-bravo, embora apenas uma tenha decorrido durante o período oficial do estágio. Cada campanha incluiu três noites em Mértola e três noites em Barrancos, tendo como objetivo a captura e processamento dos animais para recolher de amostras destinadas ao presente e a futuros estudos. Na campanha realizada entre 13 e 19 de março em Noudar foram efetuadas 69 capturas, de 56 indivíduos distintos e em Mértola 5 capturas de 5 coelhos distintos, na campanha realizada em março. Foi possível acompanhar todas as atividades de campo, incluindo manuseamento e contenção adequada dos coelhos-bravos, colheita de amostras de sangue, biópsias de pele, zaragatoas retais bem como o processamento e acondicionamento das respetivas amostras.

No Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO) procedeu-se à seleção, separação e preparação das amostras para posterior análise. Ao mesmo tempo, foi fornecido apoio para outros projetos que estavam em curso, nomeadamente na organização e preparação de câmaras para fotoarmadilhagem e na realização de ensaios ELISA *in house* para deteção de anticorpos contra o vírus da doença hemorrágica viral em 192 soros de coelhos bravos.

No mês de março iniciou-se uma estadia de 2 meses na Universidade de Córdoba (UCO) sob a orientação do Doutor Saúl Jiménez Ruiz. Durante este período foi integrado o trabalho desenvolvido no “*Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Zoonosis (GISAZ)*” pertencente ao departamento de “*Sanidad Animal da Faculdade de Medicina Veterinaria*” (FAVE) da Universidade de Córdoba (UCO) com a participação diária nas atividades laboratoriais e colaboração na execução dos testes diagnósticos necessários (figura 1 e figura 2). Foram realizados ensaios ELISA comerciais para deteção de anticorpos contra *Encephalitozoon cuniculi* (192 amostras de soro de coelho bravo), *Coxiella burnetii* (280 amostras de soro coelho bravo), Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo (390 amostras de soro de coelho bravo). Adicionalmente, assistiu-se a apresentações na universidade, uma sobre

patologias em cetáceos com discussão de três casos clínicos, outra a apresentação de uma tese doutoral, e à necrópsia de 2 cabritos (*Capra aegagrus hircus*) com recolha de amostras para análise laboratorial.

No âmbito da componente laboratorial, seguiu-se a análise das 789 amostras de soro previamente preparadas em Portugal, recorrendo ao MAT para deteção de anticorpos contra *T. gondii*.

Também nas atividades laboratoriais, realizou-se a extração de ADN de 60 amostras de baço de coelho-bravo para posterior deteção molecular de agentes patogénicos virais ou bacterianos, de acordo com o objetivo do projeto correspondente. As extrações foram efetuadas em grupos de 12 amostras ao longo de três dias.

A participação nestas atividades permitiu consolidar competências técnicas em diagnóstico laboratorial, processamento de amostras biológicas e metodologias aplicadas ao estudo de doenças infecciosas em fauna silvestre, bem como adquirir uma compreensão mais aprofundada das diferentes etapas envolvidas na conceção e desenvolvimento de projetos de investigação científica.

Ainda em Córdoba decorreu o acompanhamento de um dia de campo para a recolha de 40 cartões de memória câmaras de fotoarmadilhas instaladas num terreno privado, cujas imagens se destinam à monitorização da fauna selvagem no âmbito de um projeto sobre tuberculose.

No último mês de estágio, já em Portugal, procedeu-se à análise e interpretação estatística dos resultados utilizando uma plataforma que permite incorporar código para os modelo multi-evento com análise estatística bayesiana. Antes da construção do modelo final foi realizada uma análise exploratória dos dados em colaboração com o Doutor Nuno Santos, de modo a avaliar a estrutura dos dados, otimizar a parametrização dos modelos e obter a melhor convergência para os parâmetros estimados.

Extracurricularmente, para além de uma campanha de captura em janeiro, foi realizada uma estadia de 4 meses no Anicura - Hospital Veterinário de Santa Marinha com acompanhamento diário da casuística do hospital.

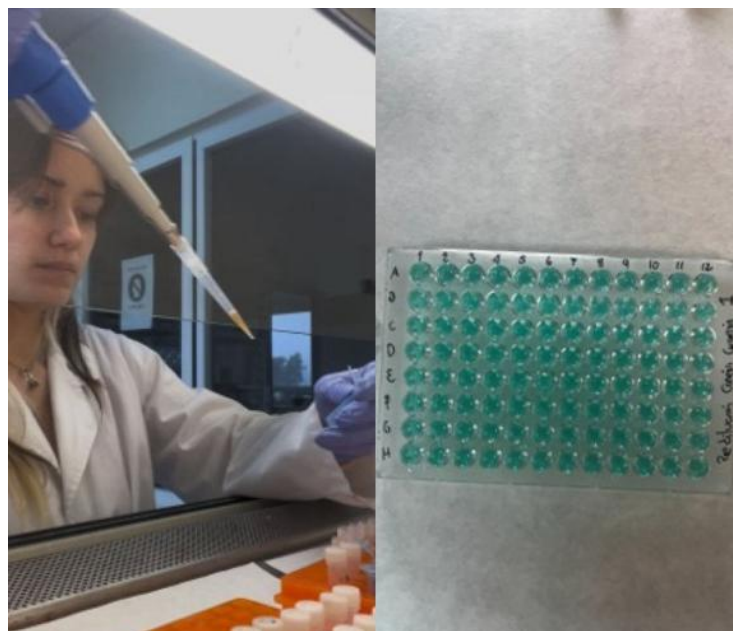


Figura 1. Atividades realizadas em estágio (1).

À esquerda: passagem do lisado celular para tubos eppendorf no processo de extração de DNA; À direita: placa de diluição para ELISA.

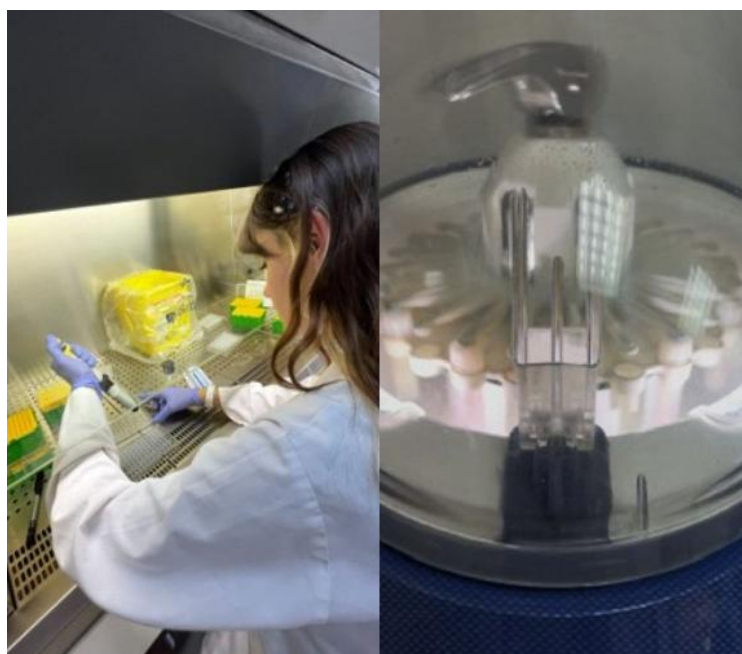


Figura 2. Atividades realizadas em estágio (2).

À esquerda: colocação da mistura de reagentes para MAT. À direita: máquina de ruptura celular e tecidual para extração de DNA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Doutor Nuno Santos por me ter permitido alargar os horizontes da medicina veterinária, por me mostrado que o curso pode ser muito mais do que tinha imaginado, e por me ter dado a conhecer todo o mundo da investigação, onde me sinto muito mais confortável. Obrigada pela calorosa integração no seu projeto, toda a disponibilidade, ajuda e tempo que me facultou para orientação da escrita desta tese, e principalmente todas as horas que me aturou em viagens de carro! Espero que seja apenas um início da nossa colaboração e que possa continuar com a sua mentoria nas próximas fases :).

Muchas gracias ao Doutor Saúl Jiménez Ruíz por toda a sua boa disposição e empenho com que mostrou o seu trabalho e me integrou na equipa. Obrigada a todo o pessoal do laboratório GISAZ da UCO, principalmente ao Doutor Ignacio García-Bocanegra por ter aceitado a minha estadia, por me terem recebido tão bem durante os dois meses que acabaram por passar demasiado rápido. Aprendi imenso sobre trabalho de laboratório, companheirismo e gastronomia!

Obrigada ao Miguel, à Laura e à Marta que tornaram Córdoba uma segunda casa.

Obrigada a toda a equipa de Noudar, principalmente à minha companheira de quarto constante a Mariana, que me deixaram à vontade para errar, explorar e aprender sobre o contacto com animais selvagens, algo por que ansiava há tanto tempo.

Muito obrigada ao meu orientador professor Augusto Faustino por ter sido a ponte para chegar ao meu estágio ideal e por me ter ajudado tanto na melhoria do meu trabalho final.

Obrigada a toda a família do amanhã ao Zé, à Mafalda, ao Martim, Gonçalo, Sara, Sofia e Gomes, e que saibam todos que isto é só um até já, nunca um adeus. Obrigada por terem sempre cedido às pressões para estudar em minha casa, para festas e saídas e espero que o continuem a fazer. Foi um prazer crescer e aprender com vocês e ficarei sempre apenas a uma chamada de distância com anseio de vos ver suceder em tudo o que escolherem fazer.

Obrigada à minha família que sempre me obrigou a seguir o que mais quisesse, por mais difícil ou diferente que fosse o caminho. Agradeço por sempre me fazerem sentir capaz de mais, por serem um exemplo para tudo o que quero alcançar e por me darem um desconto de vez em quando. Obrigada à minha irmã Sara por ter aturado tantas horas de queixumes ao longo dos 6 anos, em todos os sítios do mundo onde estive, e nunca, nem por um momento, ter falhado comigo. Espero que saibas que tento ser sempre o melhor por ti, por tudo o que já me mostraste que consigo ser. Obrigada a todos os meus avós, principalmente à minha avó Glória, por todo o carinho e amor com que me educaram também desde pequena e por acreditarem em mim mais do que qualquer pessoa.

Um beijo enorme com muitas festas para a Nara o Spot, Nisa e Spike as minhas maiores paixões.

Obrigada ao Rúben por ter tornado este último ano tão mais leve e belo. Sei que deve ter sido difícil todas as horas que passei ao computador, mas para mim foi muito mais fácil fazê-lo ao teu lado. Foste o melhor risco que tomei.

Obrigada a todos os meus amigos do campo Lindo, do coração, de sempre, ao Daniel (um agradecimento especial já que todos os dias me ouviu enquanto conduzia para casa depois de estar no hospital), à Rita, Bicas, Kika, Gabi, Sofia, Chico e Astride que estarão sempre lá para mim como estive e estarei para eles. A minha casa estará sempre de porta aberta para vocês, seja onde for e onde vocês estiverem. Que nunca nos falte São João, Natal e umas cervejas num café barato qualquer. Espero que acabemos a morar todos juntos algures se ainda houver paciência.

Obrigada aos amigos de Brno e um abraço para o lago!

Obrigada a todos os que me acompanharam ao longo destes anos, a todos com quem pude partilhar a minha vida e que me fizeram ir construindo a luz ao fundo do túnel. Na verdade, são várias, todas muito fortes, porque há sempre vários caminhos que posso escolher. No entanto aprendi que, um convosco será sempre o melhor.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Importância dos coelhos bravos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) nos ecossistemas.....	1
1.2 Toxoplasmose	2
1.2.1 Ciclo de vida	3
1.2.2 Zoonose.....	5
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> e alterações de comportamento.....	6
1.4 Objetivo do estudo.....	8
2. Materiais e métodos	9
2.1 Trabalho de campo.....	9
2.1.1 Processamento dos animais.....	9
2.2 Parte laboratorial	13
2.2.1 Processamento amostras sanguíneas	13
2.2.2 Seleção amostras para estudo.....	13
2.2.3 Teste de aglutinação modificada para <i>T. gondii</i> , MAT.....	14
2.2.3.1 Material necessário.....	15
2.2.3.2 Procedimento.....	16
2.2.3.3 Leitura dos resultados.....	17
2.2.3.4 Ocorrência técnicas durante a execução do ensaio.....	18
2.3 Análise de dados	18
2.3.1 Processos naturais	19
2.3.2 Processos observacionais	21
3. Resultados	24
3.1 Resultados descritivos.....	24
3.2 Resultados por modelo multiestado captura-recaptura.....	25
4. Discussão.....	28
5. Conclusão.....	31
Referências bibliográficas.....	32
Anexo.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Atividades realizadas em estágio (1).....	vi
Figura 2: Atividades realizadas em estágio (2).....	vi
Figura 3: Material de campo necessário para recolha de amostras.....	122
Figura 4: Medição do tarso	12
Figura 5: Contenção do coelho para recolha de amostras, neste caso medição da largura da cabeça.....	13
Figura 6: À esquerda - controlo positivo, à direita - controlo negativo	15
Figura 7: À esquerda - lupa para análise da placa MAT, centro – material necessário para preparação solução MAT, à direita – exemplo de placa pronta para incubação	166
Figura 8: Sensibilidade e especificidade por local de captura	26
Figura 9: Probabilidade de sobrevivência para seropositivos e seronegativos por local de captura ...	27
Figura 10: Probabilidades de transição entre estados por local de captura	27
Figura 11: <i>Trace plots</i> do modelo para os parâmetros avaliados em HR.....	36
Figura 12: <i>Trace plots</i> do modelo para os parâmetros avaliados em ND	36

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1: Método de titulação dos soros em resultados positivos ou duvidosos	17
Tabela 2: Matriz dos estados iniciais	20
Tabela 3: Matriz da sobrevivência	20
Tabela 4: Matriz da transição entre estados	21
Tabela 5: Matriz da probabilidade de deteção	21
Tabela 6: Matriz da probabilidade de testagem	22
Tabela 7: Matriz da sensibilidade e especificidade do método de diagnóstico.....	22
Tabela 8: Resultados por local de estudo.....	24
Tabela 9: Resultados por sexo e estatuto etário.....	25

ABREVIATURAS

ABD	Buffer de diluição do antígeno
CIBIO	Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
CL	Companhia das Lezírias
DHV	doença hemorrágica viral
FAVE	Sanidad Animal da Faculdade de Medicina Veterinaria
GISAZ	Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Zoonosis
HR	Herdade da Raposa
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IgG	imunoglobulinas G
IgM	imunoglobulinas M
IUCN	<i>International Union for the Conservation of Nature</i>
JAGS	<i>Just Another Gibbs Sampler</i>
M	Animal morto
MAT	Teste de Aglutinação Modificada para <i>T. gondii</i>
MECMR	Modelos multi-evento de captura-marcação-recaptura
mL	Militros
ND	Noudar
nt	Probabilidade de não ser testado
p	Probabilidade inicial de captura
PBS	Tampão fosfato-salino
piPos	Probabilidade de o estado inicial ser positivo
sd	Desvio padrão
T+	Seropositivo para <i>T. gondii</i>
T-	Seronegativo para <i>T. gondii</i>
UCO	Universidade Córdoba
WWF	World Wide Fund for Nature
ΔSp	Especificidade do teste de diagnóstico utilizado
ΔSe	Sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado
ϕNeg	Probabilidade aparente de sobrevivência dos animais seronegativos
ϕPos	Probabilidade aparente de sobrevivência dos animais seropositivos
ψNegPos	Probabilidade de transição de estado de seronegativo para seropositivo
ψPosNeg	Probabilidade de transição de estado de seropositivo para seronegativo
μL	microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*) nos ecossistemas

O coelho-bravo ou coelho-europeu é uma espécie pertencente à família *Leporidae* (em conjunto com as lebres (*Lepus spp.*). Acredita-se que tenha surgido no Pleistoceno Médio 82 800 a 355 000 anos, no sudoeste da Península Ibérica. Atualmente são reconhecidas duas subespécies o *O. c. cuniculus* e o *O. c. algirus*, sendo que esta última tem uma área de distribuição restrita à Península Ibérica e algumas ilhas (IUCN, 2018; Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

Nas últimas sete décadas, as populações de coelho-bravo sofreram um declínio superior a 90%, principalmente em consequência das alterações no uso do solo e da emergência de agentes infecciosos, sobretudo de origem viral. Como resultado deste acentuado decréscimo populacional, a espécie foi classificada, em 2018, pela *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN) como “ameaçada de extinção” (*endangered*) na sua área de distribuição natural na Península Ibérica (IUCN, 2018). As principais doenças que afetaram e afetam ainda a abundância de coelhos-bravos são a mixomatose e a doença hemorrágica viral (DHV). Para além disso, a intensificação das práticas agrícolas e o abandono da gestão tradicional do matagal provocaram alterações profundas no habitat da espécie, contribuindo igualmente para o seu declínio (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

O coelho-bravo é considerado uma espécie engenheira do ecossistema, desempenhando um papel fundamental na dinâmica dos ecossistemas mediterrâneos através de efeitos diretos e indiretos sobre o meio envolvente. A construção de tocas e a dispersão sementes resultante dos seus hábitos alimentares, contribuem para a modificação da paisagem, favorecendo a criação de áreas abertas e promovendo o aumento da diversidade da flora. Além disso, as tocas constituem também locais de abrigo para diversas espécies de vertebrados e invertebrados aumentando a complexidade estrutural e biodiversidade (Gálvez-Bravo *et al.*, 2011; Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

A dinâmica populacional desta espécie é influenciada por diversos fatores, incluindo as condições climáticas (temperatura, pluviosidade, vegetação), as características do solo (que por consequência condicionam a disponibilidade de locais para fazer ninhos), pressão da predação (de acordo com a densidade e diversidade de predadores) e, mais recentemente, pela ação de agentes patogénicos (Lees & Bell, 2008).

Para além das consequências diretas sobre a abundância do coelho-bravo, o declínio populacional afeta significativamente as espécies que dele dependem como principal recurso alimentar. Atualmente, mais de 40 espécies de aves e mamíferos incluem o coelho-bravo na sua dieta,

destacando-se o lince-ibérico (*Lynx pardinus*), águia imperial ibérica (*Aquila adalberti*), duas espécies emblemáticas do ecossistema mediterrâneo ibérico (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

Tanto o lince-ibérico como a águia imperial-ibérica encontram-se ameaçadas e são espécies endêmicas da Península Ibérica. No caso do primeiro cerca de 85% da dieta é constituída por coelho-bravo, razão pela qual esta espécie é considerada um predador especialista (Delibes-Mateos *et al.*, 2021). Como consequência desta elevada especialização alimentar, estima-se que apenas cerca de um terço da área da Península Ibérica apresente atualmente densidades de coelho-bravo suficientemente elevadas para suportar populações viáveis destes predadores de topo, evidenciando a estreita relação entre o estado de conservação do coelho-bravo e a conservação destas espécies ameaçadas. Assim, de modo a tentar evitar o desaparecimento destas espécies o coelho tem sido objeto de intensas ações de conservação na Península Ibérica (Ferrer & Negro, 2004; Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

As estratégias de gestão e conservação do coelho-bravo encontram-se descritas detalhadamente no projeto LIFE Iberconejo, uma iniciativa de âmbito ibérico coordenada pela *World Wide Fund for Nature* (WWF) Espanha, que envolve 15 entidades parceiras e conta com apoio financeiro da União Europeia (LIFE Iberconejo, 2022). Para além das ações de translocação, reforço e reintrodução de populações, têm sido implementadas diversas medidas destinadas a promover o sucesso reprodutivo e reduzir a mortalidade, nomeadamente através da recuperação e melhoria do habitat, através da recuperação e melhoria do habitat, da criação de zonas de refúgio, da instalação de estruturas de abrigo e do fornecimento suplementar de alimento, sempre que adequado (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços alcançados nas estratégias de conservação da espécie, o impacto potencial das alterações climáticas sobre a dinâmica populacional do coelho-bravo permanece insuficientemente conhecido, constituindo uma área prioritária para investigação futura (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

1.2 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada por *Toxoplasma gondii* um protozoário parasita intracelular obrigatório que é a única espécie do género *Toxoplasma* (Almeria *et al.*, 2021). O parasita foi descoberto em 1908, mas apenas a partir de 1939 é que se conheceu a sua importância a nível médico, enquanto a sua importância em Medicina Veterinária se tornou evidente sobretudo a partir da década de 1950, com especial destaque a partir de 1957 (Hasan *et al.*, 2024).

T. gondii apresenta um ciclo de vida com mais de um hospedeiro e é capaz de infetar praticamente todos os animais homeotérmicos, incluindo seres humanos, que atuam como

hospedeiros intermediários. Nestes hospedeiros ocorre a multiplicação assexuada do parasita, seguida da invasão e persistência em diversos tecidos (Almeria *et al.*, 2021).

Os felídeos, domésticos e selvagens, são os hospedeiros definitivos, sendo os únicos animais nos quais ocorre a fase sexuada do ciclo de vida. Como resultado desta reprodução, são produzidos oocistos que são eliminados nas fezes e libertados para o ambiente. Após esporulação, os oocistos passam a conter esporozoítos, uma das formas infetantes do parasita (Farhab *et al.*, 2025; Hasan *et al.*, 2024). A reprodução ocorre exclusivamente nos felídeos devido à ausência da enzima delta-6-desaturase no intestino delgado. Esta característica metabólica conduz à acumulação de ácido linoleico, criando um ambiente favorável ao desenvolvimento da fase sexuada do parasita (Farhab *et al.*, 2025). Na maioria dos hospedeiros intermediários, a infeção evolui para uma fase crónica, durante a qual o *T. gondii* permanece em estado latente sob a forma de quistos tecidulares, podendo persistir durante toda a vida do hospedeiro (Farhab *et al.*, 2025).

1.2.1 Ciclo de vida

A infeção por *T. gondii* ocorre, nos hospedeiros intermediários, após ingestão de quistos tecidulares presentes em carne contaminada, particularmente em animais carnívoros, ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados, uma via de transmissão comum a todos os animais homeotérmicos (Almeria *et al.*, 2021).

Os oocistos desempenham um papel central na epidemiologia da toxoplasmose, uma vez que, após esporulação no ambiente, tornam-se infetantes para qualquer hospedeiro intermédio. A sua disseminação pode ocorrer por ação da chuva e do vento, bem como através do transporte mecânico por diversos invertebrados, incluindo baratas (*Blattodea* spp.), minhocas (*Oligochaeta* spp.) ou moscas (*Diptera* spp) (Hasan *et al.*, 2024). Após a ingestão, os bradizoítos, provenientes dos quistos tecidulares, e os esporozoítos, libertados dos oocistos esporulados, invadem o epitélio intestinal, onde iniciam a infeção. Posteriormente, diferenciam-se em taquizoítos, a forma de multiplicação rápida do parasita, que se dissemina para diversos órgãos através da circulação sanguínea e sistema linfático. Nos tecidos alvo, os taquizoítos multiplicam-se intracelularmente, provocando lise celular, necrose e inflamação. Em animais jovens ou imunocomprometidos, esta fase pode evoluir para toxoplasmose disseminada e, em casos graves, resultar em morte (Almeria *et al.*, 2021).

Em hospedeiros imunocompetentes, o controlo da infeção depende predominantemente da resposta imunitária celular, mediada por citocinas, que envolve a ativação de macrófagos, a produção de interferão gama (IFN- γ), a resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos e a produção de anticorpos específicos. Os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel essencial na eliminação de células infetadas, contribuindo para a limitação da disseminação do parasita (Almeria *et al.*, 2021; Farhab *et*

al., 2025). A resposta humoral caracteriza-se inicialmente pela produção de imunoglobulinas M (IgM), detetáveis desde a primeira semana após a infeção e que podem persistir durante períodos variáveis, desde alguns meses até, ocasionalmente, vários anos. Posteriormente, ocorre a produção de imunoglobulinas G (IgG), que permanecem detetáveis durante toda a vida do hospedeiro, constituindo um marcador de exposição prévia do parasita (Farhab *et al.*, 2025).

À medida que a resposta imunitária controla a fase aguda da infeção, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, originando quistos tecidulares que caracterizam a fase crónica da doença. Estes quistos formam-se preferencialmente em neurónios no sistema nervoso central, mas igualmente no músculo esquelético, miocárdio, diafragma, língua, fígado e outros tecidos. Assim, *T. gondii* é considerado um agente patogénico predominantemente neurotrópico, apresentando elevada afinidade pelo sistema nervoso central. O parasita é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, onde estabelece infeções persistentes através da formação de quistos contendo bradizoítos. Consequentemente, a resposta imunitária do hospedeiro não é capaz de erradicar completamente o parasita, permitindo a persistência de quistos viáveis durante vários anos, ou, muito provavelmente, ao longo de toda a vida do hospedeiro. (Almeria *et al.*, 2021; Daher *et al.*, 2021).

Nos felídeos, hospedeiros definitivos, a reprodução sexuada ocorre no epitélio do intestino delgado, culminando na produção de oocistos não esporulados que são eliminados pelas fezes. Apesar da eliminação de grandes quantidades de oocistos, a doença clínica é pouco frequente nestes animais. Em condições experimentais foram descritos casos de enterite, linfadenomegalia, pneumonia e lesões degenerativas do sistema nervoso central. Após serem excretados, os oocistos esporulam no ambiente, tornando-se infetantes para os hospedeiros intermediários (Tong *et al.*, 2021).

Entre os predadores considerados no presente estudo destaca-se o lince ibérico, espécie para a qual foi descrita, em Espanha, uma seroprevalência de 62,8% (IC 95%: 54,20 – 70,70%) para anticorpos contra *T. gondii*, determinada através do MAT (García-Bocanegra *et al.*, 2010).

As complicações associadas à infeção por *T. gondii* variam consideravelmente entre espécies de hospedeiros intermediários. Algumas espécies como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), apresentam elevada resistência, desenvolvendo habitualmente infeções crónicas subclínicas e funcionando como importantes reservatórios do parasita. Outras espécies, como os cervídeos (*Cervidae spp.*), são consideradas moderadamente suscetíveis e podem sobreviver à fase aguda da infeção. Em contraste, os lagomorfos, incluindo o coelho-bravo, apresentam elevada suscetibilidade, podendo desenvolver doença aguda fatal, com ou sem apresentação diarreica. Nestes animais é frequente observar-se necrose multifocal, particularmente no fígado e no baço, associada à intensa multiplicação de taquizoítos (Farhab *et al.*, 2025).

1.2.2 Zoonose

A toxoplasmose é uma das doenças parasitárias de origem alimentar/hídrica com maior impacto na saúde pública mundial. Estima-se que cerca de um terço da população humana tenha sido exposta a *T. gondii*, embora a seroprevalência varie consideravelmente em regiões específicas. Os valores mais elevados são observados em África, depois Oceânia, América do Sul e Europa, enquanto América do Norte e Ásia, apresentam as prevalências mais reduzidas (Farhab *et al.*, 2025). A infeção por este parasita é considerada a zoonose parasitária mais prevalente a nível mundial, representando um importante problema de saúde pública devido à sua elevada distribuição, diversidade de vias de transmissão e potencial gravidade em grupos de risco (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2018).

Nos seres humanos a principal via de transmissão consiste na ingestão de carne crua ou mal cozinhada contendo quistos tecidulares viáveis. A infeção pode também ocorrer pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados, por transmissão transplacentárias durante a gravidez, ou, menos frequentemente, através da ingestão acidental de oocistos presentes no ambiente (Farhab *et al.*, 2025). Certos grupos apresentam um risco acrescido de exposição ao parasita. Destacam-se os caçadores que se podem infetar durante a evisceração e manipulação dos animais selvagens infetados, caso não sejam adotadas medidas adequadas de higiene e proteção individual (Almeria *et al.*, 2021).

Apesar da importância clínica e epidemiológica da toxoplasmose, ainda não existe uma vacina eficaz para humanos, situação que se deve à complexidade biológica e imunológica do *T. gondii* (Farhab *et al.*, 2025).

A maioria das infeções em indivíduos imunocompetentes é assintomática ou manifesta-se por sinais clínicos ligeiros. Contudo, em indivíduos imunocomprometidos e em mulheres grávidas, a infeção pode originar formas clínicas graves, incluindo encefalite, coriorretinite e toxoplasmose congénita com potenciais consequências para o desenvolvimento fetal (Farhab *et al.*, 2025). Quanto aos sinais clínicos, a infeção pode manifestar-se por sinais inespecíficos como febre, cefaleias, fadiga e linfadenopatia (Farhab *et al.*, 2025). Adicionalmente, diversos estudos sugerem uma associação entre a infeção crónica por *T. gondii* e um risco aumentado de desenvolvimento de determinadas patologias neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, incluindo esquizofrenia, doença de Alzheimer e perturbações do espectro do autismo. Contudo, esta associação continua a ser objeto de investigação (Farhab *et al.*, 2025).

Na toxoplasmose congénita, as manifestações clínicas dependem do momento da gestação em que ocorre a infeção materna primária. Quando a infeção ocorre antes da conceção, mais de 3 meses antes da gravidez, o risco é reduzido ou inexistente. Em contraste, a infeção adquirida durante

o primeiro trimestre está associada a menor taxa de transmissão, mas a consequências mais graves, incluindo aborto espontâneo, morte fetal e alterações neurológicas severas. No terceiro trimestre, a probabilidade de transmissão vertical é superior, contudo, os recém-nascidos apresentam frequentemente ausências de sinais clínicos ao nascimento, embora possam desenvolver manifestações tardias, como lesões oculares e alterações neurológicas (Farhab *et al.*, 2025).

1.3 *Toxoplasma gondii* e alterações de comportamento

Diversos estudos têm descrito alterações comportamentais em hospedeiros infectados por *T. gondii*, constituindo este fenómeno um dos principais fundamentos científicos para o desenvolvimento deste presente trabalho.

Estas alterações são observadas sobretudo durante a fase crónica e estão associadas a um fenómeno que recebeu o nome de “manipulação do comportamento do hospedeiro” ou “hipótese da manipulação”. Esta hipótese propõe que o parasita é capaz de modificar o comportamento dos hospedeiros intermediários de forma a aumentar a probabilidade de predação por felídeos, os seus hospedeiros definitivos, favorecendo assim a conclusão do ciclo biológico e a reprodução sexuada do parasita (Da Silva & Langoni, 2009).

Um dos exemplos mais bem documentados desta hipótese foi descrito por Berdoy *et al.* (2000). Neste estudo, ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*) não infectados com *T. gondii* evitaram consistentemente áreas contendo urina de gato, exibindo simultaneamente um aumento da vigilância, resposta de stress e diminuição da percepção da dor, comportamentos compatíveis com uma resposta inata à presença de um predador. Em contraste, os ratos cronicamente infectados por *T. gondii* deixaram de evitar as áreas contendo urina de gato, verificando-se, em alguns indivíduos, uma aparente atração pelo odor. Estes resultados parecem indicar que a infeção interfere especificamente com a resposta inata de aversão aos felídeos, um comportamento que normalmente se mantém mesmo após sucessivas gerações de ratos de laboratório sem contacto com predadores.

A nível do hospedeiro intermediário temos um exemplo claro. Um estudo realizado em por M. Berdoy *et al.* (2000) demonstra que quando ratos de laboratório (*Ratus norvegicus*) são colocados em caixas com algumas gotas de urina de gato estes normalmente evitam o canto/local com esta secreção. Os animais ficam também mais stressados, aumentam a vigilância e diminuem a capacidade de sentir dor ao percecionar o cheiro de um dos seus predadores (Berdoy *et al.*, 2000; Da Silva & Langoni, 2009). Esta alteração comportamental poderá representar uma vantagem adaptativa para o parasita, uma vez que aumenta a probabilidade de o hospedeiro intermediário ser predado por um felídeo, permitindo que *T. gondii* complete a fase sexuada do seu ciclo de vida no intestino do hospedeiro definitivo (Da Silva & Langoni, 2009). Para além da perda de aversão ao odor de felídeos, foi igualmente

descrita uma diminuição dos comportamentos neofóbicos, maior atividade de exploração e maior propensão para assumir comportamentos de risco, tornando-se assim mais suscetíveis à predação (Berdoy *et al.*, 2000; Da Silva & Langoni, 2009).

Alterações comportamentais associadas à infecção por *T. gondii* foram também descritas noutras espécies. Em lontras-marinhas (*Enhydra lutris nereis*), verificou-se que indivíduos infetados apresentavam menor capacidade de evita ataques de tubarões e exibiam padrões de movimento considerados anormais, fatores que poderão aumentar a vulnerabilidade destes animais à predação (Kreuder, 2003; Da Silva & Langoni, 2009).

Resultados semelhantes foram descritos em lobos (*Canis lupus*) no Parque Nacional de Yellowstone, Estados Unidos. Meyer *et al.* (2022) investigaram a influência da infecção por *T. gondii* na interação entre lobos e pumas (*Puma concolor*), considerando o lobo o hospedeiro intermediário e o puma o hospedeiro definitivo. Os autores observaram que os lobos, mesmo não sendo presas naturais dos pumas, que eram provenientes de áreas com elevada densidade de pumas apresentavam uma probabilidade três vezes superior de serem seropositivos para *T. gondii* quando comparados com animais provenientes de áreas com uma menor densidade de felídeos. Além disso, verificou-se que a seropositividade era mais frequente em lobos considerados dispersantes, caracterizados por percorrerem maiores distâncias e assumirem comportamentos mais exploratórios. Os indivíduos seropositivos apresentavam igualmente uma probabilidade significativamente superior (42 vezes mais) de se tornarem líderes de alcateia, sugerindo uma possível associação entre a infecção e o aumento da audácia e da propensão para assumir riscos (Meyer *et al.*, 2022). Os autores sugerem que estas alterações comportamentais poderão aumentar a sobreposição espacial entre lobos e pumas, favorecendo a transmissão de *T. gondii* aos hospedeiros definitivos e contribuindo para a manutenção do ciclo de vida. Estes resultados ilustram o potencial impacto que uma infecção parasitárias poderá exercer sobre o comportamento individual, e, eventualmente, sobre a organização social e a dinâmica populacional de mamíferos selvagens (Meyer *et al.*, 2022).

Em seres humanos, diversos estudos têm igualmente investigado a possível associação entre a infecção crónica por *T. gondii* e alterações comportamentais ou neuropsiquiátricas. Uma revisão sistemática concluiu que existe evidência de associação entre a seropositividade para *T. gondii* e um maior risco de desenvolvimento de determinadas patologias psiquiátricas, nomeadamente esquizofrenia. Contudo, a interpretação destes resultados permanece limitada pela natureza multifatorial de comportamento humano e pelas dificuldades metodológicas inerentes a este tipo de investigação (Martinez *et al.*, 2018). Outros estudos sugerem que a toxoplasmose crónica poderá estar associada a alterações cognitivas, perda de performance psicomotora, aumento da ansiedade e maior propensão para comportamentos de risco. No entanto, os mecanismos responsáveis por estas

alterações permanecem incompletamente esclarecidos e a evidência atualmente disponível continua a ser insuficiente para estabelecer uma relação causal (Da Silva & Langoni, 2009; Milne *et al.*, 2020).

Relativamente aos mecanismos biológicos subjacentes à manipulação comportamental, têm sido propostas diversas hipóteses. Por exemplo, não foi ainda confirmado se as alterações comportamentais são específicas da resposta aos odores de felídeos, não se estendendo necessariamente a outros predadores que não participam no ciclo biológico do parasita (Tong *et al.*, 2021). Outros autores defendem a hipótese de um efeito sindrómico, segundo a qual a infeção induz a diminuição generalizada dos comportamentos defensivos, traduzindo-se num aumento da atividade exploratória, impulsividade e propensão para assumir riscos, independentemente da presença de felídeos (Tong *et al.*, 2021).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos continuam a ser objeto de investigação. Entre as hipóteses propostas destaca-se a capacidade de *T. gondii* para interferir com a neurotransmissão no sistema nervoso central através da alteração do metabolismo da dopamina. Prandovsky *et al.* (2011) demonstraram que neurónios infetados apresentam uma maior libertação deste neurotransmissor. Consequentemente temos modificações comportamentais observadas durante a infeção crónica. Paralelamente, foi proposto que *T. gondii* poderá também influenciar a produção de testosterona através da infeção do tecido testicular, conduzindo potencialmente à diminuição dos níveis de medo e ansiedade. Embora os mecanismos envolvidos permaneçam por esclarecer, a modulação dos sistemas neuroendócrino e dopaminérgico constitui atualmente uma das principais hipóteses para explicar aumento da impulsividade, da exploração do meio envolvente e da propensão para comportamentos de risco descritos em diversos hospedeiros infetados (Tong *et al.*, 2021; Prandovsky *et al.*, 2011).

1.4 Objetivo do estudo

Com base nestas informações, o presente estudo pretende avaliar a associação entre a exposição ao parasita e a mortalidade do coelho-bravo, utilizando a presença de anticorpos específicos no soro como indicador de exposição prévia à infeção. O estudo foi realizado com amostras provenientes de duas áreas de estudo distintas, uma na qual os coelhos bravos estão expostos a predadores terrestres (mamíferos carnívoros como felídeos) e aéreos (aves de rapina), e outra zona onde apenas estes últimos estão presentes. Após determinação do estatuto serológico dos animais, avaliou-se a sobrevivência, comparando indivíduos mantidos em cercados com indivíduos em liberdade, potencialmente sujeitos à predação.

Com base na hipótese da manipulação comportamento formularam-se as seguintes hipóteses:

- 1) Os coelhos expostos a toxoplasma (seropositivos) apresentam maior mortalidade do que os coelhos não expostos (seronegativos). Admite-se que uma eventual alteração comportamental induzida pela infeção possa aumentar a propensão para comportamentos de risco e, consequentemente, a vulnerabilidade à predação.
- 2) A diferença de mortalidade entre seropositivos e seronegativos é mais acentuada na população exposta simultaneamente a predadores terrestres e aéreos do que na população exposta exclusivamente a predadores aéreos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Trabalho de campo

As campanhas realizadas para colheita de amostras integram um estudo de coorte prospetivo longitudinal, no qual os mesmos indivíduos são acompanhados ao longo do tempo com o objetivo de avaliar a influência de fatores de risco e evolução de parâmetros epidemiológicos e sanitários. Este tipo de desenho experimental permite monitorizar alterações individuais entre diferentes momentos de amostragem, possibilitando a avaliação da dinâmica de infeção e da sobrevivência dos animais ao longo do período de estudo. Durante as campanhas os coelhos são capturados e identificados individualmente com um microchip subcutâneo que permite reconhecer os animais em capturas subsequentes.

As amostras que foram depois testadas provêm de 3 locais distintos no Sul de Portugal: Companhia das Lezírias (CL), Noudar (ND) e Herdade da Raposa (HR).

Um conjunto provém da população da CL (38°50'43.7"N, 8°51'48.7"W) onde os coelhos se encontram liberdade e, por conseguinte, em contacto com predadores naturais que incluem mamíferos carnívoros e aves de rapina. A HR (37°43'26.6"N 7°40'31.1"W) apresenta igualmente uma população em liberdade, sujeita à predação pelos mesmos predadores de CL, destacando-se a presença do lince-ibérico. Ao contrário da CL, nesta propriedade a atividade cinegética é permitida.

A população de ND (38°11'03.7 "N, 7°02'24.4 "W) encontra-se instalada num cercado vedado, onde os animais dispõem de alimento e água suplementares. A vedação elétrica impede o acesso da maioria dos predadores terrestres, mantendo-se, contudo, a exposição a predadores aéreos, nomeadamente águia-imperial-ibérica, milhafre-real (*Milvus milvus*), águia de asa-redonda (*Buteo buteo*) e bufo-real (*Bubo bubo*). A atividade cinegética não é permitida nesta área, nem na CL.

As três áreas de estudo apresentam características de habitat semelhantes, dominadas por vegetação arbustiva mediterrânica. Na CL predominam espécies dos géneros *Cistus*, *Lavandula* e *Ulex*

associadas a montado de sobreiro (*Quercus suber*). Em ND verifica-se igualmente a presença de matos mediterrânicos, predominando o montão de azinho (*Quercus ilex*). Na HR o habitat é constituído maioritariamente por esteval (*Cistus ladanifer*), pastagens sob montado de azinheira (*Quercus rotundifolia*) e áreas de eucaliptal (*Eucalyptus spp.*).

São utilizadas armadilhas de captura viva do tipo Tomahawk[®] (Tomahawk Live Trap Co., Wisconsin, EUA) e colocado como isco cenoura fresca. Na CL e na HR foram distribuídas 50 armadilhas por uma área aproximada de 13 hectares. Em ND foram utilizadas 49 armadilhas, colocadas preferencialmente junto aos locais de alimentação existentes no interior dos cercados. As armadilhas eram abertas uma a duas horas antes do pôr do sol e verificadas aproximadamente duas horas após o anoitecer. Na manhã seguinte eram novamente inspecionadas cerca de duas horas após o nascer do sol, permanecendo posteriormente encerradas até ao final da tarde. Este protocolo acompanha o padrão de atividade crepuscular do coelho-bravo, maximizando a probabilidade de captura e reduzindo simultaneamente o tempo de permanência dos animais nas armadilhas. Desta forma, minimiza-se o stress associado à captura e o risco de mortalidade, particularmente durante períodos de condições climáticas adversas (Díez *et al.*, 2005).

Cada sessão de captura correspondeu a uma noite de armadilhagem, incluindo a verificação das armadilhas durante a noite e na manhã seguinte. Cada campanha foi constituída por um conjunto de sessões consecutivas, geralmente três noites, podendo variar entre duas e cinco noites de captura. Na CL e na HR, após o processamento biológico, cada coelho foi colocado num saco de contenção devidamente identificado e posteriormente libertado nas proximidades do local onde tinha sido capturado.

Em ND, a maioria dos animais foi novamente libertada no interior do cercado. Contudo, alguns indivíduos, selecionados de acordo com critérios previamente estabelecidos, foram libertados no exterior como parte de um programa de reforço da população selvagem. Esta seleção incidia preferencialmente sobre machos jovens não previamente identificados por microchip, contribuindo para a recuperação da população natural da região após a construção da barragem do Alqueva. Esta ação integra o projeto PRO-IBERLINX (código 0319_PRO-IBERLINX_6_P), desenvolvido com o objetivo de promover a conservação do lince-ibérico e a recuperação dos ecossistemas mediterrânicos onde esta espécie ocorre.

2.1.1 Processamento dos animais:

Antes do início do processamento dos animais as diferentes zonas de trabalho e todo o material necessário eram previamente organizados e dispostos de forma lógica como demonstrado na Figura 3, de forma a garantir um procedimento eficiente e a minimizar o tempo de manipulação dos

coelhos. Após a captura, cada coelho era inicialmente pesado no interior do saco de contenção. Posteriormente, subtraía-se o peso do saco para obter o peso corporal. Esta informação permitiu atribuir um grupo etário, considerando adultos os indivíduos com peso entre 900 e 1400 gramas, enquanto animais com peso inferior eram juvenis (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

Seguidamente procedia-se à leitura do microchip subcutâneo utilizando um leitor eletrônico. A presença de um microchip indicava que o indivíduo já tinha sido capturado numa campanha anterior ou durante a campanha em curso. Quando o animal era recapturado na mesma campanha, não eram efetuadas novas colheitas de amostras nem repetidas as restantes avaliações, sendo o coelho libertado após a confirmação da sua identidade. Posteriormente, determinava-se o sexo do animal e, no caso das fêmeas, avaliava-se a presença de gestação através da palpação abdominal. A colheita de sangue era realizada por venopunção da veia safena lateral. Para facilitar a distensão venosa, cria-se um garrote com um elástico fixado com uma pinça mosquito ao nível da articulação coxofemoral. Após desinfecção da pele, procedia-se à punção com uma agulha de calibre 25G, introduzida com o bisel orientado para baixo dada a fragilidade desta veia. Sempre que possível, recolhiam-se entre 1 e 1,5 mL de sangue em coelhos adultos, respeitando um volume máximo inferior a 0,25% do peso corporal nos animais juvenis. O sangue era posteriormente transferido para tubos secos, sem anticoagulante.

Nos indivíduos capturados pela primeira vez, procedia-se à implantação de um microchip na região interescapular, permitindo a sua identificação individual em futuras campanhas de captura.

Durante o processamento eram igualmente efetuadas diversas medições biométricas, incluindo o comprimento do tarso (medido entre o calcâneo e a extremidade da falange mais longe, Figura 4), a largura da cabeça (medida caudalmente às órbitas; Figura 5) e o comprimento do pavilhão auricular. Estes parâmetros permitiam caracterizar o crescimento dos animais e comparar os valores obtidos com os descritos na literatura. Para além da colheita de sangue, alguns indivíduos eram submetidos à recolha de amostras adicionais para diferentes projetos de investigação. Estas incluíam zaragatoas fecais para pesquisa de parasitas gastrointestinais, zaragatoas nasais destinadas ao estudo da resistência aos antimicrobianos (González-Azcona *et al.*, 2026) e biópsias da orelha para análises genéticas (por exemplo para avaliação do grau de hibridação entre subespécies de coelho-bravo). Procedia-se ainda à inspeção dos animais para deteção de ectoparasitas, particularmente carraças, que eram recolhidas e conservadas em álcool para posterior identificação taxonómica e análise molecular de agentes patogénicos potencialmente transmitidos por vetores (por exemplo Castro-Scholten *et al.*, 2024). Após o processamento de cada indivíduo, todo o material reutilizável era cuidadosamente desinfetado, de forma a reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos entre animais.



Figura 5. Contenção do coelho para recolha de amostras, neste caso medição da largura da cabeça

2.2 Parte laboratorial

2.2.1 Processamento das amostras sanguíneas

Após a colheita, as amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração até ao seu processamento laboratorial. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2000 rotações por minuto durante 10 minutos para separação do soro. Após centrifugação, o sobrenadante (soro) foi cuidadosamente recolhido e armazenado a -20°C até à realização das análises serológicas.

2.2.2 Seleção de amostras para estudo

Foram selecionadas 789 amostras de soro destes locais, 74 provenientes da CL, 442 de ND e 273 da HR. As amostras foram selecionadas para incluir todos os coelhos que possuíam histórico de múltiplas capturas em diferentes campanhas, para permitir estimar a mortalidade.

A seleção das amostras teve como critério a inclusão de indivíduos com historial de múltiplas capturas em diferentes campanhas, permitindo acompanhar o seu historial de recapturas ao longo do tempo e estimar os parâmetros de sobrevivência utilizados na análise estatística. As amostras foram distribuídas por nove microplacas de 96 poços cada. Em cada poço foram colocados 50 microlitros (µL) de soro, sendo cada amostra identificada através de um código individual. Após acondicionamento, as microplacas foram armazenadas a -20°C até à realização do teste serológico.

Em algumas amostras, o volume de soro disponível era reduzido devido a utilizações anteriores. Nestes casos, foram utilizadas alíquotas com um volume mínimo de 12 µL, garantindo sempre um volume igual ou superior aos 10 µL necessários para realização do MAT.

2.2.3 Teste de Aglutinação Modificada para *T. gondii*, MAT

A detecção de anticorpos contra *T. gondii* foi realizada através do MAT, tendo sido analisadas as 789 amostras de soro selecionadas para o estudo. O MAT é um teste serológico utilizado para a detecção de anticorpos IgG específicos contra *T. gondii* em diversas espécies animais (Al-Adhami *et al.*, 2016). O protocolo laboratorial tem uma duração aproximada de três dias por conjunto de microplacas, uma vez que inclui um período de incubação durante a noite e é necessário realizar a repetição das amostras positivas ou com resultado duvidoso. Assim, o processamento das nove microplacas necessárias para este estudo decorreu ao longo de aproximadamente três semanas.

O desempenho diagnóstico do MAT encontra-se amplamente descrito na literatura. Num estudo realizado em suínos, o teste apresentou uma sensibilidade de 95,7% (IC 95%: 84,0-99,2%) e uma especificidade de 97,8% (IC 95%: 87,0-99,9%), demonstrando uma concordância elevada com a imunofluorescência indireta (Minho, 2004). Em coelhos selvagens do sul da Austrália, McKenny *et al.* (2020) reportaram uma sensibilidade de 84,1% (IC 95%: 69,9-93,4%) e com uma especificidade de 96,7% (95% IC: 93,0%-98,8%), confirmando igualmente o bom desempenho do teste nesta espécie.

O MAT é um dos testes serológicos mais utilizados em estudos epidemiológicos de fauna selvagem, já que mostra ter grande sensibilidade e especificidade e permite analisar muitas amostras de amostras em simultâneo.

A interpretação do MAT baseia-se na observação macroscópica dos padrões de aglutinação. Na presença de anticorpos específicos contra *T. gondii*, estes ligam-se ao antígeno presente na suspensão, originando uma aglutinação que se distribui uniformemente pelo poço, correspondendo a um resultado positivo. Na ausência de anticorpos, o antígeno sedimenta formando um botão azul-escuro compacto no fundo do poço. O azul de Evans, utilizado como corante da suspensão antigénica, facilita a visualização destes padrões, ajudando na distinção entre resultados positivos e negativos (Figura 6).



Figura 6. à esquerda - controlo positivo, à direita - controlo negativo

2.2.3.1 Material necessário

A realização do MAT requer a utilização de diferentes reagentes e materiais laboratoriais. Como soluções de trabalho foram utilizados tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline* PBS), utilizado na diluição das amostras de soro, e o tampão de diluição do antígeno (*antigen buffer diluent* – ABD), utilizado na preparação da suspensão antigénica. O antígeno utilizado constitui numa suspensão de taquizoítos de *T. gondii* fixados em formalina, fornecida previamente preparada pelo fabricante. A mistura antigénica incluiu ainda 2-mercaptoetanol e azul de Evans.

O 2-mercaptoetanol é um composto tiol, redutor que promove a quebra das pontes dissulfureto das imunoglobulinas IgM, reduzindo a ocorrência de reações de aglutinação inespecíficas. Desta forma o MAT permite a deteção preferencial de anticorpos IgG, característicos de infeções prévias.

Antes da realização dos ensaios, foi necessário preparar algumas soluções. O PBS foi preparado e ajustado para um pH de 7,2 sendo posteriormente armazenado sob refrigeração até à sua utilização. A solução azul de Evans foi preparada para uma concentração final de 2 mg/mL. Para a execução do protocolo foram ainda utilizadas microplacas de diluição de 96 poços, em número variável de acordo com o total de amostras analisadas, uma cuvete para preparação da suspensão antigénica, um vórtex para homogeneizar os reagentes, uma hotte de exaustão para manipular os reagentes e micropipetas automáticas e respetivas pontas estéreis (Figura 7).

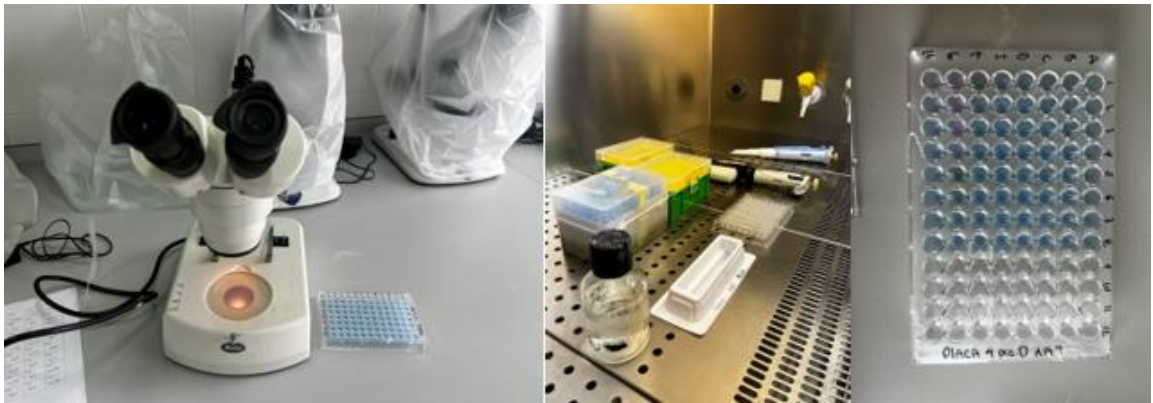


Figura 7. À esquerda - lupa para análise da placa MAT, centro – material necessário para preparação da suspensão antigénica, à direita – exemplo de placa pronta para incubação

2.2.3.2 Procedimento:

O ensaio iniciou-se com a preparação de uma placa de diluição, na qual todas as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:25. Para tal, adicionaram-se 10 μL de soro a 240 μL de tampão fosfato-salino (PBS) em cada poço, obtendo-se um volume final de 250 μL por amostra.

Antes de ser utilizado, o PBS foi filtrado para remover eventuais cristais que poderiam interferir com a leitura dos resultados. Após preparação, a placa de diluição foi mantida sob refrigeração, podendo ser utilizada durante os dias seguintes para a realização de novos ensaios ou da titulação das amostras reativas.

Em cada conjunto de placas processadas foi incluída uma coluna de controlos, sendo suficiente uma única coluna por conjunto de placas preparadas com a mesma suspensão antigénica. O controlo positivo foi distribuído pelos poços A1 a F1 e sujeito a diluições seriadas de duas vezes, desde 1:25 (diluição do soro utilizado como controlo positivo com PBS) até 1:800, permitindo confirmar a capacidade do ensaio para detetar anticorpos ao longo do intervalo esperado. O controlo positivo utilizado constitui em soro humano previamente caracterizado, que apresentava resultado positivo até à diluição de 1:800, sendo conservado sob refrigeração para utilizações subsequentes. Os poços G1 e H1 corresponderam aos controlos negativos, contendo apenas 50 μL de PBS.

A suspensão antigénica foi preparada imediatamente antes da sua utilização misturando, para cada microplaca, 2,5 mL de ABD, 35 μL de 2-mercaptoetanol, 50 μL de solução azul de Evans e 100 μL da solução antigénica de *T. gondii*. Sempre que necessário, os volumes foram ajustados proporcionalmente ao número de placas processadas. A preparação desta solução foi realizada numa hotte de exaustão, uma vez que o 2-mercaptoetanol tem grande volatilidade, odor intenso e propriedades tóxicas, incluindo potencial teratogénico.

Após preparação da placa de diluição e da suspensão antigénica, procedeu-se à preparação da placa de reação, previamente identificada. Em cada poço foram dispensados 25 μL da suspensão

antigénica e, de seguida, 25 µL da diluição 1:25 correspondente a cada amostra de soro. Após a adição dos reagentes, cada poço foi homogeneizado cuidadosamente para assegurar a mistura dos componentes e evitar a formação de bolhas de ar que poderiam dificultar a interpretação dos resultados. As microplacas foram posteriormente seladas com parafilme que prevenir a evaporação do conteúdo dos poços e incubadas a 37°C durante aproximadamente 12-18h (deixadas durante a noite até a manhã seguinte).

2.2.3.3 Leitura dos resultados:

Após incubação, os resultados foram avaliados com auxílio de uma lupa de bancada (Figura 6). As amostras positivas apresentavam um padrão de aglutinação difuso distribuído pelo fundo do poço, enquanto as negativas originavam um precipitado compacto em forma de botão, facilmente identificado pela coloração conferida pelo azul de Evans (figura 5).

Titulação das amostras positivas e duvidosas:

Todas as amostras classificadas inicialmente como positivas ou duvidosas foram posteriormente submetidas a titulação para determinação do título de anticorpos. Para este efeito, utilizou-se a diluição inicial de 1:25 previamente preparada e conservada sob refrigeração, efetuando-se diluições seriadas de duas vezes, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Método de titulação dos soros em resultados positivos ou duvidosos

Diluição	1:25	1:50	1:100	1:500
Volume da amostra (µL)	100	50	50	10
Volume de PBS (µL)	0	50	50	40

A realização da titulação possibilitou a confirmação dos resultados positivos e a determinação do título de anticorpos das amostras, permitindo uma avaliação semiquantitativa da resposta serológica. Assim, uma amostra que permanece positiva em diluições mais elevadas apresenta, em princípio, uma concentração superior de anticorpos específicos contra *T. gondii* relativamente a uma amostra reativa apenas na diluição inicial de 1:25. Adicionalmente permitiu esclarecer resultados inicialmente classificados como duvidosos, particularmente em amostras com marcado grau de hemólise, nas quais a interpretação do padrão de aglutinação era dificultada. Estas poderiam demonstrar alguma precipitação no fundo do poço, mas sem estar tão condensada como num positivo claro, sendo assim classificadas como duvidosas.

Após a preparação das diluições seriadas, procedeu-se à preparação da suspensão antigénica, seguindo o protocolo previamente descrito. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e, posteriormente, os resultados foram novamente avaliados por dois observadores independentes. Esta etapa permitiu confirmar as amostras inicialmente positivas, esclarecer duvidosas e determinar o título de anticorpos.

2.2.3.4 Ocorrências técnicas durante a execução do ensaio:

Durante a execução dos ensaios verificaram-se algumas limitações que implicaram a repetição de certas análises. Em alguns casos ocorreu evaporação do conteúdo de alguns poços durante a incubação, consequência de uma selagem incompleta das microplacas com parafilme, impossibilitando a interpretação dos resultados e obrigando à repetição das amostras. Adicionalmente, algumas amostras que apresentavam um padrão de aglutinação claramente positivo na primeira determinação revelaram resultados negativos na titulação, mesmo na primeira diluição de 1:25. Perante estas discrepâncias, optou-se por repetir integralmente o teste para as respetivas placas, de forma a confirmar os resultados.

Importa referir que a maioria das amostras já tinha sido previamente analisada por MAT no âmbito de projetos anteriores. Os resultados obtidos no presente estudo foram comparados com esses registos, tendo sido identificadas 29 amostras com resultados discordantes. Nestes casos, procedeu-se à repetição completa do ensaio, iniciando-se novamente o protocolo a partir da diluição inicial do soro retirado da amostra original de forma a excluir possibilidade de erros técnicos.

2.3 Análise dos dados

A análise dos dados serológicos foi realizada recorrendo a um modelo multi-evento de captura-marcação-recaptura (MECMCR). Estes modelos permitem incorporar a incerteza associada à observação dos indivíduos e à classificação do seu estado, sendo particularmente úteis em estudos longitudinais nos quais os animais podem transitar entre um número finito de estados como, por exemplo, entre seronegativo e seropositivo para *T. gondii* ou entre vivo e morto.

Os modelos foram implementados num contexto bayesiano utilizando a linguagem R (versão 4.6.0) através da interface RStudio (Posit®, versão 2026.04.0+526), utilizando o software JAGS (*Just Another Gibbs Sampler*). A implementação baseou-se no código desenvolvido por Gimenez (2016), disponível publicamente no inventário GitHub, posteriormente adaptado aos objetivos do estudo. A abordagem bayesiana permitiu estimar a distribuição posterior de cada parâmetro do modelo, incorporando simultaneamente a incerteza associada aos processos biológicos e ao processo de observação. Os dados de entrada consistiram nas histórias de captura individuais de cada coelho em

todas as sessões de captura. Em cada ocasião de amostragem, cada indivíduo foi classificado de acordo com um dos seguintes códigos de observação: indivíduo não capturado - 0; capturado e seropositivo para *T. gondii* (MAT positivo) - 1; capturado e seronegativo para *T. gondii* (MAT negativo) - 2; capturado, mas não testado - 3.

Antes da construção do modelo foram definidos estados biológicos possíveis dos indivíduos. Em cada momento um coelho podia encontrar-se num dos seguintes estados: vivo e seropositivo para *T. gondii* (T+), vivo e seronegativo (T-) ou morto (M).

Posteriormente, foram definidos os parâmetros a estimar pelo modelo:

ϕ_{Pos} – probabilidade aparente de sobrevivência dos animais seropositivos;

ϕ_{Neg} – probabilidade aparente de sobrevivência dos animais seronegativos;

p – probabilidade inicial de captura;

ψ_{PosNeg} – probabilidade de transição de estado de seropositivo para seronegativo;

ψ_{NegPos} – probabilidade de transição de estado de seronegativo para seropositivo;

π_{Pos} – probabilidade de o estado inicial ser seropositivo;

nt – probabilidade de não ser testado (este é fixo e o valor é calculado previamente).

ΔSe – a sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado (probabilidade de um animal seropositivo ser corretamente identificado como positivo).

ΔSp – a especificidade do teste de diagnóstico utilizado (probabilidade de um animal seronegativo ser classificado corretamente como negativo)

Após a definição dos estados e dos parâmetros, foram construídas as matrizes de transição e de observação que constituem o modelo multi-evento. As matrizes de transição descrevem a evolução dos estados biológicos dos indivíduos entre dois momentos consecutivos de amostragem (tempo t e tempo $t+1$), enquanto as matrizes de observação relacionam esses estados latentes com os eventos efetivamente registados durante as campanhas de captura. Desta forma, o modelo permite integrar simultaneamente os processos biológico (sobrevivência e transições entre estados serológicos) e os processos de observação (captura, realização do teste serológico e classificação correta ou incorreta do estado de infeção), produzindo estimativas corrigidas para a deteção imperfeita e para a imperfeição do teste diagnóstico.

2.3.1 Processos naturais

Os processos naturais foram descritos através de matrizes probabilísticas que representam a dinâmica da população ao longo do tempo, ou no caso da matriz dos estados iniciais apenas no momento da captura.

A primeira matriz (Tabela 2) define a distribuição dos estados iniciais dos indivíduos capturados, que podem ser indivíduos classificados como seropositivos ou seronegativos para *T. gondii*. O estado inicial morto não é possível já que este coelho não seria capturado.

Tabela 2. Matriz dos estados iniciais.

Na primeira coluna temos os estados iniciais em t (seropositivo (T+), seronegativo (T-)). PiPos indica a probabilidade de o estado inicial de um coelho ser seropositivo para *T. gondii*.

T+	T-	M
PiPos	1-PiPos	0

Segue-se a matriz da sobrevivência (Tabela 3). Aqui descrevem-se as probabilidades dos estados na ocasião da captura t e em $t+1$ (captura seguinte). A probabilidade de encontrar um coelho positivo e de este se manter seropositivo na segunda captura implica a sobrevivência aparente dos animais seropositivos. O mesmo pode ser descrito para a aparente sobrevivência dos animais seronegativos. A probabilidade de estar morto na primeira e na seguinte é 1 porque é um estado que se mantém fixo.

Tabela 3. Matriz da sobrevivência.

Na primeira coluna temos os estados iniciais em t (seropositivo para *T. gondii* (T+), seronegativo (T-) e morto (M)). ϕ Pos que indica a sobrevivência aparente dos animais seropositivos, ϕ Neg a sobrevivência aparente dos seronegativos.

	T+	T-	M
T+	ϕ Pos	0	1- ϕ Pos
T-	0	ϕ Neg	1- ϕ Neg
M	0	0	1

A seguinte matriz representa a probabilidade da transição entre estados (Tabela 4), que corresponde à probabilidade de um indivíduo transicionar de passar de seropositivo a seronegativo e seronegativo a seropositivo através da passagem inicial de um estado em t para outro em $t+1$.

Tabela 4. Matriz da transição entre estados. ψ_{PosNeg} indica a probabilidade de transição de seropositivo para seronegativo e ψ_{NegPos} de transição de seronegativo para seropositivo.

	T+	T-	M
T+	$1 - \psi_{PosNeg}$	ψ_{PosNeg}	0
T-	ψ_{NegPos}	$1 - \psi_{NegPos}$	0
M	0	0	1

2.3.2 Processos observacionais

Seguem-se as matrizes dos processos observacionais (Tabela 5), ou seja, processos que não ocorrem naturalmente. A primeira é a matriz da probabilidade de detecção dos estados serológicos de cada indivíduo. p corresponde à probabilidade de detecção do estado de um animal (neste caso, seropositivo ou seronegativo para *T. gondii*). A probabilidade de não detetar o seu estado será então $1-p$.

Tabela 5. Matriz da probabilidade de detecção. p significa a probabilidade de detecção do estado do animal seja para os seropositivos (T+) ou os seronegativos (T-).

	Não detetado (ND)	T+ (1)	T- (2)
T+	$1-p$	p	0
T-	$1-p$	0	p
M	1	0	0

A seguinte matriz corresponde à matriz da probabilidade de testagem (Tabela 6), ou seja, a probabilidade de um animal, após captura, ter amostras recolhidas e analisadas, neste caso através do MAT. A probabilidade tanto dos seropositivos como dos seronegativos não serem testados corresponde a nt , que como indicado acima é um parâmetro previamente estabelecido através da razão entre os animais testados e os animais que foram capturados, mas não testados. Este valor de nt varia apenas de acordo com o local de campanha.

Tabela 6. Matriz da probabilidade de testagem. nt significa a probabilidade de um animal captura não ser testado através do MAT.

	ND (0)	T+ (1)	T- (2)	Não testado (NT) (3)
ND	1	0	0	0
T+	0	1-nt	0	nt
T-	0	0	1-nt	nt

Por fim temos a matriz que permite o cálculo da sensibilidade e especificidade do método diagnóstico (Tabela 7). Esta matriz simboliza a probabilidade de um animal seropositivo ser corretamente identificado como positivo pelo MAT. Este valor corresponde a ΔSe , que no fundo se trata da sensibilidade do método diagnóstico utilizado. Por outro lado, a correta identificação de seronegativos como negativos no teste MAT é representada por ΔSp que corresponde à especificidade do método diagnóstico utilizado.

Tabela 7. Matriz da sensibilidade e especificidade do método de diagnóstico. ΔSe corresponde à sensibilidade do método de diagnóstico utilizado e ΔSp à especificidade do mesmo teste

	ND (0)	T+ (1)	T- (2)	NT (3)
ND	1	0	0	0
T+	0	ΔSe	$1-\Delta Se$	0
T-	0	$1-\Delta Sp$	ΔSp	0
NT	0	0	0	1

As matrizes de observação anteriormente descritas representam os eventos efetivamente registados durante as campanhas e posteriores análises laboratoriais, e relacionam os estados biológicos com os dados observados.

No modelo final utilizado, a análise foi iniciada a partir da primeira captura de cada indivíduo, conforme pressuposto do MECMR. Após uma análise exploratória dos dados, optou-se por dividir as campanhas por dias de captura formando um conjunto constituído por uma noite e pela manhã seguinte. Esta abordagem permitiu maximizar a utilização da informação disponível sem comprometer a estrutura temporal do modelo.

Os modelos foram estimados em JAGS, através da interface R (RStudio), utilizando 250 000 interações do modelo MECMR. As primeiras 50 000 interações foram descartadas como período de *burn-in*, permitindo reduzir a influência dos valores iniciais e favorecer a convergência das cadeias. Posteriormente, foi aplicado um *thinning* de 4, conservando apenas uma em cada quatro interações, de forma a reduzir a autocorrelação entre iterações sucessivas. Isto permite ao programa testar vários valores possíveis para os parâmetros que procuramos de modo a obter os valores mais ajudados aos dados obtidos. O tempo de computação variou entre áreas de estudo, tendo sido aproximadamente 8,87 horas (31 960,05 segundos) para a HR e 19,12 horas (68 846,05 segundos) para ND o que reflete a complexidade do modelo e o volume de dados analisados. A convergência das cadeias foi avaliada através do fator de redução potencial de Gelman-Rubin (R-hat) e da inspeção visual dos respetivos gráficos de convergência (trace plots). Considerou-se existir convergência adequada quando os valores de R-hat eram inferiores a 1,10 e as cadeias apresentavam boa mistura e estabilidade ao longo das iterações.

No próprio código estabelecido na plataforma foi necessário estabelecer valores prévios, denominados *priors* para os parâmetros a estimar, que permitem restringir o modelo aos valores que irá testar. As probabilidades de estado inicial (π_{Pos}), de ϕ e de ψ foram modeladas através de distribuições uniformes com um intervalo entre 0 e 1. A probabilidade de um indivíduo capturado não ser submetido ao teste serológico (nt) foi fixada para cada área de estudo, correspondendo à proporção de capturas sem resultado laboratorial. Os valores utilizados foram de 0,218 para HR e 0,344 para ND. Relativamente ao desempenho do teste diagnóstico a sensibilidade foi modelada através de uma distribuição uniforme entre 0,5 e 1, enquanto a especificidade foi modelada entre 0,8 e 1. Estes intervalos foram definidos com base nos valores de sensibilidade e especificidade descritos para o MAT que reportam desempenhos superior a 80%, sendo a especificidade consistentemente superior à sensibilidade (McKenney *et al.*, 2020; Minho, 2004).

Foi igualmente incorporada no modelo uma correção para a *trap-dependence*. Este fenómeno baseia-se no facto de que é errado assumir que existe igual probabilidade de captura para todos os indivíduos, uma vez que uma captura prévia pode alterar a probabilidade de recaptura. Alguns indivíduos podem desenvolver aversão às armadilhas, fenómeno de *trap-shyness*, enquanto outros podem apresentar maior probabilidade de recaptura devido à atração pelo isco, *trap-happiness*. A existência destes efeitos foi previamente avaliada através do programa U-CARE (versão 3.3.0). Para HR foi obtido um valor de $p = 0,002$. Este valor de p , no contexto U-CARE, quando é menor que 0,05 indica que temos um resultado estaticamente significativo. O valor de z para este local de campanha, foi de -3,03. Este é o resultado do teste de *trap-dependence* e quando o z é menor que 0 indica *trap-happiness*, quando é maior que 0 *trap-shyness*. De forma semelhante, para ND foram obtidos $p =$

0,0009 e $z = 3,31$, confirmando igualmente uma tendência significativa para uma maior probabilidade de recaptura dos indivíduos previamente capturados. Assim, como foi verificada a presença destas tendências pelo U-CARE foi adicionado ao modelo os parâmetros Beta1 (β_1) que indicam a probabilidade de captura de indivíduos previamente capturados e Beta2 (β_2) que indica a probabilidade de captura de indivíduos ainda não capturados.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados descritivos:

No histórico das campanhas de captura foram registados um total de 1301 eventos de captura e recaptura. Este valor inclui todas as capturas realizadas, independentemente de ter sido efetuada colheita de sangue e posterior análise serológica.

Das 789 amostras de soro analisadas, 43 apresentaram resultado positivo no MAT, correspondendo a uma seroprevalência aparente de 5,5% (IC95% (intervalo de confiança de 95%: 3,9 – 7,0 %). A distribuição dos resultados serológicos por área de estudo encontra-se apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Resultados por local de estudo. Distribuição de resultados positivos e negativos para cada local de campanha Companhia das Lezírias (CL), Noudar (ND) e Herdade da Raposa (HR) e as respetivas percentagens de positivos.

Local de estudo	CL	ND	HR
Positivos	0	25	18
Negativos	74	417	255
Percentagem de positivos	0%	5,7% (IC 95%: 3,9-8,2%)	6,6% (IC 95%: 4,2-10,4%)

Como não foi identificado nenhum resultado positivo na CL, estes dados não seguiram processamento e por isso foram retirados um total de 120 capturas/recapturas.

Os resultados por sexo e estatuto etário estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados por sexo e estatuto etário

Local de estudo	ND		HR	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Positivos	7	18	9	9
Negativos	130	284	127	117
Percentagem positivos	5,1% (IC 95%: 2,5-10,2%)	6% (IC 95%: 4,0-9,2%)	6,6% (IC 95%: 3,5-12,1%)	7,1% (IC 95%: 3,8-13,0%)
	Juvenis	Adultos	Juvenis	Adultos
Positivos	9	16	11	7
Negativos	93	316	105	150
Percentagem positivos	8,8% (IC 95%: 4,7-15,9%)	4,8% (IC 95%: 3,0-7,7%)	10,4% (IC 95%: 5,9-17,6%)	4,5% (IC 95%: 2,2-8,9%)

Alguns dos coelhos não estavam classificados com peso de modo que não lhes foi atribuído categoria de adulto ou juvenil por isso não estão contabilizados nesta tabela.

3.2 Resultados modelo multiestado captura-recaptura:

Todos os parâmetros estimados pelos modelos apresentaram valores de $R\text{-hat}$ inferiores a 1,1, indicando uma convergência adequadas dos modelos e, consequentemente uma boa estabilidade das estimativas obtidas. Como avaliação complementar da convergência e do ajustamento dos modelos, foram igualmente inspecionadas os *trace plots*. De um modo geral são distribuições, caracterizadas por um único pico bem definido e elevada concentração de probabilidade num intervalo reduzido de valores indicam uma boa precisão das estimativas. Em contraste, distribuições mais achatadas ou com vários picos sugerem maior incerteza na estimação dos parâmetros. Os *trace plots* obtidos para todos os parâmetros encontram-se apresentadas no Anexo (Figuras 8 e 9).

Relativamente ao efeito de dependência da armadilha (*trap-dependence*), verificou-se que, na HR o valor estimado para β_1 (0,50) foi superior a β_2 (0,30). Estes resultados corroboram os obtidos pelo U-CARE, confirmando a existência de um efeito de *trap-happiness*, ou seja, uma maior probabilidade de recaptura dos indivíduos previamente capturados. Em contraste, na população de ND embora o teste no U-CARE tenha igualmente indicado um efeito de *trap-happiness*, o modelo bayesiano estimou um valor de β_1 (0,17), inferior a β_2 (0,50). Este resultado sugere um padrão compatível com *trap-shyness*, indicando uma menor probabilidade de recaptura após a primeira captura.

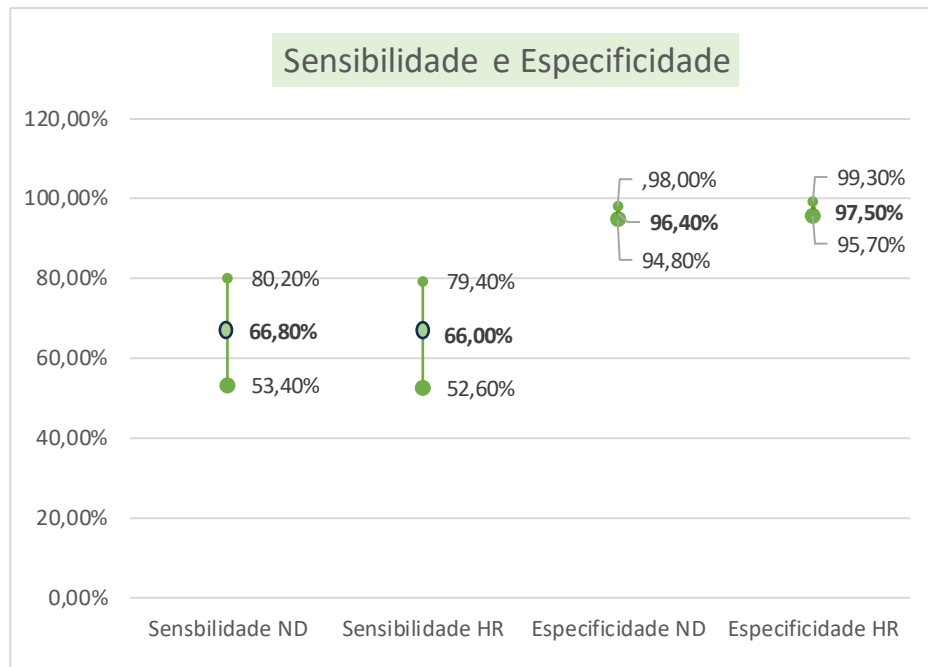


Figura 8. Sensibilidade e especificidade por local de captura

Na Figura 8 encontram-se representadas as estimativas da sensibilidade (ΔSe) e da especificidade (ΔSp) obtidas pelo modelo bayesiano para cada área de estudo. Os valores apresentados correspondem às estimativas posteriores dos parâmetros, sendo igualmente indicados os respectivos desvios-padrão (sd).

A sensibilidade estimada foi de 66,80% (sd $\pm 13,40\%$) para ND, 66,00% (sd $\pm 13,40\%$) para HR. No caso da especificidade para ND é de 96,40% (sd $\pm 1,60\%$) e para HR é de 97,50% (sd $\pm 1,80\%$). Verificou-se, assim, uma elevada concordância entre as estimativas obtidas para as duas populações. Considerando que o mesmo teste diagnóstico foi utilizado em ambas as áreas de estudo, os resultados apontam para uma sensibilidade média de 66,40% e uma especificidade de 97%.

A probabilidade de captura (p) foi estimada em 28,5% (sd $\pm 3,60\%$) para HR e de 17,10% (sd $\pm 0,80\%$) para ND.

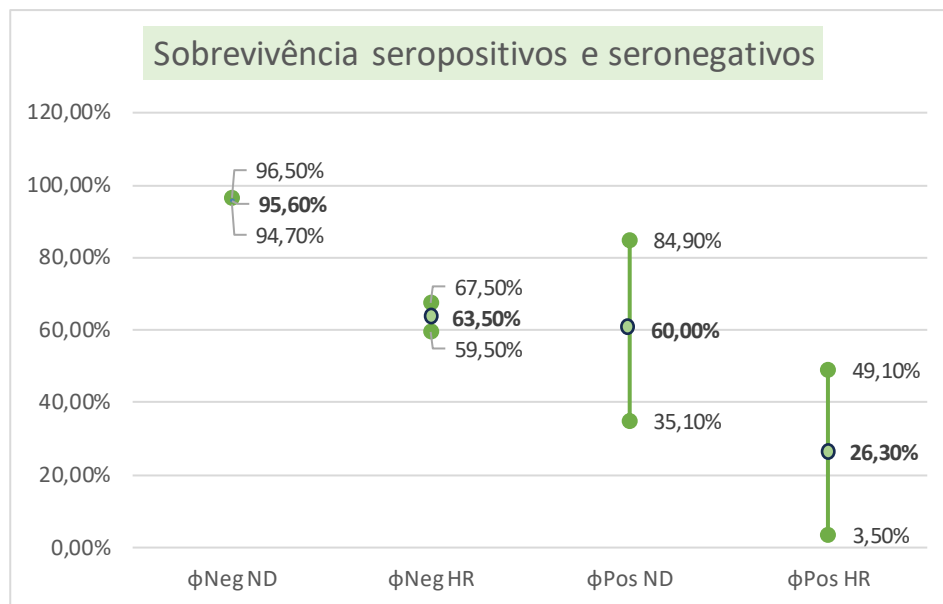


Figura 9. Probabilidade de sobrevivência para seropositivos e seronegativos por local de captura

Na Figura 9 apresentam-se as estimativas da probabilidade aparente de sobrevivência para os indivíduos seronegativos e seropositivos em cada uma das áreas de estudo, bem como os desvios-padrão. Em ND, a probabilidade aparente de sobrevivência estimadas para os seronegativos é de 95,60% (sd $\pm 0,90\%$), enquanto os seropositivos apresentam uma probabilidade de sobrevivência de 60% (sd $\pm 24,90\%$). Na HR temos 63,50% (sd $\pm 4\%$) de probabilidade de sobrevivência para seronegativo, diminuindo para 26,30% (sd $\pm 22,8\%$) nos seropositivos.

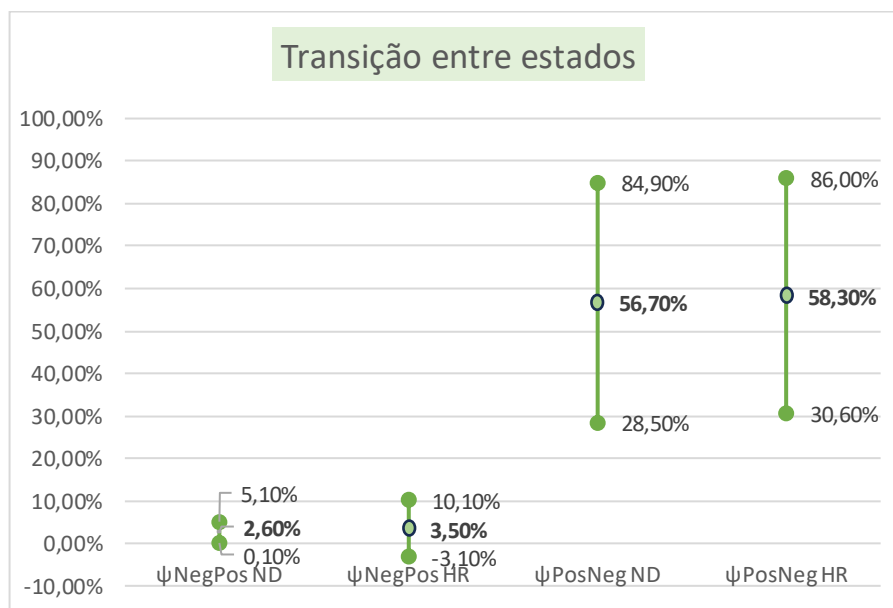


Figura 10. Probabilidade de transição entre estados por local de captura.

Transição de seronegativos para seropositivos nas colunas da esquerda, de seropositivos para seronegativos nas colunas da direita.

Na Figura 10 estão apresentados os valores das probabilidades de transição entre estados para cada local de captura calculados através do código utilizado, com os respectivos desvios padrão.

Os valores da transição entre seronegativos para seropositivos que são de 2,60% (sd $\pm 2,50\%$) para ND e 3,50% para HR (sd $\pm 6,60\%$).

Temos 56,70% (sd $\pm 28,20\%$) em ND e 58,30% (sd $\pm 27,70\%$) em HR para a probabilidade de transição de seropositivos para seronegativos.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram diferenças marcadas na probabilidade aparente de sobrevivência entre coelhos-bravos seropositivos e seronegativos para *T. gondii* em ambas as áreas de estudo. Importa notar que o modelo estima a sobrevivência aparente dos indivíduos. No entanto, considerando o desenho do estudo é plausível assumir que as diferenças observadas reflitam a verdadeira sobrevivência dos animais.

Até ao momento, alterações comportamentais induzidas por *T. gondii* não foram descritas especificamente em coelhos-bravos. Assim, os resultados deste estudo constituem uma primeira abordagem à possível relação entre a exposição ao parasita e a sobrevivência desta espécie. Na população de ND a probabilidade aparente de sobrevivência dos indivíduos seronegativos foi elevada (95,60%), valor compatível com as características deste local, onde os animais beneficiam de fornecimento regular de alimento, disponibilidade permanente de água e proteção contra predadores terrestres através de cercas. Em contraste, os coelhos seropositivos apresentaram uma probabilidade aparente de sobrevivência de apenas 60,00%. Esta diferença pode ser explicada, por, pelo menos, duas hipóteses não exclusivas. A primeira consiste num efeito direto da infeção por *T. gondii* sobre a sobrevivência dos coelhos. Como referido anteriormente, os lagomorfos são considerados particularmente suscetíveis à toxoplasmose, podendo desenvolver doença clínica grave e lesões multissistémicas associadas à multiplicação dos taquizoítos (Farhab *et al.*, 2025). A segunda hipótese, o objetivo desta investigação, prende-se com a possibilidade de a infeção crónica induzir alterações comportamentais que aumentem a suscetibilidade dos coelhos à predação. Em ND, apesar da exclusão de predadores terrestres, continuam presentes diversas aves de rapina, pelo que um eventual aumento dos comportamentos de risco poderá traduzir-se numa maior vulnerabilidade à predação por estes predadores.

Na HR observou-se a mesma tendência. A probabilidade aparente dos seropositivos foi de 26,3% enquanto nos seronegativos foi de 63,5%. Os intervalos de credibilidade destas estimativas não

se sobrepõem, sugerindo que esta diferença não se trata de incerteza do modelo. Globalmente, as probabilidades de sobrevivência foram inferiores às observadas em ND, o que é consistente com as características ecológicas da HR. Nesta população os coelhos vivem num ambiente totalmente natural, sujeito à disponibilidade variável de alimento, condições climáticas e predação por mamíferos carnívoros e aves de rapina. Apesar disso, manteve-se uma diferença superior a 30 pontos percentuais entre seropositivos e seronegativos, reforçando a hipótese de que a exposição a *T. gondii* poderá estar associada à redução da sobrevivência. No caso de HR, esta associação torna-se particularmente interessante devido à elevada densidade de lince-ibérico na área. Sendo este um predador especialista em coelho e simultaneamente o hospedeiro definitivo do parasita existe uma forte relação ecológica entre ambas as espécies, podendo a manipulação comportamental beneficiar a transmissão de *T. gondii*, ao favorecer a predação e assim, a progressão do seu ciclo de vida (Delibes-Mateos *et al.*, 2021).

Inicialmente esperava-se que a diferença entre seropositivos e seronegativos fosse substancialmente superior na HR relativamente a ND, uma vez que nesta população os coelhos estão expostos simultaneamente a predadores terrestres e aéreos. No entanto, verificou-se uma diferença de 35,6% entre ambos os grupos em ND e de 37,2% na HR, valores relativamente semelhantes entre as duas populações. Esta observação poderá indicar que a diminuição da sobrevivência não resulta exclusivamente de alterações comportamentais associadas ao aumento da predação, podendo também refletir efeitos patológicos diretos da infeção. Assim, é plausível que ambos os mecanismos atuem simultaneamente, por um lado a infeção poderá favorecer alterações comportamentais que aumentem a exposição aos predadores e, por outro, poderá comprometer diretamente a condição física dos coelhos, aumentando a mortalidade por efeito da própria doença. A confirmação destas hipóteses exigirá estudos adicionais que permitam monitorizar diretamente o comportamento dos animais seropositivos, identificar alterações comportamentais, acompanhar desenvolvimento dos sinais e realizar exames *post-mortem* que permitam determinar a causa de morte. A implementação deste tipo de monitorização é particularmente difícil em populações selvagens, como em HR. Seria igualmente relevante caracterizar a população de lince-ibérico presente na HR e determinar a seroprevalência de *T. gondii*, permitindo compreender melhor a dinâmica epidemiológica do parasita entre predador e presa.

Outro aspeto prende-se com a *trap-dependence*. A análise efetuada no programa U-CARE evidenciou um padrão de *trap-happiness* em ambos os locais, indicando que indivíduos previamente capturados apresentavam maior probabilidade de serem recapturados. Este efeito foi incorporado no modelo multiestado, reduzindo potencial de enviesamento. Na HR, os valores de B confirmaram esta tendência. Em ND, contudo, observou-se o padrão inverso, sugerindo um comportamento compatível com *trap-shyness*. Esta discrepância poderá resultar das diferenças metodológicas entre o teste

específico realizado pelo U-CARE e a estimativa simultânea dos parâmetros efetuada pelo modelo bayesiano. Em qualquer dos casos a inclusão da correção para *trap-dependence* permitiu reduzir a influência deste fenómeno nas estimativas finais de sobrevivência.

Relativamente à seroprevalência, estudos anteriores realizados na Península Ibérica reportaram valores de 2,8% (IC95%: 0,5-14,2%) em 36 coelhos do sul de Portugal testados por aglutinação direta (Waap *et al.*, 2016) e de 16,5% (IC 95%: 10,1-25,8%) em 85 coelhos de Espanha analisados através de MAT (García-Bocanegra *et al.*, 2010). A seroprevalência obtida neste estudo 5,5% (IC95%: 3,9 – 7,0 %) encontra-se dentro do intervalo descrito para a Península Ibérica, apresentado ainda a vantagem de resultar da análise de um número substancialmente superior de amostras.

Observou-se igualmente uma maior seroprevalência nos juvenis, com valores de 8,8% (IC 95%: 4,7-15,9%) para ND e 10,4% (IC 95%: 5,9-17,6%) para HR, comparativamente aos adultos, nos quais a seroprevalência foi de 4,8% (IC 95%: 3,-7,7%) e 4,5% (IC 95%: 2,2-8,9%), respetivamente. À partida seria expectável que a exposição ao parasita aumentasse com a idade. No entanto, esta distribuição poderá indicar uma mortalidade acrescida dos indivíduos infetados antes de atingirem a idade adulta, hipótese compatível com a elevada suscetibilidade dos lagomorfos à fase aguda da toxoplasmose, ou também a maior suscetibilidade dos coelhos infetados à predação (Almeria *et al.*, 2021).

Relativamente ao desempenho do MAT, a sensibilidade estimada foi inferior aos valores descritos na literatura, sugerindo a possibilidade de ocorrência de falsos negativos. Em contrapartida, a especificidade apresentou valores elevados e semelhantes aos previamente publicados, indicando que o número de falsos positivos deverá ser reduzido (McKenny *et al.*, 2020).

Por último, o modelo permitiu estimar as probabilidades de transição entre estados serológicos. A transição de seronegativo para seropositivo pode ser interpretada como uma estimativa da incidência da infeção, com valores reduzidos em ambas as populações, 2,60% (sd $\pm$ 2,50%) para ND e 3,50% para HR (sd $\pm$ 6,60%). O valor ligeiramente superior em HR poderá estar relacionado com a presença do lince-ibérico, aumentando potencialmente a contaminação ambiental por oocistos. Em ND, apesar da ausência de contacto direto entre os coelhos e os lince, a transmissão poderá ocorrer através de oocistos ambientais, cuja elevada resistência favorece a sua persistência e disseminação (Hasan *et al.*, 2024). As probabilidades estimadas de transição de seropositivo para seronegativo (56,70% em ND e 58,30% para HR) parecem contrariar a evidência disponível que descreve que os anticorpos IgG contra *T. gondii* como persistentes e frequentemente detetáveis durante toda a vida do hospedeiro (Farhab *et al.*, 2025). Este aparente retorno ao estado inicial poderá refletir uma diminuição dos anticorpos, que fique abaixo do limite de deteção do MAT, limitações inerentes à sensibilidade do teste (que pode transmitir-se num valor elevado de falsos negativos) ou a incerteza associada à estimação deste parâmetro pelo modelo. Consequentemente, estes resultados deverão

ser interpretados com prudência e confirmados em estudos futuros recorrendo a outros métodos serológicos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que os coelhos-bravos seropositivos para *T. gondii* apresentam uma menor probabilidade aparente de sobrevivência quando comparados com os indivíduos seronegativos, sugerindo uma associação entre a exposição ao parasita e o aumento da mortalidade. Contudo, os dados obtidos não permitem determinar se esta redução da sobrevivência resulta predominantemente dos efeitos patológicos diretos da infeção no hospedeiro intermediário, de alterações comportamentais que aumentam o risco de predação ou da combinação de ambos os mecanismos. Para esclarecer esta relação causal serão necessários estudos complementares que incluam a monitorização do comportamento dos animais, a avaliação da ocorrência de sinais clínicos e a realização de exames *post-mortem* que permitam determinar as causas de morte.

A maior seroprevalência observada nos animais jovens poderá indicar que a infeção contribui para uma mortalidade precoce, impedindo que uma parte dos indivíduos infetados atinja a idade adulta, provavelmente associada aos efeitos diretos da infeção. Por outro lado, a menor probabilidade aparente de sobrevivência observada na população sujeita a predadores terrestres e aéreos é compatível com a hipótese de que a infeção possa aumentar a vulnerabilidade à predação. No entanto, uma vez que as diferenças entre as duas áreas de estudo foram menos acentuadas do que inicialmente esperado, esta hipótese deverá ser interpretada com prudência.

Em conclusão, este estudo fornece evidência de uma associação entre a seropositividade para *T. gondii* e a redução da sobrevivência aparente do coelho-bravo, constituindo um contributo para o conhecimento da epidemiologia da toxoplasmose em populações selvagens. A continuação desta linha de investigação será fundamental para compreender o impacto da infeção na dinâmica populacional do coelho-bravo, espécie-chave dos ecossistemas mediterrânicos da Península Ibérica, bem como as suas potenciais implicações para a conservação dos seus principais predadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Adhami, B. H., Simard, M., Hernández-Ortiz, A., Boireau, C., & Gajadhar, A. A. (2016). Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. *Food and Waterborne Parasitology*, 2, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2015.12.001>

Almeria, S., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., Shipley, A., & Dubey, J. P. (2021). Epidemiological and Public Health Significance of *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Rabbits and Hares: 2010–2020. *Microorganisms*, 9(3), 597. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030597>

Berdoy, M., Webster, J. P., & Macdonald, D. W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1452), 1591–1594. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1182>

Castro-Scholten, S., Caballero-Gómez, J., Martínez, R., Nadales-Martín, B. J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Martín, D., Remesar, S., Jiménez-Ruiz, S., Gómez-Guillamón, F., & García-Bocanegra, I. (2024). Occurrence of *Coxiella burnetii* in wild lagomorphs and their ticks in Spanish Mediterranean ecosystems. *Zoonoses and Public Health*, 71(5), 549–559. <https://doi.org/10.1111/zph.13155>

Da Silva, R. C., & Langoni, H. (2009). *Toxoplasma gondii*: Host–parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitology Research*, 105(4), 893–898. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1526-6>

Daher, D., Shaghlil, A., Sobh, E., Hamie, M., Hassan, M. E., Moumneh, M. B., Itani, S., El Hajj, R., Tawk, L., El Sabban, M., & El Hajj, H. (2021). Comprehensive Overview of *Toxoplasma gondii*-Induced and Associated Diseases. *Pathogens*, 10(11), 1351. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111351>

Delibes-Mateos, M., Rödel, H. G., Rouco, C., Alves, P. C., Carneiro, M., & Villafuerte, R. (2021). European Rabbit *Oryctolagus cuniculus*. Em K. Hackländer & F. E. Zachos (Eds.), *Handbook of the Mammals of Europe* (pp. 1–39). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65038-8_13-1

Díez, C., Paez, J. A., Prieto, R., Alonzo, M. E., & Olmedo, J. A. (2005). Activity Patterns of Wild Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, L.1758), under Semi-Freedom Conditions, during Autumn and Winter. *Wildlife Biology in Practice*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.2461/wbp.2005.1.6>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cacciò, S., ... Robertson, L. (2018). Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>

Farhab, M., Aziz, M. W., Shaukat, A., Cao, M.-X., Hou, Z., Huang, S.-Y., Li, L., & Yuan, Y.-G. (2025). Review of Toxoplasmosis: What We Still Need to Do. *Veterinary Sciences*, 12(8), 772. <https://doi.org/10.3390/vetsci12080772>

Ferrer, M., & Negro, J. J. (2004). The Near Extinction of Two Large European Predators: Super Specialists Pay a Price. *Conservation Biology*, 18(2), 344–349. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00096.x>

Gálvez-Bravo, L., López-Pintor, A., Rebollo, S., & Gómez-Sal, A. (2011). European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) engineering effects promote plant heterogeneity in Mediterranean dehesa pastures. *Journal of Arid Environments*, 75(9), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.03.015>

García-Bocanegra, I., Dubey, J. P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., & Almería, S. (2010). Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Parasitology*, 167(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.044>

Gimenez Olivier (2016), *Fitting multievent models in R, Nimble and JAGS*. https://github.com/oliviergimenez/multievent_jags_R

González-Azcona, C., Solano-González, F., Jiménez-Ruiz, S., Santos, N., Marañón-Clemente, I., Álvarez-Gómez, T., Eguizábal, P., Alonso, C. A., Benito, D., Zarazaga, M., Torres, C., & Lozano, C. (2026). High Nasal Carriage of MRSA-mecC in Wild Rabbits in the Iberian Peninsula: A Wildlife Reservoir? *Microbial Ecology*, 89(1), 59. <https://doi.org/10.1007/s00248-026-02713-6>

Hasan, Md. F., Harun, A. B., Hossain, D., Bristi, S. Z. T., Uddin, A. H. M. M., & Karim, M. R. (2024). Toxoplasmosis in animals and humans: A neglected zoonotic disease in Bangladesh. *Journal of Parasitic Diseases*, 48(2), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12639-024-01664-4>

IUCN. (2018). *Oryctolagus cuniculus*: Villafuerte, R. & Delibes-Mateos, M.: *The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41291A170619657* [Conjunto de dados]. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T41291A170619657.en>

Kreuder, C., Miller, M. A., Jessup, D. A., Lowenstine, L. J., Harris, M. D., Ames, J. A., Carpenter, T. E., Conrad, P. A., & Mazet, J. A. K. (2003). PATTERNS OF MORTALITY IN SOUTHERN SEA OTTERS (*ENHYDRA LUTRIS NEREIS*) FROM 1998–2001. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 495–509. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.495>

Lees, A. C., & Bell, D. J. (2008). A conservation paradox for the 21st century: The European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mammal Review*, 38(4), 304–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2008.00116.x>

LIFE Iberconejo. (2022). *LIFE Iberconejo*. Disponível em: <https://www.iberconejo.eu/pt/inicio/> (Acedido em: 10 de junho de 2026)

Martinez, V. O., De Mendonça Lima, F. W., De Carvalho, C. F., & Menezes-Filho, J. A. (2018). Toxoplasma gondii infection and behavioral outcomes in humans: A systematic review. *Parasitology Research*, 117(10), 3059–3065. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6040-2>

McKenny, L., O’Handley, R., Kovaliski, J., Mutze, G., Peacock, D., & Lanyon, S. (2020). Evidence of infection with *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in South Australia: Using wild rabbits as a sentinel species. *Australian Veterinary Journal*, 98(8), 380–387. <https://doi.org/10.1111/avj.12951>

Meyer, C. J., Cassidy, K. A., Stahler, E. E., Brandell, E. E., Anton, C. B., Stahler, D. R., & Smith, D. W. (2022). Parasitic infection increases risk-taking in a social, intermediate host carnivore. *Communications Biology*, 5(1), 1180. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04122-0>

Milne, G., Webster, J. P., & Walker, M. (2020). Toxoplasma gondii: An Underestimated Threat? *Trends in Parasitology*, 36(12), 959–969. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>

Minho, Alessandro & Freire, Roberta & Vidotto, Odilon & Gennari, Solange & Marana, Elizabete & Garcia, João & Navarro, Italmar. (2004). Evaluation of the indirect fluorescent

antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24. 199-202. 10.1590/S0100-736X2004000400005. Tong, W. H., Pavey, C., O’Handley, R., & Vyas, A. (2021). Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. *Parasites & Vectors*, 14(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04528-x>

Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA (2011) *The Neurotropic Parasite Toxoplasma Gondii Increases Dopamine Metabolism*. *PLoS ONE* 6(9): e23866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023866>

Waap, H., Nunes, T., Vaz, Y., & Leitão, A. (2016). Serological survey of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti* in a wildlife conservation area in southern Portugal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 3–4, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.05.003>

ANEXO

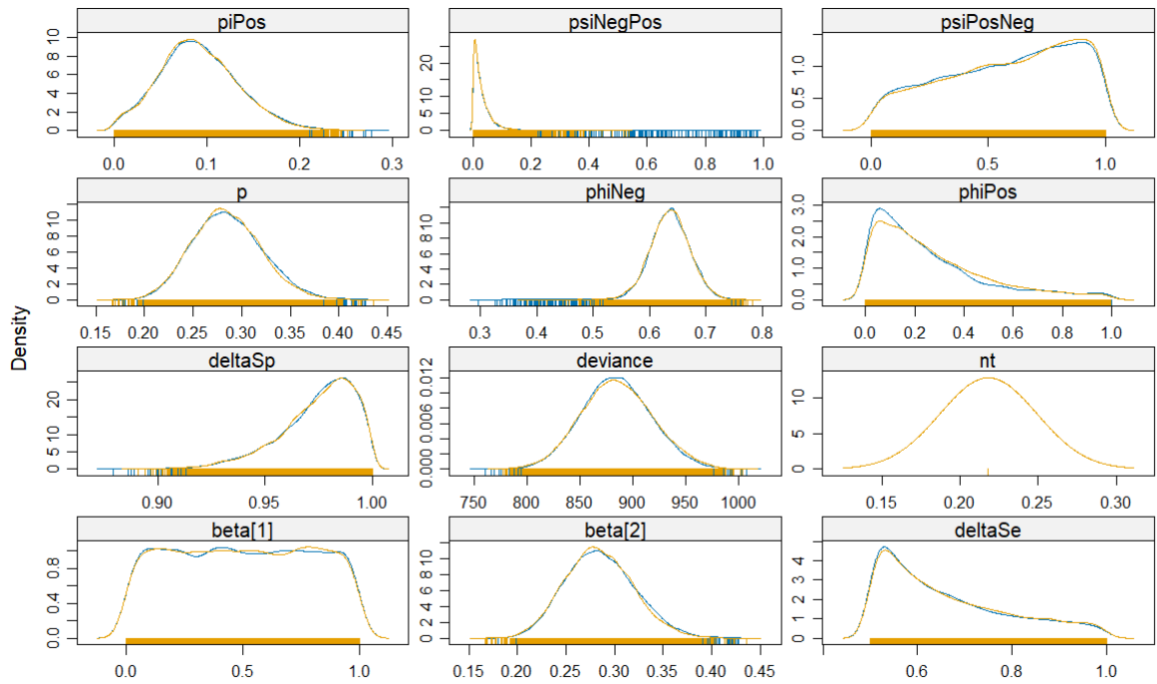


Figura 11. Trace plots do modelo para os parâmetros avaliados em HR

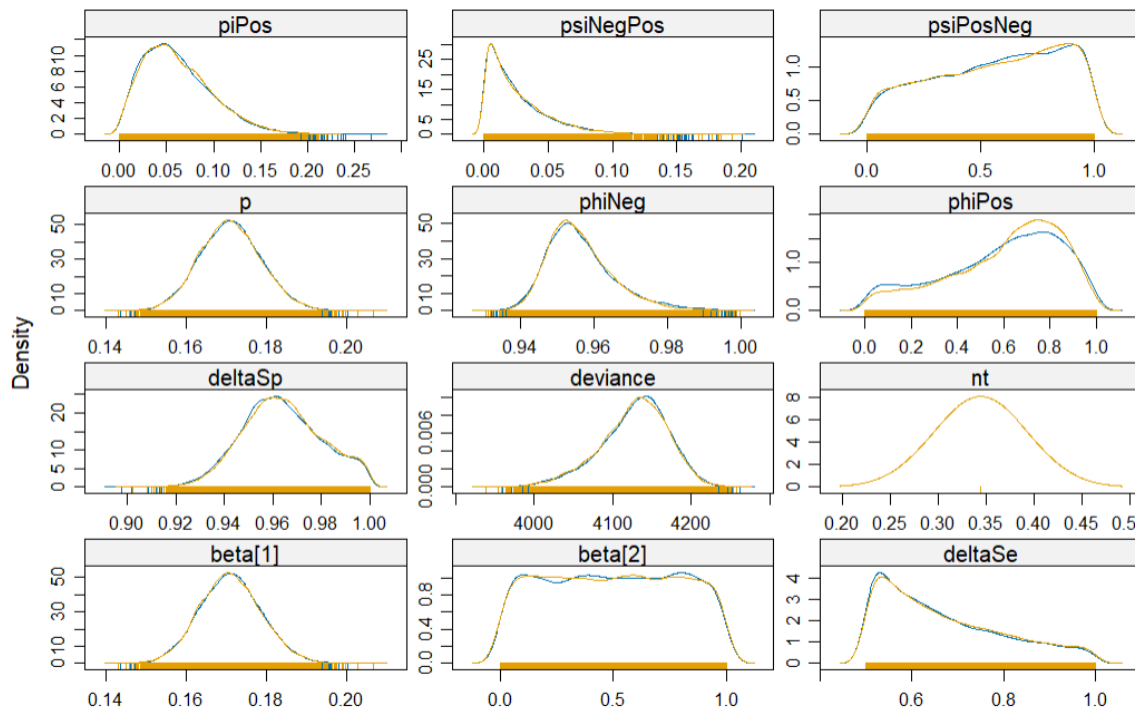


Figura 12. Trace plots do modelo para os parâmetros avaliados em ND

Toxoplasmose e alterações comportamentais: efeito na mortalidade de coelhos bravos (*Oryctolagus cuniculus*)

Nina Rita Sousa Pontes

ICBAS

