

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIA
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL**

LAURA DA SILVA NEY

**AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESTOCAGEM DE AMOSTRAS TECIDUAIS
PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp.**

Campos dos Goytacazes

2020

LAURA DA SILVA NEY

**AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESTOCAGEM DE AMOSTRAS TECIDUAIS
PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

COORIENTADORA: Dra. Samira Sallim Mello Gallo

Campos dos Goytacazes

2020

**AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESTOCAGEM DE AMOSTRAS TECIDUAIS
PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp**

LAURA DA SILVA NEY

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em

Comissão Examinadora:

Dr. Edwards Frazão Teixeira - (FIOCRUZ)

Prof. Dra. Nicole Brand Ederli - UFF (PEB)

Dra. Samira Sallim Mello Gallo - UENF - (Coorientadora)

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira - UENF- (Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Celma e Ferdinando ao meu pai David toda minha gratidão e amor. Carla e Isis por serem meu ponto de equilíbrio.

Meus amigos e familiares pelo incentivo e por dividirem comigo essa caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por serem meu amparo e minha fortaleza, por não me deixarem desistir e seguir sempre em frente.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade da realização deste curso.

Ao órgão de fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Francisco pela orientação por toda paciência e por acreditar em mim.

A minha coorientadora Samira por todo ensinamento.

A professora Nicole por sempre ser ponto decisivo nas minhas dúvidas.

Aos colegas de laboratório Juliana Ribeiro e Maynara Pimenta pela convivência diária.

Aos amigos Veronica Vieira, Mariah Biachi e Hassan Jerdy pela colaboração na análise histopatológica.

A Marcela Boechat por toda ajuda e paciência na quantificação das amostras.

Aos amigos Diego Lacerda e David Pessanha pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Otávio Fambre por conseguir colocar em forma de figura minhas ideias.

Aos meus avós Celma, Ferdinando, Glória e Bismarck por todo incentivo e principalmente pelas orações.

Ao meu pai David por todo apoio, por ser meu abrigo e meu amigo além do melhor pai que eu poderia ter.

A minha mãe Giani por auxiliar no meu amadurecimento e pelas orações.

A Isis e Carla por serem mais do que amigas, por serem parte do que sou hoje.

Aos meus amigos Laila, Bárbara, Ana Carolina, David, Thaynara, Thuany, João Vitor, Allonso, Wallace Bernardo, Rafael e Henrique por estarem nos meus melhores e piores momentos e principalmente por permanecerem.

A Paula e Maristela por serem minhas estimuladoras além de irmã e mãe.

Aos meus irmãos Danilo, Filipe e Dafne por vocês eu quero ser cada dia melhor.

A Luciana e Gilmar por todo estímulo e por sempre acreditarem em mim.

Ao Rodolfo e Lupp meus cães por me mostrarem que a felicidade pode sim ser muito simples.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me acompanharam até aqui me fazendo ser uma pessoa melhor.

Muito Obrigada!

“Don't stop this train. Don't for a minute change the place you're in. Once in awhile, when it's good. It'll feel like it should. And they're all still around. And you're still safe and sound”

MAYER JOHN (2006) Stop this train.

RESUMO

No Brasil existem três espécies de gambás, *Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*. Entre os diversos agentes patológicos que estes hospedeiros albergam, estão os protozoários do gênero *Sarcocystis* de grande interesse na medicina veterinária por causar a Mieloencefalite Protozoária Equina (EPM). Com a evolução dos métodos de diagnóstico a biologia molecular possibilitou a identificação de espécies em hospedeiros diferentes. Com isso o presente trabalho tem por objetivo avaliar dois métodos de conservação tecidual com a finalidade de melhorar o diagnóstico molecular. Para tanto, foram utilizados cinco gambás *D. aurita* para a obtenção dos esporocistos contidos na lâmina própria do intestino delgado. Estes foram extraídos da mucosa após digestão da mesma com hipoclorito de sódio 10%. Após a contagem e morfometria dos esporocistos, cada amostra foi padronizada em inóculos contendo 60 e 120 esporocistos em 1 mL, que foram inoculados em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*). Dois periquitos foram inoculados com solução de soro fisiológico, perfazendo um total de 12 periquitos. De todos os periquitos que morreram ou foram eutanasiados no período de quatro meses, foram coletadas amostras de tecidos e conservadas a temperatura de -20 °C com e sem a imersão em álcool absoluto. Foi realizada a biologia molecular dos esporocistos com o primer ITS 18S 9L/1H. Utilizando este mesmo primer foi realizado o diagnóstico molecular dos seguintes tecidos: coração, língua, coxa, peito, fígado, pulmão e cérebro, com o intuito de comparar a eficiência dos métodos de conservação. Como resultado dos valores morfométricos em micrômetros dos esporocistos obtivemos o comprimento médio de $11,2 \pm 0,9$ (7-15,6) e largura média de $7,7 \pm 0,6$ (3,8-10,9). Todas as amostras de raspado de mucosa contendo os esporocistos foram positivas para a PCR utilizando o primer ITS. O método de conservação a -20°C sem e com imersão em álcool absoluto apresentaram eficiência na preservação do DNA dos tecidos, embora não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois métodos avaliados. Nas infecções agudas foram observadas lesões histopatológicas em região hepática e pulmonar, com formação de merontes nos pulmões. Nas infecções crônicas foram encontrados 20 cistos maduros e imaturos nos tecidos do peito, coxa e da língua que mensurados tiveram valores em micrômetros de $25,4 \pm 7,1$ (12,7-34,8) de largura e $45,9 \pm 24,6$ (16,8-113,0) de comprimento. Com os resultados obtidos podemos inferir que os gambás *D. aurita* estão parasitados com espécies de *Sarcosystis* spp. que tem aves como hospedeiro intermediário.

Palavras-chave: *Sarcocystis*, EPM, Biologia molecular, Sarcosporidiose.

ABSTRACT

In Brazil there are three species of possums, *Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris* and *Didelphis marsupialis*. Among the various pathological agents that these hosts harbor, protozoa of the genus *Sarcocystis* is object of great interest in veterinary medicine for causing Equine Protozoan Myeloencephalitis (EPM). With the evolution of diagnostic methods, molecular biology has enabled to identify species in different hosts. Thus, the present work aims to evaluate two methods of tissue conservation in order to improve the molecular diagnosis. For this purpose, five *D. aurita* possums were used to obtain the sporocysts contained in the small intestine lamina propria. These were extracted from the mucosa after digestion with 10% sodium hypochlorite. After sporocyst counting and morphometry, each sample was standardized on inocula containing 60 and 120 sporocysts in 1 mL, which were inoculated into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Two parakeets were inoculated with saline solution, making a total of 12 parakeets. From all the parakeets that died or were euthanized in the period of four months, tissue samples were collected and kept at -20 °C with and without immersion in absolute alcohol. Molecular biology of the sporocysts was performed with the ITS 18S 9L / 1H primer. Using this same primer, the molecular diagnosis of the following tissues was performed: heart, language, thigh, chest, liver, lung and brain, in order to compare the efficiency of conservation methods. As a result of the morphometric values in micrometers of the sporocysts, we obtained an average length of 11.2 ± 0.9 (7-15.6) and an average width of 7.7 ± 0.6 (3.8-10.9). All mucosa scrape samples containing sporocysts were positive for PCR using the ITS primer. The method of conservation at -20 ° C without and with immersion in absolute alcohol showed efficiency in the preservation of DNA tissue, although no statistically significant differences were found between the two methods evaluated. In acute infections, histopathological lesions were observed in the hepatic and pulmonary regions, with formation of merons in the lungs. In chronic infections, 20 mature and immature cysts were found in the chest thigh and tongue tissues, which were measured with micrometers values of 25.4 ± 7.1 (12.7-34.8) in width and 45.9 ± 24.6 (16.8-113.0) in length. With the results obtained, its possible to infer that *D. aurita* possums are parasitized with *Sarcocystis* spp. species that have birds as an intermediate host.

Keywords: *Sarcocystis*, EPM, Molecular biology, Sarcosporidiosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Sarcocystis neurona*, evidenciando a fase endógena (reprodução sexuada: gametogonia e esporogonia do protozoário), que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, gambás da família Didelphidae..... 19
- Figura 2.** Ciclo de vida do gênero *Sarcocystis* evidenciando a fase endógena (reprodução assexuada do protozoário: endopoligenia, esquizogonia e endodiogonia) que ocorre nos hospedeiros intermediários finalizando com a formação do cisto na musculatura..... 21
- Figura 3.** Distribuição geográfica de gambás da família Didelphidae na América do Sul, baseado em Cerqueira e Lemos (2000), Brown (2004) e Gardner (2007). 27
- Figura 4.** Modelo em espiralado DNA, com bases nitrogenadas ligadas entre si (timina com adenina e citosina com guanina) internamente por pontes de hidrogênio. (Autor, 2019) 29
- Figura 5.** Esquema de congelamento da célula mostrando o acúmulo de água fora da célula, através do processo de osmose, provocando o encolhimento desta e formando cristais no meio extracelular. 31
- Figura 6.** Esquema de descongelamento da célula mostrando a água retornando pro meio intracelular mantendo a integridade da célula. 31
- Figura 7.** Oocisto e esporocistos provenientes da digestão química de raspados de mucosa de gambás (*Didelphis aurita*), utilizando hipoclorito de sódio a 10%. Em (A) observa-se vários oocistos em diversas fases de desenvolvimento; em (B) a seta destaca a tênue par..... 40
- Figura 8.** Corrida eletrofotérica em gel de agarose 1% dos produtos da PCR, utilizado o primer ITS 18S 9L/1H que amplifica sequência de *Sarcocystis* spp. em 900pb (seta). (MM) marcador de peso molecular de 1000pb, controles positivos e negativos e amostras de “amp amplicons” de DNA extraídos de esporocistos oriundos de raspados intestinais de gambás (*Didelphis aurita*). 41
- Figura 9.** Quantificação em aparelho Nanodrop do DNA, extraído dos tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) experimentalmente infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), armazenados congelados -20°C e em álcool absoluto. 48
- Figura 10.** Quantificação em gel de agarose do DNA, extraído dos tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) experimentalmente infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), armazenados congelados -20°C e em álcool absoluto. 49

Figura 11.Comparativo da quantificação do DNA (ng/μl) extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) levando em consideração os tratamentos aplicados A (tecidos mantidos em álcool absoluto) C (tecidos congelados)..... 50

Figura 12. Quantificação do DNA, extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), experimentalmente infectados com esporocistos oriundos de raspado intestinal de gambá (*Didelphis aurita*). 51

Figura 13. Micrografia evidenciando lesões nos tecidos hepáticos e pulmonares de um periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) que morreu 20 dias após infecção experimentalmente via oral, com 120 esporocistos oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*). Em **A**, infiltrado inflamatório no tecido hepático e hepatócitos com leve degeneração. Em **B**, infiltrado inflamatório associado com áreas de edema e atelectasia. Barra de 50μm e coloração hematoxilina e eosina..... 53

Figura 14. Micrografia de tecido pulmonar de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) inoculados experimentalmente, via oral, com esporocistos de *Sarcocystis* spp., oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*) e que morreram 17 (**A**) e 20 (**B** e **C**) dias após inoculação. Em **A**, **B** e **C**, setas evidenciam merontes do parasito em endotélio vascular de vênulas das aves que receberam 60, 120 e 60 esporocistos, respectivamente. Barra de 20μm, em imersão, coloração hematoxilina e eosina..... 54

Figura 15. Micrografia de tecido muscular de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) inoculados experimentalmente, via oral, com esporocistos de *Sarcocystis* spp., oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), que morreu 108 dias após infecção em (**A**) cisto maduro no corte transversal em musculatura do peito, (**B**) cisto imaturo no corte vertical em musculatura do peito. Em (**B**) e (**C**) cistos maduros com corte transversal e vertical respectivamente em musculatura da coxa. Em (**E**) e (**F**) cistos maduros em corte transversal e vertical musculatura da língua. Barra de 50μm e coloração hematoxilina e eosina 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Quantificação do DNA extraído de esporocistos de *Sarcosystis* spp., oriundo de raspado de mucosa de gambá, *Didelphis aurita* contidos em uma alíquota de 1 µl de cada amostra, utilizando espectrofotômetro.....41
- Tabela 2.** Quantitativo de esporocistos contidos em cada amostra analisada após a realização da digestão química do raspado da mucosa intestinal de gambás *Didelphis aurita* e padronização dos inóculos de 1000 µl, contendo 60 e 120 esporocistos por amostra que fora foram utilizados na infecção experimental (bioprova) em periquitos australianos, *Melopsittacus undulatus*.....42
- Tabela 3.** Infectividade de amostras de *Sarcocystis* spp. isolados de raspados de mucosa intestinal de gambás, *Didelphis aurita*, em periquitos australianos, *Melopsittacus undulatus*.....44
- Tabela 4.** Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), com o resultado da amplificação do fragmento de DNA, de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp., utilizando o primer ITS 18S 9L/1H.....44
- Tabela 5.** Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 60 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.....45
- Tabela 6.** Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 120 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.....45
- Tabela 7.** Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 60 e 120 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.45
- Tabela 8.** Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de diferentes amostras teciduais de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp.46
- Tabela 9.** Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. em relação a órgãos alvos.....46

Tabela 10. Medidas médias, desvio padrão e maiores e menores valores aferidos de esporocistos provenientes de raspado de mucosa intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), através da digestão química com hipoclorito de sódio a 10%.....57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Demonstrativo do número de esporocistos que serão depositados diretamente no inglúvio (papo) dos periquitos australiano, *Melopsittacus undulatus* (P).
.....34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparativo na quantificação de DNA (ng/μl) extraído dos tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) utilizando dois métodos de quantificação, gel em agarose e aparelho Nanodrop, levando em consideração os dois tipos de armazenamento, os tecidos congelados -20°C e mantidos em álcool absoluto.
.....46

Gráfico 2. Comparativo da quantificação do DNA (ng/μl) extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) levando em consideração os tratamentos aplicados A (tecidos mantidos em álcool absoluto) C (tecidos congelados).....**Erro! Indicador não definido.**

Gráfico 3. Valores da quantificação do DNA (ng/μl) extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) elucidando os órgãos alvos para o parasitismo.
.....**Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.3 ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 O GÊNERO <i>SARCOCYSTIS</i>	17
3.1.1 Ciclo de vida no hospedeiro definitivo.....	17
3.1.2 Ciclo de vida no hospedeiro intermediário	20
3.1.3 Ciclo de vida – período pré patente	22
3.1.4 Diagnóstico	22
3.1.5 <i>Sarcocystis</i> de gambás.....	23
3.2 GAMBÁ	24
3.2.1 Taxonomia	24
3.2.2 Biologia	25
3.2.3 Distribuição geográfica	26
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ÁCIDOS NUCLEICOS	28
3.4 CONSERVAÇÃO DO DNA NOS TECIDOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	32
4.2 ORIGEM DOS ANIMAIS	32
4.3 OBTENÇÃO E MORFOMETRIA DOS ESPOROCISTOS	33
4.4 CONTAGEM DOS ESPOROCISTOS	33
4.5 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	34
4.6 PROVA BIOLÓGICA	34
4.7 HISTOLOGIA	35
4.8 BIOLOGIA MOLECULAR	36

4.8.1 Extração de DNA	36
4.8.2 Reação em cadeia da polimerase.....	37
4.8.3 Análise da PCR.....	38
4.8.4 Quantificação do DNA	38
4.9 ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Sarcocystis* são parasitos heteróxeos obrigatórios e tem como hospedeiro definitivo o gambá, o seu ciclo biológico se estabelece através da relação presa predador. Logo, a infecção causada por este parasito depende da ingestão de tecido muscular contendo sarcocistos (cistos maduros) do protozoário na forma infectante.

O motivo de grande interesse do estudo dessa espécie de parasito se dá pela enfermidade causada pelo *Sarcocystis neurona*, que tem o gambá como hospedeiro definitivo e pode infectar equídeos, causando uma doença neurológica, denominada como Mieloencefalite Protozoária Equina (MPE). As lesões no Sistema Nervoso Central (SNC) causam um quadro debilitante pela atrofia dos membros posteriores, além de graves sinais neurológicos que podem levar a óbito.

Além do *S. neurona*, os gambás podem eliminar outras quatro espécies de *Sarcocystis*; *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis falcatula like*, *Sarcocystis speeri*, *Sarcocystis lindsayi*. Não é possível diferenciar os espécimes do protozoário eliminados juntamente com as fezes dos gambás através da morfologia e morfometria dos esporocistos. Por isso, para diferenciar algumas espécies do gênero tem-se realizado prova biológica utilizando periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) como modelo experimental, com intuito de separar as espécies que infectam aves das que infectam mamíferos e diferenciar as espécies através de microscopia eletrônica de transmissão dos cistos maduros nos tecidos das aves. No entanto, o método mais preciso de diagnóstico tem sido a biologia molecular, tanto nos esporocistos quanto dos cistos.

Justifica-se, portanto um projeto que determine qual o melhor método de conservação das amostras de tecido dos hospedeiros intermediários de *Sarcocystis* spp. e a viabilidade de se fazer o diagnóstico diretamente dos esporocistos presentes no raspado de mucosa intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar o melhor método de estocagem tecidual para diagnosticar, através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), espécies de *Sarcocystis*, presentes em cistos no hospedeiro intermediário, utilizando o gambá, *Didelphis aurita*, como hospedeiros definitivo e o periquito australiano, *Melopsittacus undulatus* como modelo experimental do hospedeiros intermediários para o parasitismo.

2.3 ESPECÍFICOS

- Isolar esporocistos de *Sarcocystis* spp. em raspados intestinais de gambás *D. aurita* oriundos da cidade de Campos dos Goytacazes;
- Isolar cepas de *Sarcocystis* spp. através de prova biológica em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*);
- Avaliar se há diferença no diagnóstico molecular de amostras conservadas a -20°C contendo ou não álcool absoluto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Protozoários do gênero *Sarcocystis* são encontrados em todo o mundo e em uma grande variedade de hospedeiros, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem. Uma característica única do gênero é que ele possui um ciclo de vida heteróximo com dois tipos diferentes de hospedeiro, um hospedeiro definitivo e um hospedeiro intermediário (ODENING, 1998). Estes diferentes hospedeiros acomodam diferentes estádios da vida do parasito sendo que a reprodução sexuada ocorre no hospedeiro definitivo e a reprodução assexuada no hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 1989; DUBEY; ODENING, 2001).

De grande valia para a medicina veterinária, o gênero tão pouco estudado *Sarcocystis* é formado por muitas espécies que podem ser diferenciadas por suas características biológicas. Nomes de espécies de hospedeiros são frequentemente utilizados para nomear e classificar as espécies de *Sarcocystis* como *Sarcocystis capracanise* e *Sarcocystis suihominis* (DUBEY et al., 1989; ODENING, 1998). É de conhecimento que uma espécie de *Sarcocystis* pode estar presente em várias espécies de hospedeiros e uma espécie de hospedeiro pode ser portadora de várias espécies de *Sarcocystis*. No passado, dentre os critérios morfológicos disponíveis, utilizavam-se a ultraestrutura da parede do cisto como forma mais confiável de classificar taxonomicamente as espécies em um determinado hospedeiro, mas não entre hospedeiros diferentes, pois espécies biologicamente distintas podem ter sarcocistos estruturalmente idênticos em diferentes hospedeiros (DUBEY et al., 1989; DUBEY E ODENING, 2001).

Dubey et al. (1989) descreveram 24 espécies dentro deste gênero. Em uma ampla catalogação Odening (1998) reconheceu 189 espécies do gênero *Sarcocystis*.

O que diferencia o gênero *Sarcocystis* das outras espécies de coccídeos, é que eles são liberados nas fezes em sua forma infectante, não dependendo de condições climáticas para maturação e infectividade (DUBEY, 1992)

3.1 O GÊNERO *Sarcocystis*

O primeiro relato de *Sarcocystis* foi feito por Miescher em 1843 na Suíça onde este pesquisador descreveu “linhas branco-leitosas” na musculatura esquelética de camundongo doméstico, *Mus musculus*, que ficaram conhecidos como túbulos de Miescher. Em 1865 Kühn encontrou um parasito similar na musculatura de um suíno e o nomeou *Synchytrium miescherianum*, posteriormente Lankester em 1882, introduziu o nome *Sarcocystis* para o gênero, termo de origem grega onde *sarkos* significa músculos e *kystis* vesícula ou bolsa, referindo ao estágio final da fase assexuada do parasito no hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 1989). Estes autores em sua revisão relatam também que houve grandes mudanças até a definição do nome propriamente dito e assim o parasito foi descrito também por Blanchard em 1885 e nomeado *Sarcocystis muris* por Railliet 1886 e mais tarde em 1899 Labbé mudou o nome *Synchytrium miescherianum* para *Sarcocystis miescheriana* tornando-se assim espécie-tipo do gênero.

3.1.1 Ciclo de vida no hospedeiro definitivo

Segundo Dubey et al. (1989), infecção do hospedeiro definitivo se dá a partir da ingestão de cistos maduros (sarcocistos) presentes na musculatura dos hospedeiros intermediários que podem ser vertebrados, onívoros ou herbívoros. Por sua vez, os hospedeiros intermediários se infectam ao ingerirem esporocistos presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos. De modo geral no hospedeiro definitivo, após ingestão dos sarcocistos presentes no tecido muscular ou neural do hospedeiro intermediário, as enzimas proteolíticas liberam os bradizoitos no estômago e no intestino delgado. Estes movem-se ativamente até penetrar na lâmina própria do intestino delgado, local onde ocorrerá a reprodução sexuada, formando assim os gametócitos. Com o processo de maturação esses gametócitos, irão se transformar em gameta masculino (microgametas) móveis e flagelados e gameta feminino (macrogameta) imóveis e maiores iniciando o processo de

gametogonia. O produto oriundo da gametogonia é o zigoto, ele evolui dentro do epitélio e oocistos não esporulados são produzidos na lâmina própria do intestino. A partir do momento que ocorre a esporulação desses oocistos na lâmina própria do intestino, resultam em seu interior dois esporocistos contendo cada um quatro esporozoítos. As paredes dos oocistos são frágeis e delgadas rompem-se com facilidade, liberando os esporocistos na lâmina própria do intestino. Com isso, os esporocistos são liberados no lúmen intestinal e são eliminados posteriormente nas fezes do hospedeiro definitivo. O período pré-patente é bem variável podendo ir desde o sétimo ao décimo quarto dia após a ingestão do sarcocistos (DUBEY et al., 1989). Um exemplo ilustrado do ciclo de vida de *S. neurona*, evidenciando a fase endógena (reprodução sexuada, gametogonia e esporogonia do protozoário) que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, gambás da família Dedelphidea, pode ser visto na Figura 1.

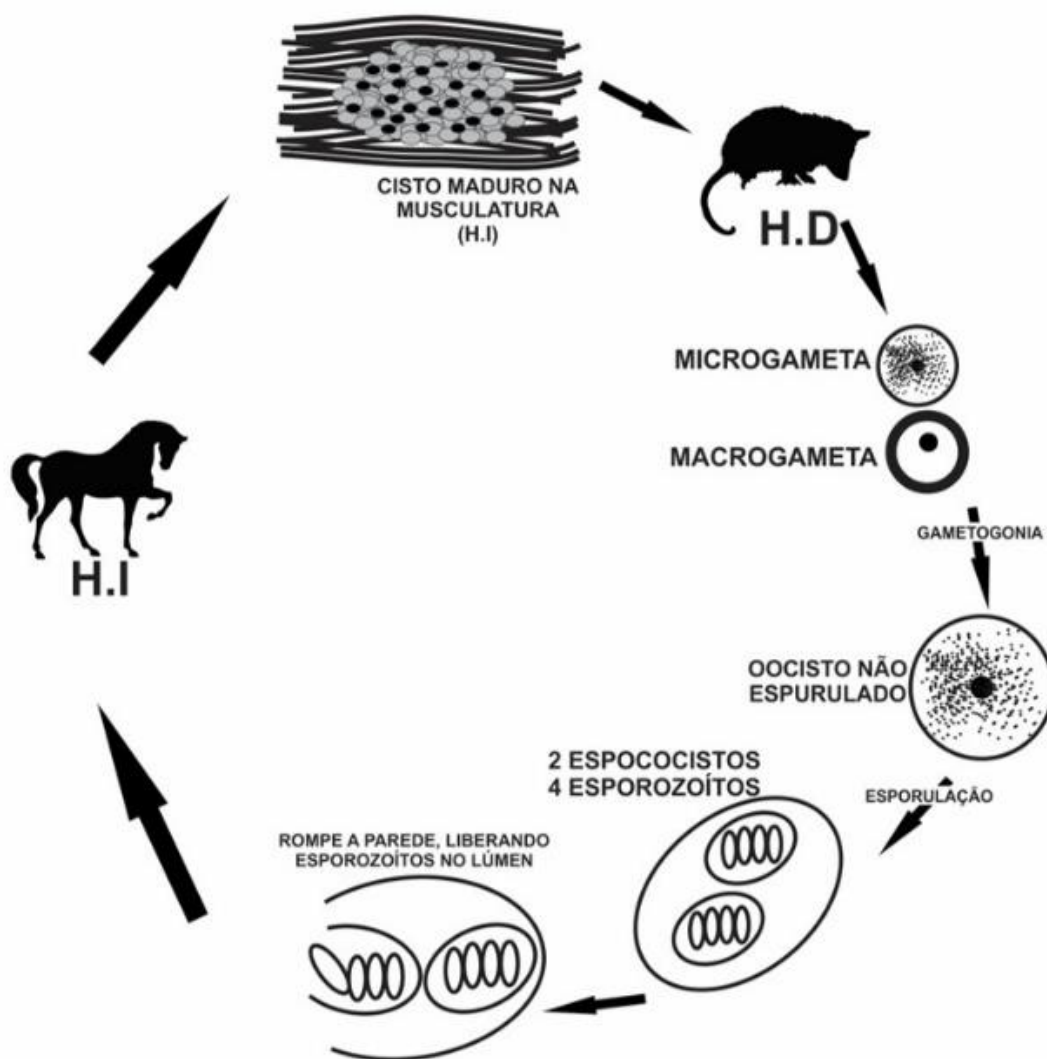


Figura 1. Ciclo de vida de *Sarcocystis neurona*, evidenciando a fase endógena (reprodução sexuada: gametogonia e esporogonia do protozoário), que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, gambás da família Dedelphidea.

3.1.2 Ciclo de vida no hospedeiro intermediário

A quantidade e distribuição de sarcocistos no corpo do hospedeiro intermediário variam de hospedeiro para hospedeiro. A sua presença na musculatura estriada esquelética e cardíaca é mais comum, no entanto, os cistos podem ocorrer no sistema nervoso central e nas fibras de Purkinje, além de músculo liso, mas sempre em menor quantidade (POWELL et al., 1986). Estes autores citam também que os fatores que afetam o número e a distribuição de sarcocistos incluindo entre eles o número de sarcocistos ingeridos, espécie de *Sarcocystis* junto com o grau de patogenicidade, espécie de hospedeiro e o estado imunológico do hospedeiro e para se tornar infeccioso no hospedeiro definitivo, o sarcocisto necessita de um a vários meses de maturação, em seu estágio assexuado terminal. O desenvolvimento intracelular ocorre pelo processo de divisão celular denominado endopoligenia. Os merozoítos no interior das células iniciam este processo de endopoligenia que seria como a esquizogonia, os merozoítos aumentam em tamanho e o núcleo torna-se lobulado, quando ocorre a formação de esquizontes. O material nuclear eventualmente se divide em simultâneo com a citocinese, resultando em numerosos merozoítos. Alguns destes escapam de suas células hospedeiras e penetram em outras células e sofrem gerações adicionais de esquizogonia. Em outros casos pode ocorrer o fato de que, os merozoítos permanecem dentro da célula hospedeira e iniciam outra geração de esquizogonia. Merozoítos liberados da esquizogonia podem ser observados na corrente sanguínea, em células mononucleares (monócitos e linfócitos), macrófagos e em tecidos de animais infectados formando o sarcocisto.

A formação e maturação dos sarcocisto iniciam-se quando o merozoíto é circundado por um vacúolo parasitóforo, que nada mais são do que metrócitos imaturos. Esses metrócitos se dividem por endodiogenia produzindo os bradizoítos dentro dos sarcocistos. Esses sarcocistos finalizam a fase da reprodução assexuada, tornando infectante para o hospedeiro definitivo, como ilustrado na Figura 2 (DUBEY et al., 2001).

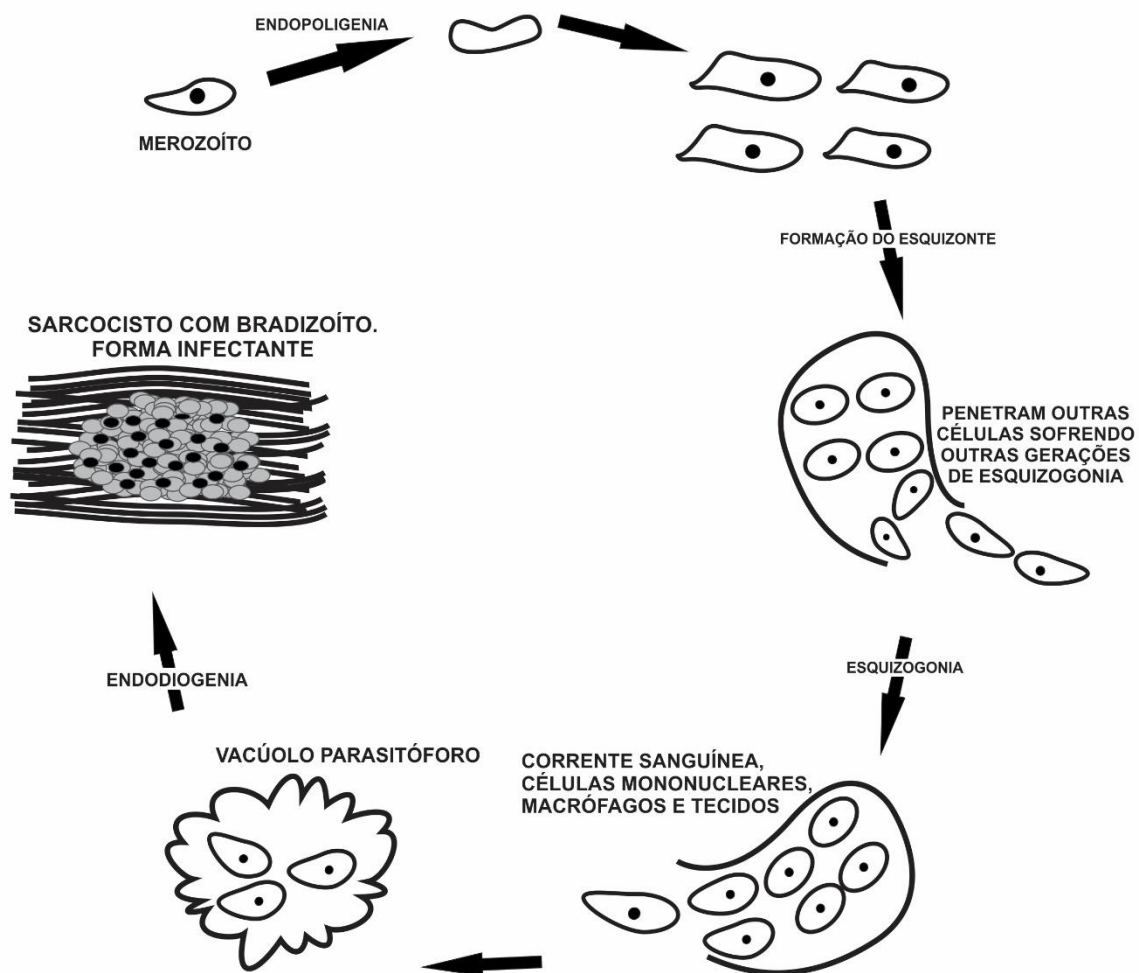


Figura 2. Ciclo de vida do gênero *Sarcocystis* evidenciando a fase endógena (reprodução assexuada do protozoário: endopoligenia, esquizogonia e endodiogenia) que ocorre nos hospedeiros intermediários finalizando com a formação do cisto na musculatura.

3.1.3 Ciclo de vida – período pré patente

Dubey et al., (2000), conduziram um experimento com espécies de *Sarcocystis* liberados por gambás, onde estes começaram a eliminar oocistos de *S. neurona* onze a treze dias após a ingestão de tecidos de gatos experimentalmente infectados, em outro experimento onde os gambás ingeriram sarcocistos de *S. falcatula* em tecidos de chupim-cabeça-castanha, *Molothrus ater*, o período pré-patente foi de sete a dezesseis dias (PORTER et al., 2001). Neste último experimento com o *S. falcatula* os gambás eliminaram esporocistos até serem eutanasiados, cerca de duzentos dias após a infecção.

3.1.4 Diagnóstico

As formas encontradas no hospedeiro definitivo são os esporocistos principalmente na mucosa do duodeno e jejuno, ausentes no intestino grosso. Estas formas são eliminadas juntamente com as fezes e podem ser observadas em exames de fezes de rotina, mas são de difícil diagnóstico por serem eliminados juntamente com a descamação normal da mucosa. (PORTER et al., 2001). Histologicamente, a parede do cisto pode ser lisa, estriada ou filamentosa, e ainda pode possuir complexas projeções ramificadas. Em seu interior os grupos de bradizoitos são divididos entre compartimentos por septos que se originam da parede do sarcocisto e podem não ser compartimentalizados. Septos são presentes na maioria das espécies de *Sarcocystis* (DUBEY, 1992). A estrutura da parede é útil na classificação das relações filogenéticas entre os hospedeiros, como forma de exemplificar Dubey et al., (1989) concluíram que todas as espécies de *Sarcocystis* encontradas em ovinos e caprinos possuíam grande semelhança na parede do cisto.

Os parasitos do gênero *Sarcocystis* comumente não são patogênicos para seus hospedeiros definitivos (DUBEY, 1976). Contudo, Porter et al. (2001) relataram a hiperplasia das criptas e a hipertrofia do epitélio intestinal de gambás (*Didelphis virginiana*), ainda acrescentaram no seu relato o infiltrado eosinofílico na

lâmina própria da vilosidade, principalmente nas áreas de maior concentração dos esporocistos.

Os métodos de diagnóstico molecular vêm sendo amplamente utilizados no estudo do gênero *Sarcocystis* na tentativa de esclarecer pontos previamente destacados como os aspectos coevolutivos, relação parasito hospedeiro biologia do parasito e diferenciação de espécies morfológicamente iguais (MUDRIDGE et al., 2000; PRAKAS et al., 2011).

3.1.5 *Sarcocystis* de gambás

Dentro do gênero *Sarcocystis* existe uma considerável desordem envolvendo a identidade de espécies de parasitos de gambás. STILES (1893) apud DUBEY et al., (2001a), descreveu *S. falcatula* baseando-se na estrutura do sarcocisto de um pardal-do-norte de peito rosa (*Pheucticus ludovicianus*). Box; Smith (1982) e Box et al., (1984) redescreveram *S. falcatula*, baseados no estudo do ciclo de vida e na variação de hospedeiros experimentais que foram infectados, dentre eles pássaros da espécie *Molothrus ater*, periquitos australianos (*M. undulados*), mandarins diamante (*Poephila guttata*), canários (*Serinus canarius*), pardais (*Passer domesticus*) e pombos (*Columba livia*). *Sarcocystis falcatula* era a única espécie conhecida do gênero que usava a *D. virginiana* como hospedeiro definitivo. O *S. neurona* foi identificado por Dubey et al. (1991) e Dubey; Lindsay (1998) e considerado como o maior causador de doença neurológica em cavalos americanos. *Sarcocystis speeri* foi identificado posteriormente por Dubey; Lindsay (1999) em *D. virginiana*. Embora sejam muito similares no DNA ribossomal o *S. falcatula* e *S. neurona* inicialmente sugeriram ser apenas uma espécie (DAME et al., 1995) e análises mais aprofundadas feitas por Tanhauser et al., 1999 puderam diferenciá-las. Com relação ao *S. lindsay* ele se assemelha ao *S. falcatula*, porém seu hospedeiro intermediário natural e ciclo de vida completo não são conhecidos necessitando de maiores estudos (DUBEY et al., 2001).

3.2 GAMBÁ

Os marsupiais representam um dos três principais grupos atuais de mamíferos e têm como característica uma gestação curta e lactação prolongada. São animais pouco sociáveis, somente na época da reprodução formam casais e constroem ninhos com folhas e galhos secos em buracos de árvores. Reproduzem-se três vezes ao ano em gestação de 12 a 14 dias, com ninhada de 10 a 20 filhotes cada. Como todo marsupial os filhotes nascem ainda embriões e são direcionados para o marsúpio onde ocorre uma soldadura da boca a região distal do mamilo. Os filhotes permanecem no marsúpio até quatro meses e, quando crescem são transportados pela mãe em seu dorso. Os gambás do Brasil são animais com 40 a 50 centímetros de comprimento, sem contar com a cauda, que chega a medir 40 centímetros. Tem um corpo parecido com o do rato, incluindo a cabeça alongada, com uma dentição poliprotodonte, ou seja, possui mais de dois incisivos na mandíbula inferior (fórmula dental: 5/4, 1/1, 3/3, 4/4 = 50). A cauda tem pêlos apenas na região proximal, é escamosa na extremidade e é preênsil, ou seja, tem a capacidade de enrolar-se a um suporte, como um ramo de árvore (GARDNER, 2007; FINNIE, 1986).

3.2.1 Taxonomia

Marsupialia é um grupo que constitui aproximadamente 331 espécies dentro de 92 gêneros. A Infra classe Marsupialia está dividida em sete ordens das quais são: Dasyuromorphia, Didelphimorphia, Diprotodontia, Microbiotheria, Notoryctemorphia, Paucituberculata, Peramelemorphia. Os marsupiais da América do Sul são considerados os mais antigos mamíferos terrestres do mundo. Eles pertencem a ordem Didelphimorphia (FINNIE, 1986). A ordem Didelphimorphia constitui a grande maioria dos marsupiais americanos vivos, com a distribuição geográfica indo desde o leste do Canadá ao sul da Argentina (NOWAK, 1999). Hershkovitz (1992) distinguiu quatro Famílias dentro da Ordem entre estas famílias estão: Caluromyidae, Didelphidae, Glironiidae e Marmosidae.

Na família Didelphidae é encontrado o gênero *Didelphis* termo de origem grega derivado de *di* (dois) e *delphys* (útero) em referência ao trato reprodutivo da fêmea, este gênero é dividido em dois grupos. O grupo-*D. marsupialis* (gambá-da-orelha-preta) que consiste em duas espécies alopátricas, *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 e *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826; grupo-*D. albiventris* (gambá-da-orelha-branca) contém três espécies *Didelphis albiventris* Lund, 1840; *Didelphis pernigra* Allen, 1900; *Didelphis imperfecta*, Mondolfi e Perez-Hernández, 1984. Foram nomeadas diversas espécies e subespécies com base em pequenas variações, porém as variações são insuficientes para garantir um reconhecimento formal (GARDNER, 2005).

3.2.2 Biologia

Estes animais são extremamente adaptáveis aos mais diferentes ambientes, e são considerados um sucesso evolutivo de acordo com Gardner (2007). As espécies do gênero *Didelphis* são onívoras e encontradas em habitats variados, como florestas, áreas de matas e próximos a cursos de água. São essencialmente terrestres, mas escalam com ótima facilidade. São nômades, com hábitos solitários, sendo difícil definir seu território, pois percorrem longas distâncias e permanecem em uma área por um período relativamente curto, deste modo são excelentes disseminadores de patógenos. Os predadores destes animais incluem as grandes aves de rapina e todos os carnívoros (FINNIE, 1986)

A forma anatômica que possibilita a distinção dos marsupiais de outros mamíferos é a presença da bolsa marsupial que consiste numa dobra de pele que recobre os filhotes durante o desenvolvimento (FINNIE, 1986). Nos gambás essa bolsa é sustentada por dois ossos que se originam da pelve denominado como epipúbis. O trato reprodutivo da fêmea possui óvarios, ovidutos, úteros e cérvix duplos que são completamente separados. Cada útero tem sua abertura separada para o saco vaginal por um septo medial. Os tratos digestório, urinário e reprodutor apresentam uma abertura externa única, denominada cloaca. A temperatura desses animais é considerada mais baixa quando comparada a outros mamíferos,

variando entre 17-37°C, sendo influenciada pela temperatura ambiente, excitação e atividade (HUNSAKER, 1977).

3.2.3 Distribuição geográfica

Existem apenas três espécies de gambás no Brasil: *D. albiventris*, de orelha branca, encontrado no cerrado, na caatinga e no pantanal; *D. aurita*, orelhas pretas, presente na Mata Atlântica; e *D. marsupialis*, orelha preta, oriundo da Amazônia (GARDNER, 2007). A estimativa da distribuição geográfica dos gambás está ilustrada na Figura 3.

A distribuição geográfica de *D. albiventris* inclui as porções lestes e centro-oeste, Paraguai, Uruguai, as regiões norte e central da Argentina e sul da Bolívia. Tem como hábito florestas abertas e decíduais do nordeste do Brasil percorrendo até os meados da Argentina, incluindo áreas de baixa chuva e irregular tal como a Caatinga e Deserto do Monte (CERQUEIRA, 1985). Nas áreas úmidas como a Mata Atlântica e Araucária é substituído pelo *D. aurita*, na floresta amazônica por *D. marsupialis* (CERQUEIRA; LEMOS, 2000; BROWN, 2004; GARDNER, 2007).

Didelphis imperfecta, embora presente na América do Sul, somente são vistos a partir de populações isoladas no sul do Rio Orinoco, na Venezuela, bem como no Suriname e Guiana Francesa, regiões adjacentes ao território Brasileiro. Um outro gambá também não encontrado no Brasil é o *Didelphis pernigra*. Este habita, principalmente, as encostas florestadas da Cordilheira dos Andes, através do Equador e Peru até a Bolívia (GARDNER, 2007).

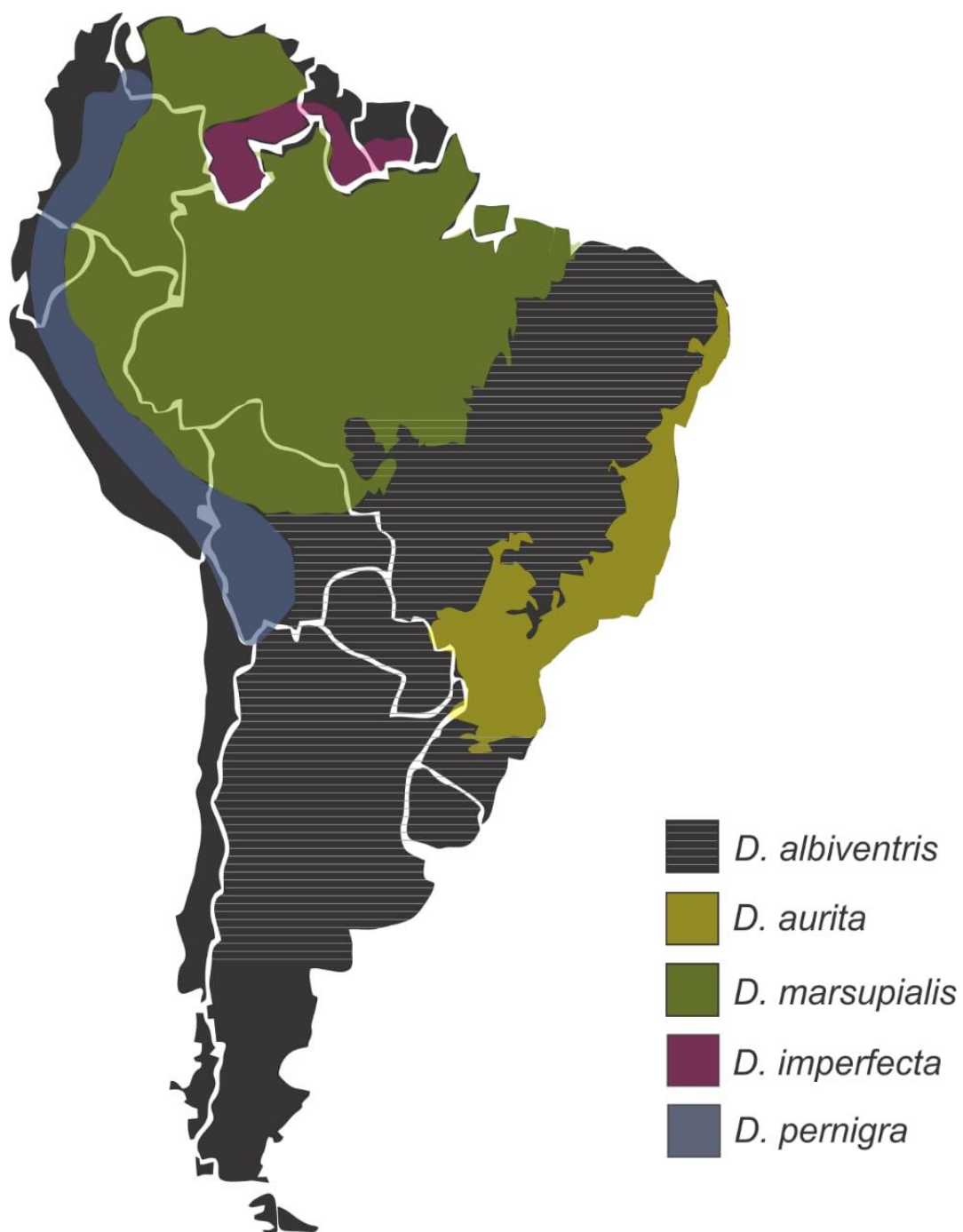


Figura 3. Distribuição geográfica de gambás da família Didelphidae na América do Sul, baseado em Cerqueira; Lemos (2000), Brown (2004) e Gardner (2007).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

O estudo do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) se iniciou em 1869, quando Johann Friedrich Miescher, analisou células encontradas no núcleo de linfócitos, denominando nucleína, com características ácida e solúvel em soluções alcalinas diluídas. Com isso Miescher determinou a composição química que seria rica em oxigênio, nitrogênio e fósforo. Mais tarde essa descoberta serviria de base para a denominação de “ácidos nucleicos” (DUCLOS, 2004; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Procurando esclarecer a estrutura e os princípios do seu funcionamento o biólogo James D. Watson e o físico Francis H. C. Crick em 1953, propuseram o modelo molecular que levasse em conta o tamanho e a configuração dos nucleotídeos. Assim, através de estudos de difração de raios X, Watson e Crick revelaram que a molécula de DNA é um composto orgânico formado em espiral por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em uma dupla hélice como observado na figura 4 (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os nucleotídeos são polímeros lineares formados por um grupo fosfato, base nitrogenada purina (adenina e guanina) e pirimidina (timina, uracila e citosina) e uma pentose, que podem ser a ribose que compõem o RNA (ácido ribonucleico), ou a desoxirribose que compõem o DNA. A formação estrutural dos nucleotídeos do DNA, são moléculas com bases nitrogenadas ligadas entre si (timina com adenina e citosina com guanina) internamente por pontes de hidrogênio e os grupos de fosfato carregados negativamente voltados para fora da molécula. Assim, temos o corpo da molécula de DNA constituído por nucleotídeos de base nitrogenada açúcar-fosfato e as ligações fosfodiéster entre eles na direção 3'-5' (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Componentes celulares que possuem bases purínicas ou pirimidínicas, absorvem luz ultravioleta (UV). As bases purínicas e seus derivados absorvem luz UV num grau maior do que as bases pirimidinas e seus derivados. O comprimento aproximado de 260nm, é a absorção máxima de uma onda desses compostos. Com isso, se utiliza a medida de absorbância nesse mesmo comprimento de onda para a quantificação de DNA e RNA (GARCIA; MACEDO, 2007).

A elucidação estrutural do DNA foi um marco na biologia, sendo responsável pelo surgimento da biologia molecular (SILVA, 2010; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

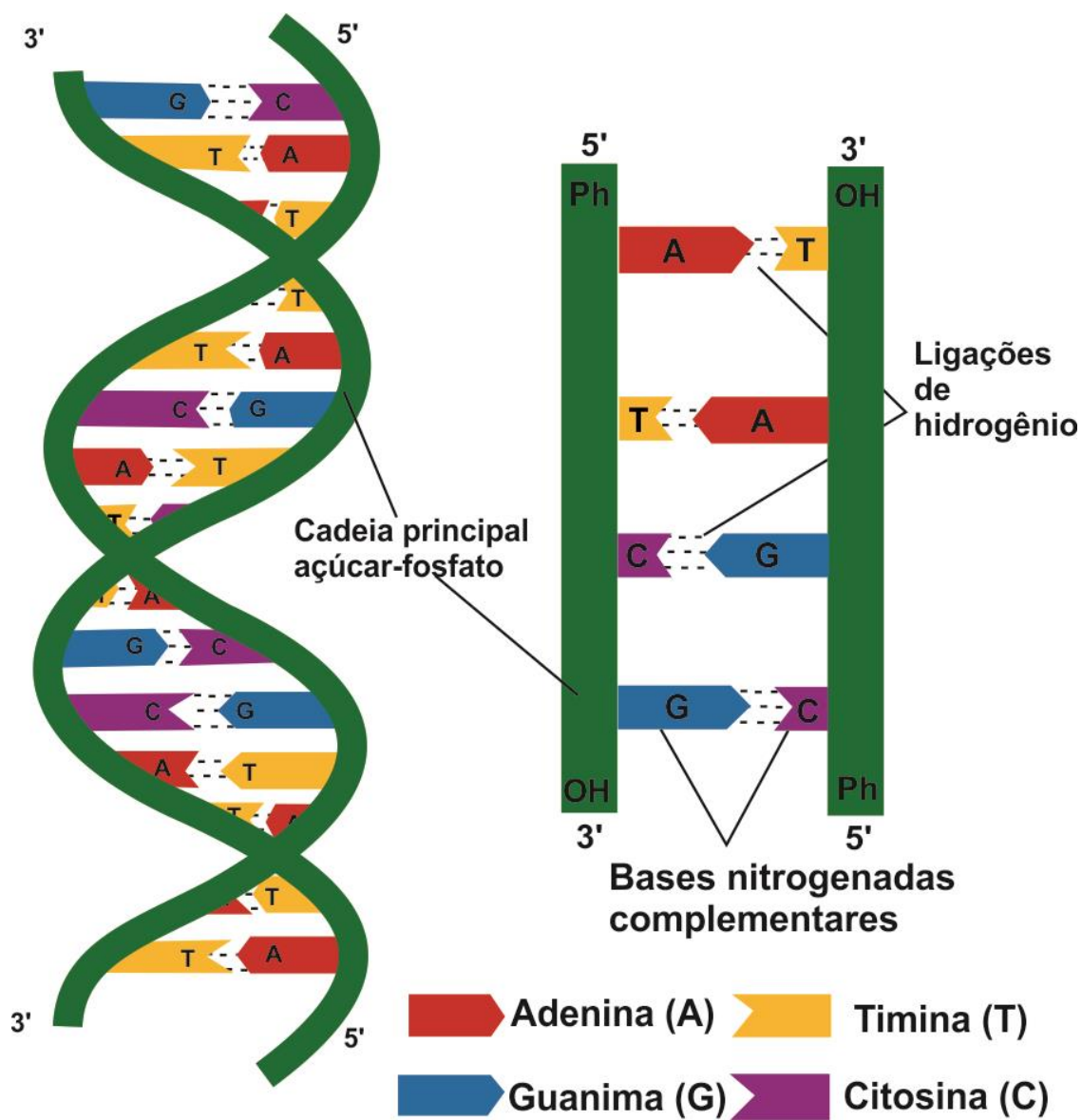


Figura 4. Modelo em espiralado DNA, com bases nitrogenadas ligadas entre si (timina com adenina e citosina com guanina) internamente por pontes de hidrogênio.

3.4 CONSERVAÇÃO DO DNA NOS TECIDOS

A instabilidade dos ácidos nucléicos varia com o tipo de tecido a ser extraído o DNA. Em geral as amostras que permaneceram em temperatura ambiente são descartadas para a análise molecular, devido a degradação de proteínas e consequentemente do próprio DNA. O ideal é que se faça o uso do congelamento em nitrogênio líquido ou colocar o tecido em uma solução de preservação de ácidos nucléicos como os etanóis. Entretanto, a viabilidade de se ter em mãos tais materiais dificulta o processo, a alternativa mais viável então, é manter a amostra de tecido em uma caixa isotérmica com gelo e transporta o material neste ambiente refrigerado até o laboratório para uma melhor preservação dos ácidos nucléicos (MELO et al., 2010).

No processo de congelamento o DNA é preservado, visto que, o processo de congelamento consiste em diminuir a temperatura acarretando a solidificação da água no meio intracelular. Com isso terá o acúmulo de água fora da célula através do processo de osmose, provocando o encolhimento dessa célula. Com a queda da temperatura há o congelamento da água no meio extracelular formando cristais (Figura 5). Quando esta célula for descongelada, a água retorna pro meio intracelular mantendo a integridade da célula (Figura 6) e consequentemente preservando o DNA (ALVES; GUIMARÃES, 2010; NAGY, 2010).

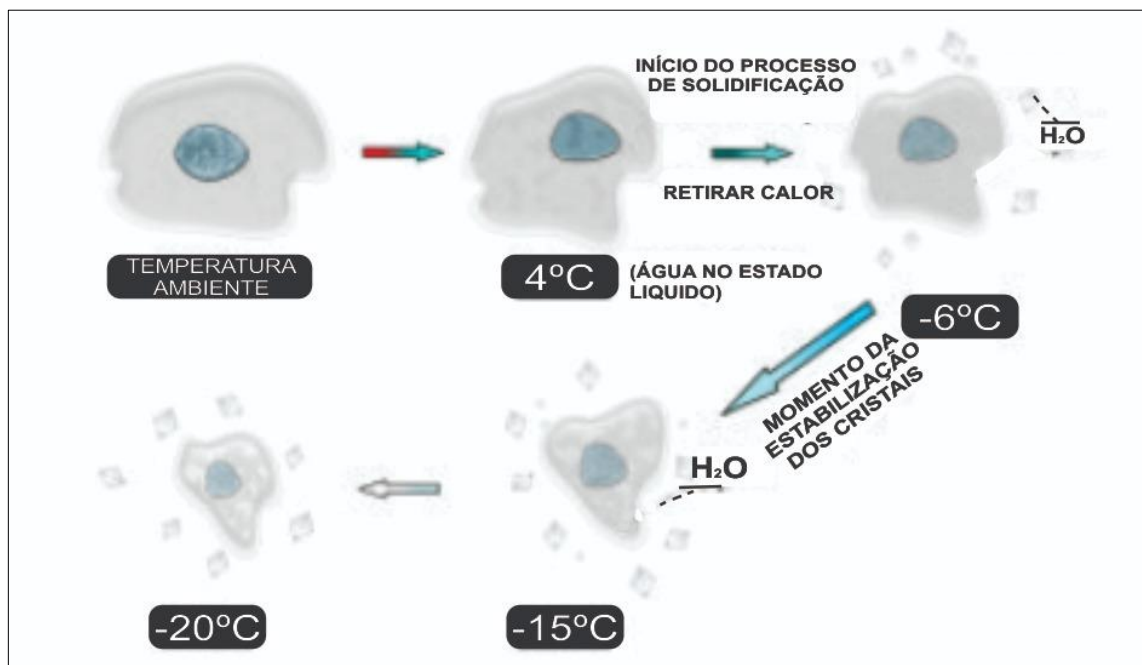


Figura 5. Esquema de congelamento da célula mostrando o acúmulo de água fora da célula, através do processo de osmose, provocando o encolhimento desta e formando cristais no meio extracelular.

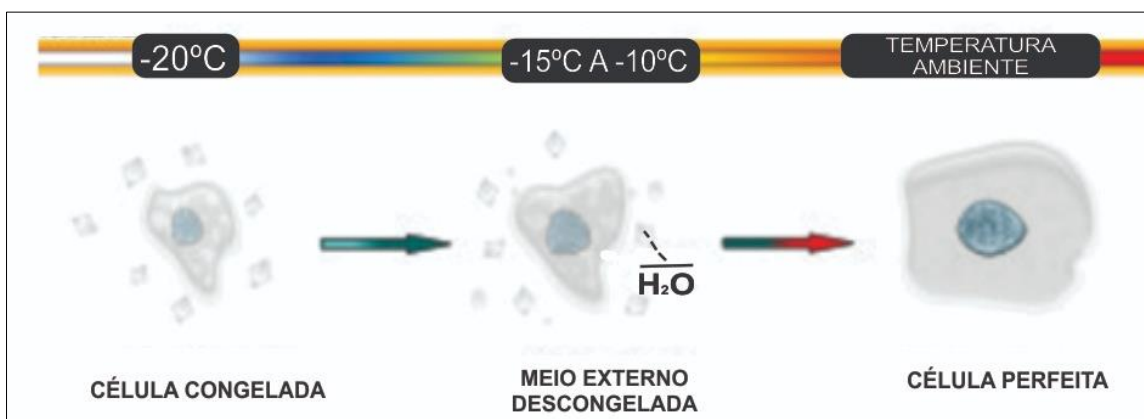


Figura 6. Esquema de descongelamento da célula mostrando a água retornando pro meio intracelular mantendo a integridade da célula.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

O projeto foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária (CCTA) situados no Hospital Veterinário (HVET) da Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Raspado intestinal, prova biológica e PCR foram realizado no NUPAP e a histologia dos tecidos no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA).

4.2 ORIGEM DOS ANIMAIS

Os gambás, *D. aurita*, em número de cinco, foram capturados no município de Campos dos Goytacazes-RJ de acordo com a autorização SISBIO nº 46839-2 e denominados 102, 111, 112, 132 e 174 de acordo com o número da ficha de necropsia do NUPAP.

Um total de 13 periquitos australianos, *M. undulatus*, obtidos em criatórios comerciais localizados no mesmo município foram divididos em dois grupos que receberam os inóculos com o número de esporocistos padronizados. A eutanásia dos mesmos fora realizada de acordo com a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), em conformidade com a Lei Estadual nº 3900/02, com aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da UENF sob o número 290.

4.3 OBTENÇÃO E MORFOMETRIA DOS ESPOROCISTOS

As mucosas dos intestinos delgados dos cinco gambás foram raspadas para obtenção dos esporocistos retidos na lâmina própria (DUBEY et al., 1999a; PORTER et al., 2001). Para tanto, estas foram maceradas em gral com pistilo e depositadas em Becker de 300 ml onde foram adicionados hipoclorito de sódio aquoso a 10% até completarem 200 ml.

A digestão química foi realizada em agitador magnético (MEDINGEN SITZ FREITAL, modelo 2374, Brasil) por 10 minutos.

Após esse processo, o material foi passado em tamis (peneira de chá) forrada com gaze dupla e o filtrado depositado em quatro tubos cônico de 50 ml e centrifugado por três minutos em 3.500 rpm (Centrífuga SpinLab, Modelo SL5M, Alemanha) descartando-se o sobrenadante e suspendendo o “pélet” com solução salina tamponada (PBS), por três vezes, para remoção do hipoclorito residual.

Os esporocistos foram estocados em um único tubo à temperatura de refrigeração (8 a 10 °C), até o momento da padronização, inoculação e análise molecular (DUBEY et al., 1999b).

A mensuração dos esporocistos do raspado intestinal foi realizada em microscópio binocular modelo Axion Vision Plus® (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) equipado com câmera digital CANON modelo Power Shot A640 para captura de imagens e foi utilizado o Software Zeiss Axio Vision Sample Images, para análise das imagens.

4.4 CONTAGEM DOS ESPOROCISTOS

O número de esporocistos presente em cada tubo foi contado a partir de uma alíquota de 20µl de suspensão de estoque. Esta foi colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio binocular modelo Axion Vision Plus® (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) em aumento de 400x.

O número foi obtido de acordo com a metodologia descrita por OLIVEIRA et al. (2001), para contagem de oocistos de *Cystoisospora ohioensis*, pela fórmula

$h = n.50.v$, onde “h” é o número de esporocistos desejado no inóculo, “n” é o número de esporocistos contidos na alíquota de 20 µl, 50 é a correção para 1000 µl e “v” o volume total da amostra em ml.

4.5 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

O número de esporocistos inoculados em cada periquito foi padronizado em inóculos com 60 e 120 esporocistos a partir da fórmula $h=n.50.v$, onde o conteúdo pipetado foi estocado em tubo do tipo eppendorf de 2,5 ml completando-se o volume de 1ml com solução fisiológica a 0,9% para cada tubo.

Devido a morte precoce do periquito inoculado com 60 esporocistos (amostra A), foi realizado uma nova inoculação (amostra 102²). O número de esporocisto que cada grupo recebeu pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1. Demonstrativo do número de esporocistos que serão depositados diretamente no Inglúvio (papo) dos periquitos australiano, *Melopsittacus undulatus* (P).

GRUPOS	AMOSTRAS/INÓCULOS ¹					
	102	102 ²	111	112	132	174
P 1	60	60	60	60	60	60
P 2	120	-	120	120	120	120
TOTAL	360	60	360	360	360	360
CONTROLE ³	Solução fisiológica a 0,9%					

¹Oriundo de raspado de mucosa intestinal de gambás, *Didelphis aurita*.

²Reinoculação de inóculo devido a morte precoce da ave inoculada.

³Foram utilizados dois periquitos como controle.

4.6 PROVA BIOLÓGICA

Periquitos australianos, *M. undulatus*, obtidos de cativeiro comercial foram mantidos em isolamento por 24 horas recebendo água e alimento *ad libitum*, sendo

inoculados dois periquitos por amostra (Tabela 1). Para isso, cada animal recebeu 1ml da solução fisiológica contendo esporocistos. Os inóculos depositados diretamente no ingluvío (papo) das aves com auxílio de uma sonda de gavagem, e cada grupo foi mantido separadamente em gaiolas próprias para a criação da espécie.

As aves que vieram a óbito ou foram eutanasiadas, foram necropsiadas e evisceradas, sendo coletadas amostras de pulmão, língua, fígado, cérebro, coração e musculatura estriada esquelética.

Para retardar o efeito *post mortem* dos tecidos para análise histopatológica, as amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10% em um volume 20 vezes maior em relação ao tecido a ser fixado.

Para a análise molecular estes mesmos tecidos foram armazenados com etanol absoluto a -20°C e outra amostra dos mesmos tecidos, armazenadas sem nenhum conservante, apenas em temperatura de congelamento de -20°C.

4.7 HISTOLOGIA

Todos os órgãos coletados na necropsia e que obteve-se resultados positivos na PCR fez-se a avaliação histopatológica, para tanto, as amostras fixadas em formol, foram clivadas em fragmentos menores de 2-3 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos devidamente identificados, e posteriormente passaram pelo processo de desidratação no processador automático (Leica® TP1020), com cinco banhos sequenciais de álcool etílico em concentrações de 70%; 90%; e os últimos três banhos com álcool absoluto por cerca de uma hora cada banho.

Por seguinte, sofreram o processo de clarificação, realizado em dois banhos de imersão em xilol, uma hora cada banho. Após este processo as amostras nos histossetes foram embebidas por imersão em dois banhos, de trinta minutos cada, em parafina histológica a 60°C (PROPHET et al., 1994).

Finalizado o processo de imersão em parafina, o material fora incluído manualmente com auxílio de um dispensador de parafina e de moldes metálicos.

Após solidificados, os blocos formados passaram pela resfriamento e cortados em seções de 5µm de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145).

Os cortes obtidos foram direcionados para banho-maria para se distenderem. Feito isto, os cortes permaneceram separados individualmente em grupos de cada animal correspondente ao corte, e direcionados para estufa a 60°C para secagem.

Concluída a etapa de secagem, as lâminas foram então hidratadas com uma sequência de banhos em xilol, etanol e água. A coloração utilizada foi hematoxilina e eosina e depositada uma gota de resina líquida e uma lamínula sobre o corte histológico.

As lâminas foram analisadas em microscópio modelo Axion Vision Plus® (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Alemanha) equipado com câmera digital CANON modelo Power Shot A640 para captura de imagens e utilizado o Software Zeiss Axio Vision Sample Images para análise das imagens e mensuração dos sarcocistos.

4.8 BIOLOGIA MOLECULAR

Os esporocistos oriundos da raspagem da mucosa intestinal e estocados em temperatura de refrigeração e os tecidos coletados nas necropsias dos periquitos foram utilizados para o diagnóstico molecular utilizando a técnica de amplificação.

4.8.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen®) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Para tanto, as amostras teciduais foram cortadas em 25 mg de cada tecido, previamente mantidos em álcool absoluto a -20°C e outra amostra mantida apenas a -20°C sem álcool absoluto. Depositadas em um eppendorf de 1,5 mL, adicionados 180 µL de Tampão ATL e 20 µL de proteinase K nas amostras, em seguida, homogeneizadas no agitador.

Após o processo de homogeneização, as amostras foram incubadas a 56°C até lise do tecido. Completando estes processos, as amostras sofreram por mais uma homogeneização em vortex durante 15 segundos e, em seguida, foram adicionados 200 µL de Tampão AL.

Cada amostra foi submetida a uma nova homogeneização e incubada a 70°C por 10 minutos. Findado isto, foram adicionados 200 µL de álcool (96–100%) em cada tubo de amostra, e o conteúdo transferido para uma coluna DNeasy Mini spin, colocada em tubo de 2 mL. Cada coluna centrifugada a 6000g (8000 rpm) por um minuto e logo após o tubo de 2 mL foi descartado.

As colunas DNeasy Mini spin foram posicionadas em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW1, e submetidas a nova centrifugação por um minuto a 6000g (8000 rpm) e novamente descartado o tubo de 2 mL. Cada coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW2, e centrifugados dessa vez por três minutos a 20000g (14000 rpm) com a finalidade de secar a membrana da coluna DNeasy.

O tubo de 2 mL foi novamente descartado e as colunas DNeasy Mini spin foram colocadas em um tubo novo de 1,5 mL, e adicionados 100 µL de Tampão AE diretamente da membrana da coluna DNeasy. Após um minuto de incubação em temperatura ambiente, passaram por outro processo de centrifugação por um minuto a 6000g (8000 rpm) e direcionadas para o armazenamento sob refrigeração.

Para a extração de DNA dos esporocistos foi utilizado o mesmo kit seguindo o protocolo como descrito acima com algumas modificações de acordo com Santín et al. (2004).

4.8.2 Reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR utilizada foi com amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA. As sequências de iniciadores utilizados serão: ITS-18S9L (5'-GGATAACCTGGTAATTCTATG-3') e ITS-18S1H (5'-GGCAAATGCTTTTCGCAGTAG-3') descritas no trabalho de Holmdahl et al. (1994) utilizado para identificação do gênero *Sarcocystis*.

No procedimento de amplificação foi utilizado 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega®, USA), 0,5 µL de cada um dos iniciadores (10 pmol) e 1 µL de DNA em um volume final de 25 µL.

Para a amplificação com os iniciadores ITS-18S9L e 18S1H foi feito o seguinte ciclo no termociclador: 97°C/3 min; 40 ciclos de 94°C/40s, 56°C/60 s e 72°C/80s e uma extensão final de 72°C/5 min (HOLMDAHL et al.,1994). A amplificação resultada um produto de 900 pb.

Todos os ciclos foram realizados no termociclador Eppendorf AG, 22331 Hanburg, Mastercycler®, Alemanha.

4.8.3 Análise da PCR

Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal. A fonte foi regulada em 90 volts, 200 miliamperes e 80 minutos e o controle positivo de amostras estocadas no laboratório.

A visualização das bandas foi realizada na foto documentadora (Gel Logic 212 PRO) e software apropriado para leitura. Após realizada a corrida eletroforética, os tamanhos dos fragmentos foram comparados com marcador molecular TrackIt de 100 pb (Invitrogen®, EUA).

4.8.4 Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®, EUA) e seu respectivo software. O aparelho foi calibrado com o tampão de eluição do kit de extração de DNA e determinada as concentrações e as relações 260/280.

Outro método de quantificação utilizado foi realizado em gel de agarose a 1% utilizando a comparação do DNA total com a de concentração do DNA lambda (500 ng/µl) (Invitrogen, USA). Para tanto foi utilizado o DNA extraído dos tecidos dos

periquitos australianos que amplificaram na PCR. O gel foi incluso no erlenmayer 200ml de tampão TBE 1x, aquecendo a solução até obter a aparência translúcida, e resfriando até a temperatura de 40°C, vertendo a solução na cuba de eletroforese. Adicionou-se 5,0 µl de água ultrapura e 3,0 µl de solução tampão de carregamento fluorescente não tóxico e 2,0 µl do DNA. O gel foi submetido à uma corrida eletroforética em migração por unidade de campo elétrico em gel de agarose na cuba letrolítica, com duração de 20 minutos a 100 V. Posteriormente o gel de agarose com a amostra de DNA, foi transferido para o transluminador UV para que as sequencias de DNA fossem visualizadas na presença de luz ultravioleta, para quantificar as amostras. Após este processo, a foto da corrida eletroforética foi aplicada no software Gelquant version 2.7.0 2003.

4.9 ESTATÍSTICA

Foram feitas análises de medidas de tendência central como média, desvio padrão, máximo e mínimo dos valores aferidos, relativos as medidas aferidas dos esporocistos e cistos isolados de raspado de intestino delgado dos gambás e tecido dos periquitos, respectivamente, utilizando o software Excel 2010.

Foi também avaliado a eficiência do diagnóstico da PCR entre os meios de conservação, com ou sem a utilização de álcool, através do teste do χ^2 .

A comparação da quantidade de DNA entre os tecidos, tipos de preservação e método de quantificação foi realizada com análise de variância (ANOVA) (aov, pacote básico, R Core Team, 2019) assumindo um intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa R (R Core Team, 2019).

Os dados foram transformados em logaritmo para atender as premissas da ANOVA, usando a função de máxima verossimilhança (boxcox, MASS package, Venables; Ripley, 2002) de modo que a assimetria e os outliers não interferissem no teste.

5. RESULTADOS

Após a digestão química da mucosa intestinal dos cinco gambás foram observados oocistos e esporocistos em diversas fases de desenvolvimento e de formatos elipsoides. Internamente, os esporocistos continham quatro esporozoítos e resíduos que variaram no tamanho e quantidade (Figura 7).

A morfometria dos esporocistos (Tabela 1) foi compatível aos do gênero *Sarcocystis*. Após extração, quantificação do DNA (Tabela 1) e PCR (Figura 8) estes foram caracterizados como de *Sarcocystis* spp.

A partir da contagem do número de esporocistos em uma alíquota de 20µl de cada amostra (Tabela 2), foi possível padronizar os inóculos contendo 60 e 120 esporocistos em 1000 µl (Tabela 2).

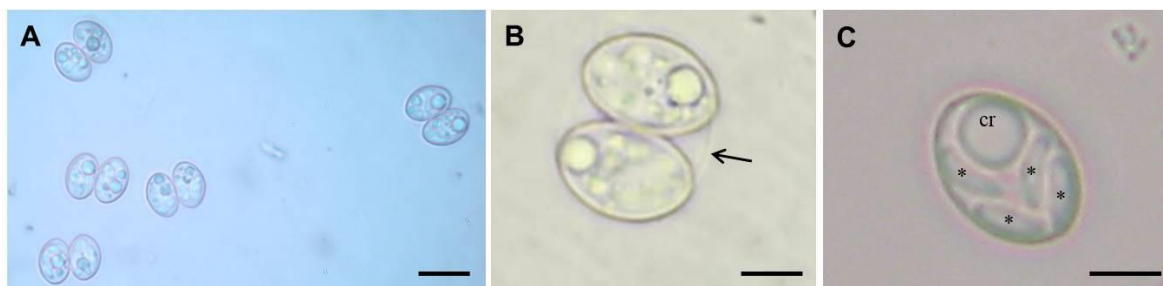


Figura 7. Oocisto e esporocistos provenientes da digestão química de raspados de mucosa de gambás (*Didelphis aurita*), utilizando hipoclorito de sódio a 10%. Em (A) observa-se vários oocistos em diversas fases de desenvolvimento; em (B) a seta destaca a tênue par.

Tabela 1. Quantificação do DNA extraído de esporocistos de *Sarcosystis* spp., oriundo de raspado de mucosa de gambá, *Didelphis aurita* contidos em uma alíquota de 1 μ l de cada amostra, utilizando espectrofotômetro.

ESPOROCISTOS				
	n	Medidas em μ m		Quantificação
		Comprimento	Largura	DNA (Ng/ μ l)
102	200	11,20 \pm 0,62 (12,79-9,62)	7,72 \pm 0,62 (9,14-3,78)	8,9
111	200	10,97 \pm 0,53 (12,76-9,31)	7,31 \pm 0,44 (8,94-5,94)	2,5
112	200	11,31 \pm 0,51 (13,35-10,32)	7,63 \pm 0,49 (9,64-6,48)	8,8
132	200	11,13 \pm 1,17 (13,56-7,66)	7,84 \pm 0,74 (10,13-6,11)	9,4
174	200	11,46 \pm 1,44 (15,63-7,03)	8,0 \pm 0,97 (10,9-5,8)	6,8
TOTAL	1000	11,20 \pm 0,9 (7,00-15,6)	7,7 \pm 3,8 (3,8-10,9)	-

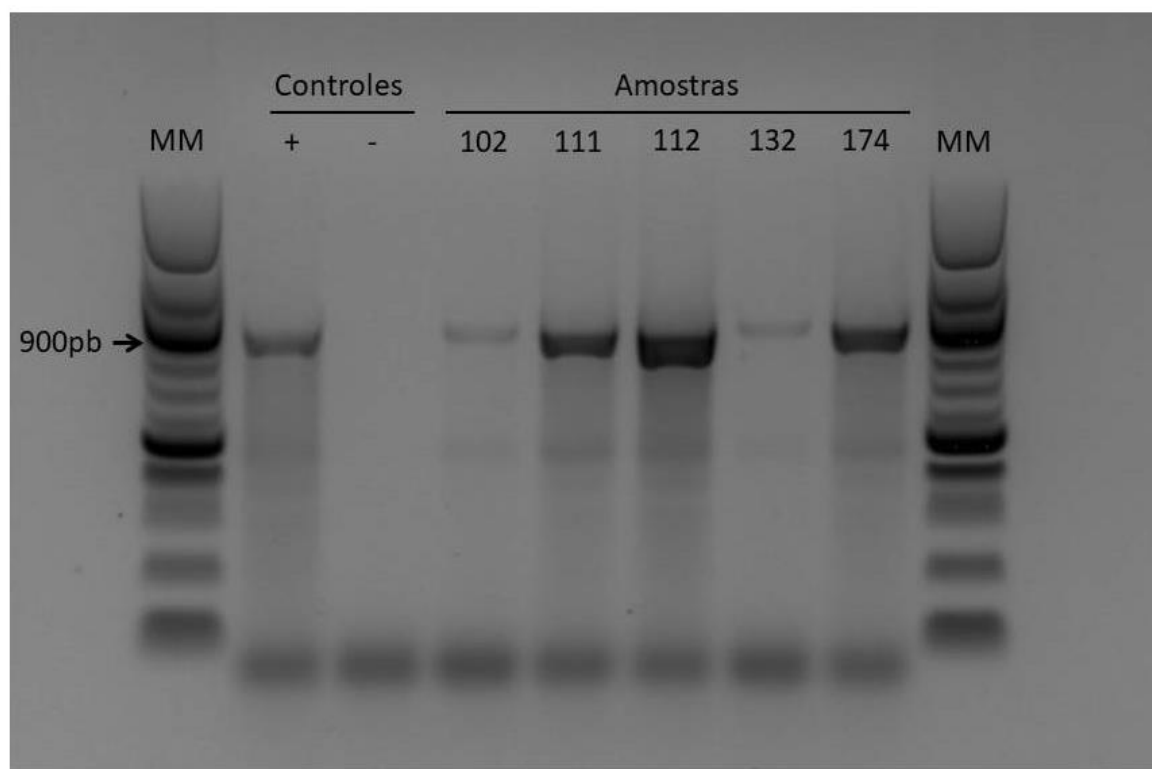


Figura 8. Corrida eletrofórica em gel de agarose 1% dos produtos da PCR, utilizado o primer ITS 18S 9L/1H que amplifica sequência de *Sarcosystis* spp. em 900pb (seta). (MM) marcador de peso molecular de 1000pb, controles positivos e negativos e amostras de “amp amplicons” de DNA extraídos de esporocistos oriundos de rapados intestinais de gambás (*Didelphis aurita*).

Tabela 2. Quantitativo de esporocistos contidos em cada amostra analisada após a realização da digestão química do raspado da mucosa intestinal de gambás *Didelphis aurita* e padronização dos inóculos de 1000 µl, contendo 60 e 120 esporocistos por amostra que fora foram utilizados na infecção experimental (bioprova) em periquitos australianos, *Melopsittacus undulatus*.

AMOSTRAS		PADRONIZAÇÃO EM 1000 µl		
Raspado	Esporocistos/20µl	Nº de esporocistos	Pipetado	Solução Fisiológica
102	436	60	2,75	997,25
		120	5,50	994,50
111	282	60	4,25	995,75
		120	8,51	991,49
112	420	60	2,85	997,15
		120	5,71	994,29
132	619	60	1,93	998,07
		120	8,87	996,13
174	228	60	5,26	994,74
		120	10,50	989,50

Dos 13 periquitos inoculados, em apenas um foi observado desconforto devido à dificuldade respiratória, seguido de espirros. Secreção nasal e expectoração foram observadas levando a suspeita de regurgitação do inóculo e brônquio aspiração.

Nos dias seguintes, esta ave apresentou cansaço, apatia, penas arrepiadas e asas caídas, além de anorexia. Esta ave morreu 12 Dias Após Inoculação (DAI) e no exame histopatológico confirmou-se o diagnóstico da causa morte, como pneumonia por brônquio aspiração.

Para substituição uma nova ave foi inoculada, com a mesma quantidade de esporocistos (Tabela 3) e esta não apresentou qualquer anormalidade nos dias seguintes a infecção, no entanto, veio a óbito 42 DAI.

A infectividade dos inóculos variou de acordo com as amostras e dose infectante, levando em consideração a morte da ave que brônquio aspirou e que morreu 12 DAI. Quatro periquitos morreram na 3ª semana, um 16 DAI e três 19 DAI, além destas, uma ave morreu 42 DAI e outras duas 108 DAI.

As outras três aves, duas inoculas com 120 esporocistos e uma com 60 esporocistos, bem como as duas aves controles, foram eutanasiadas 125 DAI. Estes dados podem ser melhor observados na Tabela 3.

Foram amplificados DNA do parasita em todos os órgãos dos periquitos experimentalmente infectados independente da conservação ou do tamanho do

inóculo (Tabela 4). Foi possível realizar um total de 69 amplificações do DNA do parasito (Tabela 4), no entanto no periquito 102 A, que morreu 12 DAI, por pneumonia por aspiração brônquica do inóculo, não foi amplificado o DNA do parasito em nenhum dos órgãos analisados (Tabela 4).

Não foi observada diferença nos métodos de conservação do DNA nos tecidos, uma vez que o número de amplificações do material conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ou sem imersão em álcool absoluto, não foram estatisticamente diferentes, tanto nos periquitos infectados com 60 ($p=0,1842$), como com 120 ($p=0,8109$) esporocistos respectivamente (Tabelas 5 e 6). Também não foi observado diferença estatística ($p=0,3309$) quando se considerou a análise dos periquitos infectados com ambas as doses infectantes, 60 e 120 esporocistos (Tabela 7).

Não foi observado uma pré-disposição do parasito por nenhum tecido específico ou algum órgão alvo do parasitismo, visto que não houve diferença estatística significativa ($p=0,9894$) na amplificação do DNA do parasito nos diferentes tecidos analisados (Tabela 8).

Na análise de preferência do parasito por tecidos específicos no hospedeiro intermediário, também não foi possível determinar preferência por musculatura ou vísceras, visto a não diferença estatística significativa ($p=0,4975$) quando comparados estes parâmetros (Tabela 9).

Foram observadas diferenças estatísticas na quantificação do DNA em gel de agarose entre o fígado e peito quando os tecidos foram conservados em álcool absoluto (Figura 9). Na comparação da quantificação do DNA levando-se em consideração os métodos de conservação verificou-se diferença estatística entre pulmão congelado e peito em álcool absoluto (Figura 9).

Na quantificação do DNA feita pelo “Nanodrop” foi observada diferença estatística entre pulmão e cérebro e entre fígado e cérebro armazenados congelados (Figura 10). Para o mesmo método de quantificação do DNA, em tecidos armazenados em álcool absoluto, foi observada diferença estatística entre fígado e peito (Figura 10). Ao relacionar os dois métodos de armazenamento dos tecidos, cérebro congelado, obteve uma quantidade significativamente menor de concentração de DNA comparado ao fígado armazenado em álcool absoluto. Também foram observados valores de DNA significativamente maior em fígado congelado que em coração, coxa e peito mantidos em álcool absoluto (Figura 10).

Tabela 3. Infectividade de amostras de *Sarcocystis* spp. isolados de raspados de mucosa intestinal de gambás, *Didelphis aurita*, em periquitos australianos, *Melopsittacus undulatus*.

INÓCULO/AMOSTRA	MORTE OU EUTANÁSIA APÓS INOCULAÇÃO							TOTAL
	SEMANAS				MESES			
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	2 ^o	3 ^o	(4 ^o) ¹	
60 Esporocistos								
102	-	12	-	-	-	-	-	1
(102) ²	-	-	-	-	42	-	-	1
111	-	-	-	-	-	-	125	1
112	-	-	16	-	-	-	-	1
132	-	-	-	-	-	108	-	1
174	-	-	19	-	-	-	-	1
CONTROLE	-	-	-	-	-	-	125	1
Total parcial		2	1		1	1	1	7
120 Esporocistos								
102	-	-	19	-	-	-	-	1
111	-	-	-	-	-	-	125	1
112	-	-	-	-	-	-	125	1
132	-	-	-	-	-	108	-	1
174	-	-	19	-	-	-	-	1
CONTROLE	-	-	-	-	-	-	125	1
Total Parcial			1		1	1	2	6
TOTAL GERAL		2	2		2	2	3	13

¹Semana onde foram feitas as eutanásias.

²Reinoculação devido a morte precoce da ave

Tabela 4. Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), com o resultado da amplificação do fragmento de DNA, de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp., utilizando o primer ITS 18S 9L/1H.

INÓCULO/ TECIDO	MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS														TOTAL GERAL
	ÁLCOOL ABSOLUTO (-20°C)							CONGELAMENTO (-20°C)							
	102 (A)	102 (B) ¹	111	112	132	174	TOTAL	102 (A)	102 (B)	111	112	132	174	TOTAL	
60 esporocistos															
Peito	-	-	+	+	+	+	4	-	-	-	-	+	-	1	5
Coxa	-	-	-	+	+	+	3	-	-	-	+	+	+	3	6
Cérebro	-	-	-	+	-	+	2	-	+	-	+	-	+	3	5
Língua	-	+	-	+	+	+	4	-	-	-	+	+	-	2	6
Fígado	-	-	-	+	-	+	2	-	-	-	+	-	+	2	4
Coração	-	-	-	+	+	+	3	-	-	-	+	-	-	1	4
Pulmão	-	-	-	+	+	+	3	-	-	-	+	-	+	2	5
Total parcial	0	1	1	7	5	7	21	0	1	0	6	3	4	14	35
120 esporocistos															
Peito	-	N ²	-	-	+	+	2	-	N	-	+	+	+	3	5
Coxa	-	N	-	+	+	+	3	-	N	-	-	+	+	2	5
Cérebro	-	N	-	+	+	-	2	-	N	-	-	+	+	2	4
Língua	-	N	-	+	+	-	2	-	N	-	+	+	+	3	5
Fígado	-	N	-	+	+	+	3	-	N	-	-	+	+	2	5
Coração	-	N	-	+	+	+	3	-	N	-	+	+	+	3	6
Pulmão	-	N	-	-	+	+	2	-	N	-	-	+	+	2	4
Total Parcial	0	N	0	5	7	5	17	0	N	-	3	7	7	17	34
TOTAL GERAL	0	1	1	12	12	12	38	0	1	0	9	10	11	31	69

Tabela 5. Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 60 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.

MÉTODOS CONSERVANTES	RESULTADO		TOTAL	χ	Valor de P ¹
	Positivo	Negativo			
Álcool absoluto (-20°C)	21 (25%)	21 (25%)	42 (50%)		
Congelamento (-20°C)	14 (17%)	28 (33%)	42 (50%)	1,7633	0,1842
TOTAL	35 (42%)	49 (58%)	84 (100%)		

¹Com correção de Yates e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6. Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 120 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.

MÉTODOS CONSERVANTES	RESULTADO		TOTAL	χ^2	Valor de P ¹
	Positivo	Negativo			
Álcool absoluto (-20°C)	17 (24%)	18 (26%)	35 (50%)		
Congelamento (-20°C)	17 (24%)	18 (26%)	35 (50%)	0,0572	0,8109
TOTAL	34 (48%)	36 (52%)	70 (100%)		

¹Com correção de Yates e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7. Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com 60 e 120 esporocistos de *Sarcocystis* spp. em dois métodos de conservação.

MÉTODOS CONSERVANTES	RESULTADO		TOTAL	χ^2	Valor de P ¹
	Positivo	Negativo			
Álcool absoluto (-20°C)	38 (25%)	39 (25%)	77 (50%)		
Congelamento (-20°C)	31 (20%)	46 (30%)	77 (50%)	0,9453	0,3309
TOTAL	69 (45%)	85 (55%)	154 (100%)		

¹ Pelo Teste do χ^2 com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 8. Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de diferentes amostras teciduais de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp.

TECIDOS	RESULTADO		TOTAL	χ^2	Valor de P ¹
	Positivo	Negativo			
Peito	10 (6,4%)	12 (7,8%)	22 (14,3%)	0,3071	0,9894
Coxa	11 (7,1%)	11 (7,1%)	22 (14,3%)		
Língua	11 (7,1%)	11 (7,1%)	22 (14,3%)		
Coração	10 (6,4%)	12 (7,8%)	22 (14,3%)		
Fígado	09 (5,8%)	13 (8,4%)	22 (14,3%)		
Cérebro	09 (5,8%)	13 (8,4%)	22 (14,3%)		
Pulmão	09 (5,8%)	13 (8,4%)	22 (14,3%)		
TOTAL	69 (44,8%)	85 (55,2%)	154 (100%)		

¹ Pelo Teste do χ^2 com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 9. Comparativo da amplificação do fragmento de DNA (utilizando o primer ITS 18S 9L/1H), de amostras de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. em relação a órgãos alvos.

ÓRGÃOS	RESULTADO		TOTAL	χ^2	Valor de P ¹
	Positivo	Negativo			
Músculos ²	42 (27,3%)	46 (28,9%)	88 (57,1%)	0,4601	0,4975
Vísceras ³	27 (17,5%)	39 (25,3%)	66 (42,9%)		
TOTAL	69 (44,8%)	85 (55,2%)	154 (100%)		

¹ Com correção de Yates e intervalo de confiança de 95%.

² Somatório dos isolados dos músculos do peito, coxa, coração e língua.

³ Somatório dos isolados do fígado, cérebro e pulmão.

Quando comparados à quantificação do DNA em tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), previamente infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. isolados de raspado intestinal, congelados -20°C e mantidos em álcool absoluto, não levando em consideração os métodos da quantificação, foi observado diferença estatística entre as duas formas de armazenamento do peito, com maiores valores de DNA nas amostras congeladas (Figura 11). Foram também observados valores significativamente superiores de DNA no fígado quando

comparado ao cérebro ambos congelados e também do fígado congelado comparado com o peito, coxa e coração conservado em álcool absoluto (Figura 11) e o menor valor da concentração do DNA observado no peito em álcool absoluto, diferiu estatisticamente do pulmão e coração, ambos congelados (Figura 11).

Ao comparar a quantidade de DNA entre os tecidos, desconsiderando o método e armazenamento e quantificação, observou-se que o fígado teve significativamente maior quantidade de DNA, quando comparado aos outros tecidos quantificados (Figura 12).

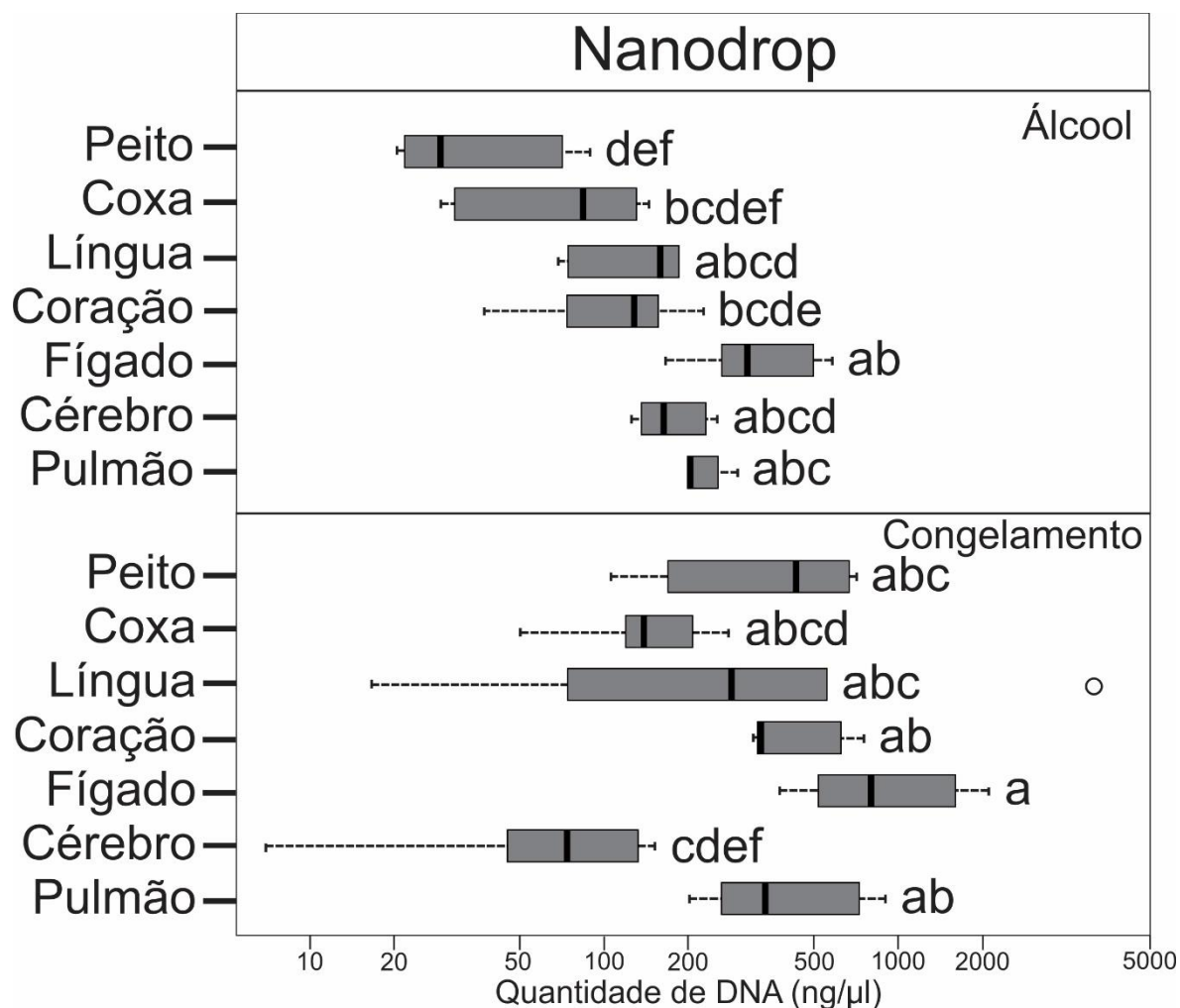


Figura 9. Quantificação em aparelho Nanodrop do DNA, extraído dos tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) experimentalmente infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), armazenados congelados -20°C e em álcool absoluto.

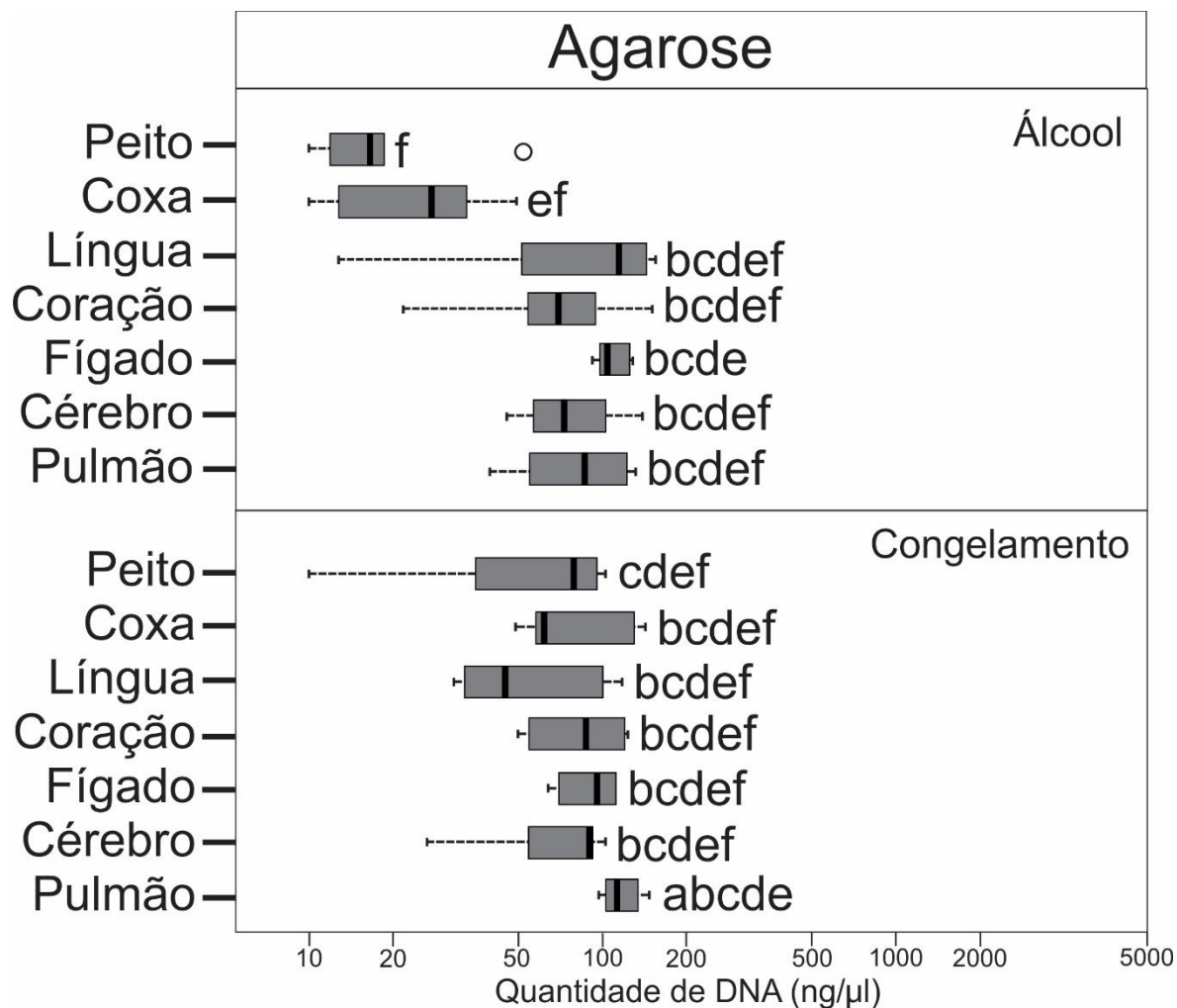


Figura 10. Quantificação em gel de agarose do DNA, extraído dos tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) experimentalmente infectados com esporocistos de *Sarcocystis* spp. oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), armazenados congelados -20°C e em álcool absoluto.

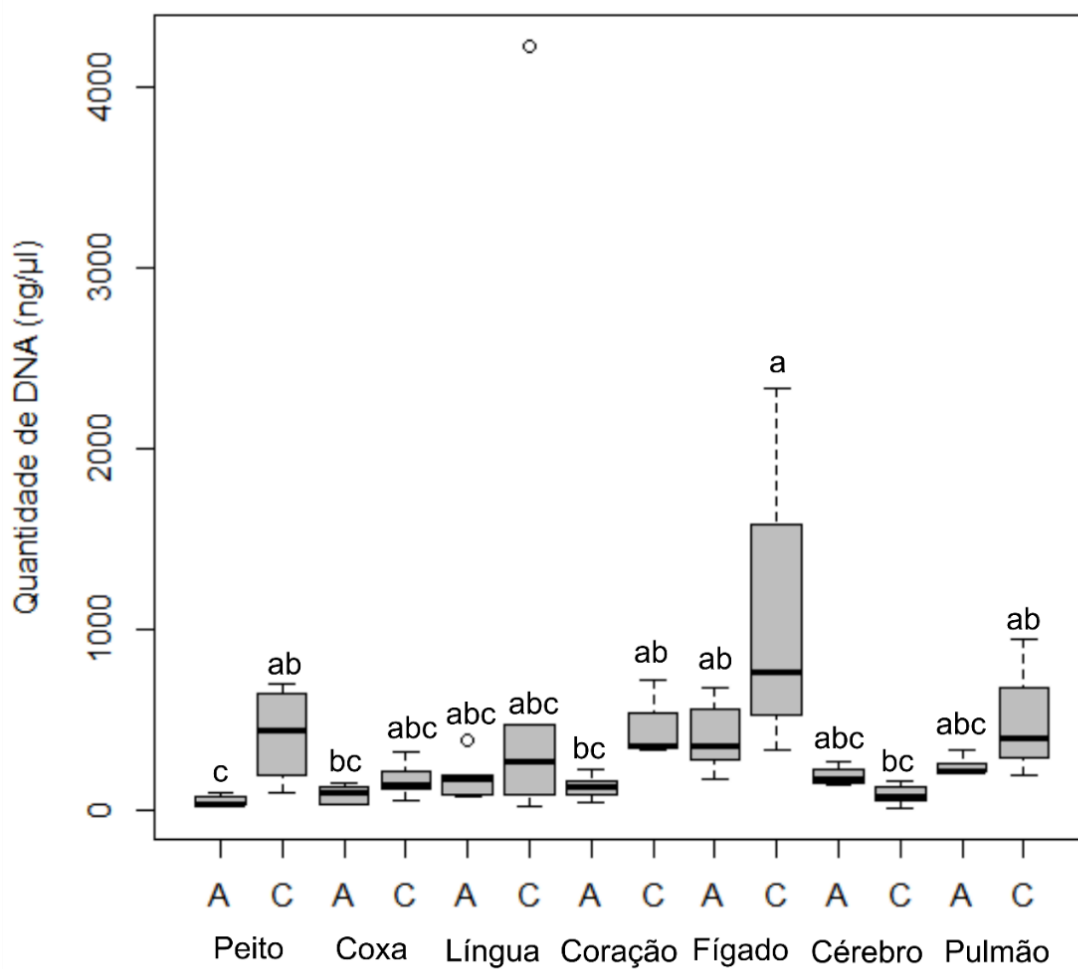


Figura 11. Comparativo da quantificação do DNA (ng/μl) extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) levando em consideração os tratamentos aplicados A (tecidos mantidos em álcool absoluto) C (tecidos congelados).

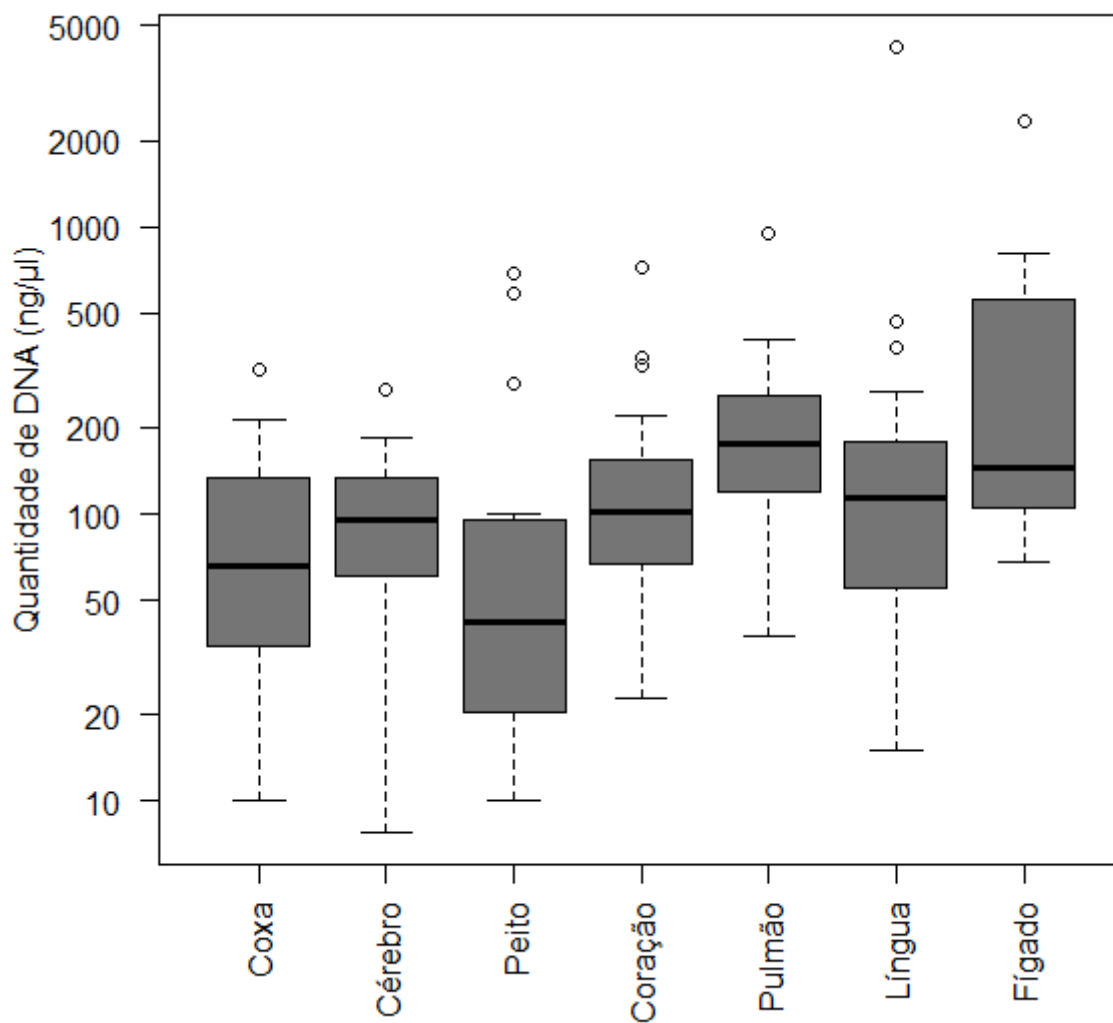


Figura 12. Quantificação do DNA, extraído de tecidos de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), experimentalmente infectados com esporocistos oriundos de raspado intestinal de gambá (*Didelphis aurita*).

Foram observadas lesões histopatológicas em um dos periquitos que foi inoculado com 120 esporocistos da amostra 174 e que morreu 19 DAI (Tabela 3). Estas lesões foram caracterizadas pela evidência de cordões de hepatócitos levemente degenerados que impermeiam região de vasos sanguíneos e sinusóides hepáticos com infiltrado inflamatório representado, principalmente, por heterofílos múltiplos macrófagos e alguns linfócitos (Figura 13 A). Também foram observadas lesões no tecido pulmonar em região parabrônquica com presença de infiltrado inflamatório associado com áreas de edema e atelectasia (Figura 13 B). Estas mesmas lesões foram observadas em um periquito que foi inoculado com 60 esporocistos da amostra 112, que morreu 16 DAI (Tabela 3). Merontes no endotélio capilar dos pulmões foram observados neste (Figura 14 A) e nos periquitos inoculados com 60 e 120 esporocistos da amostra 174 (Figura 14 B e C) e que morreram 19 DAI (Tabela 3).

Foram observados cistos em dois periquitos que foram inoculados com 120 esporocistos. A medida média, desvio padrão e mínimo e máximo valores aferidos em micrômetros em 20 cistos mensurados foram de $25,4 \pm 7,1$ (12,7-34,8) de largura e $45,9 \pm 24,6$ (16,8-113,0) de comprimento. Na ave que foi inoculado com a amostra 112 e foi eutanasiada aos 125 DAI (Tabela 3), somente na musculatura da coxa foram observados dois cistos maduros, no outro periquito inoculado com a amostra 132 e que morreu 108 DAI (Tabela 3), foram observados poucos cistos maduros (Figura 15 A) e imaturos (Figura 15 B) na musculatura do peito. Nesta mesma ave cistos maduros em maior quantidade foram vistos na musculatura da coxa (Figura 15 C e D) e muitos cistos todos maduros na musculatura da língua (Figura 15 E e F).

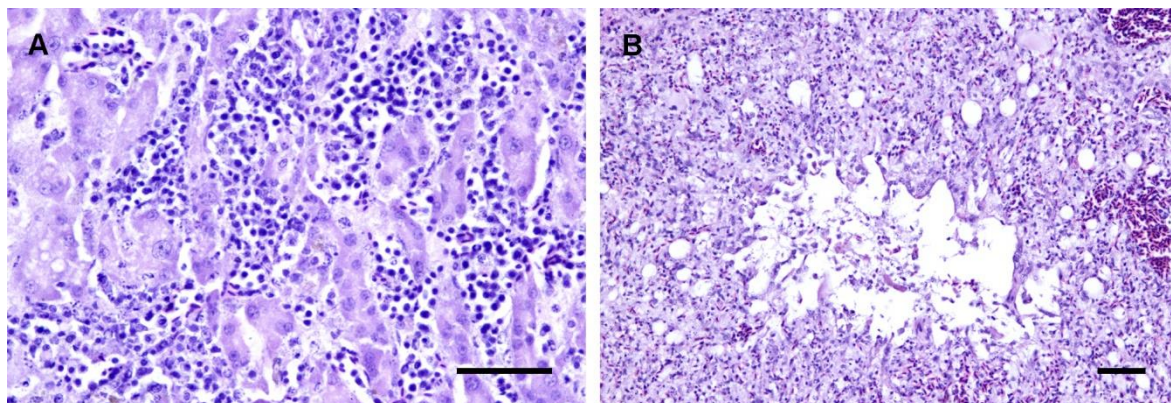


Figura 13. Micrografia evidenciando lesões nos tecidos hepáticos e pulmonares de um periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) que morreu 20 dias após infecção experimentalmente via oral, com 120 esporocistos oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*). Em **A**, infiltrado inflamatório no tecido hepático e hepatócitos com leve degeneração. Em **B**, infiltrado inflamatório associado com áreas de edema e atelectasia. Barra de 50µm e coloração hematoxilina e eosina.

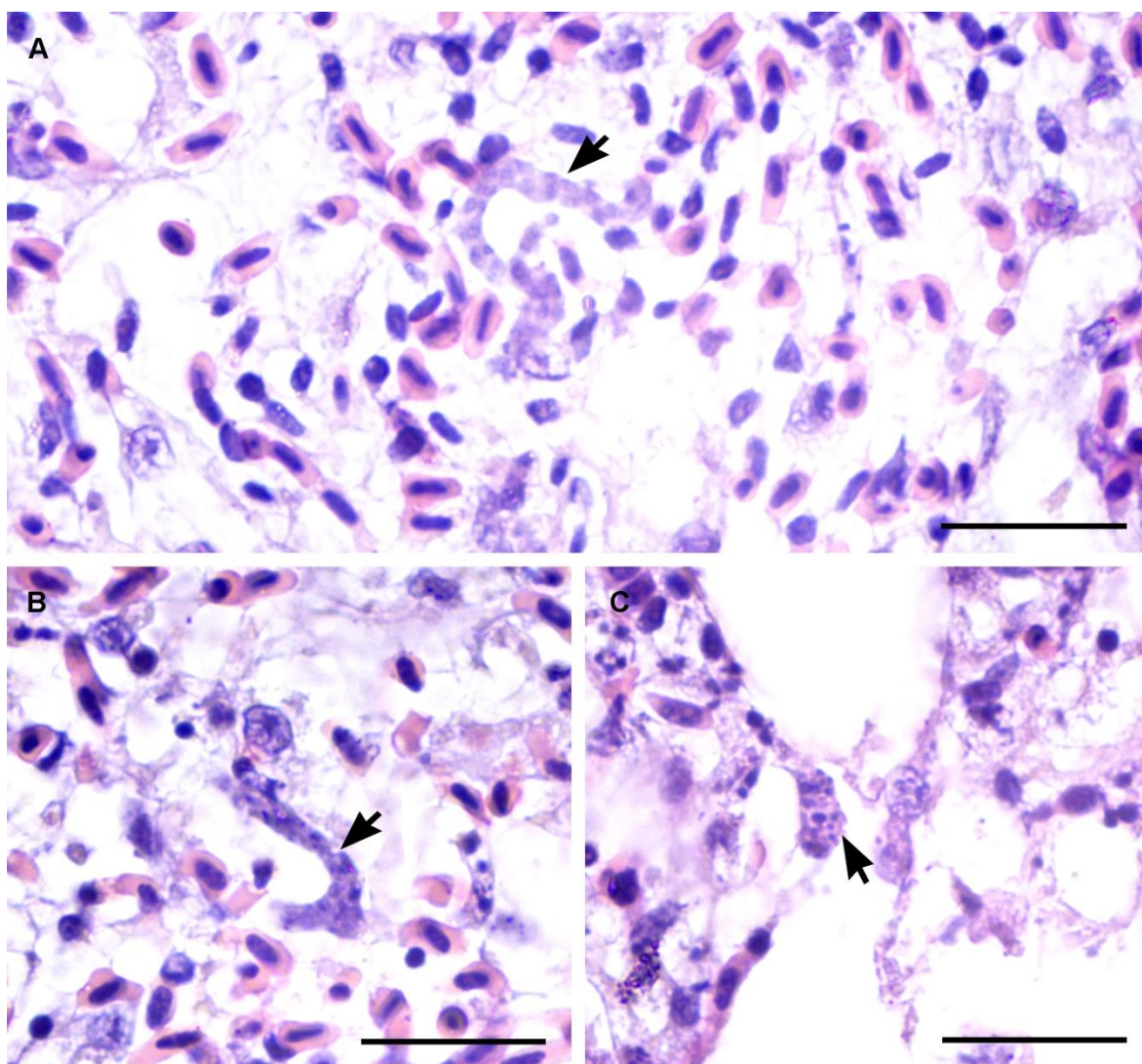


Figura 14. Micrografia de tecido pulmonar de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) inoculados experimentalmente, via oral, com esporocistos de *Sarcocystis* spp., oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*) e que morreram 17 (**A**) e 20 (**B** e **C**) dias após inoculação. Em **A**, **B** e **C**, setas evidenciam merontes do parasito em endotélio vascular de vênulas das aves que receberam 60, 120 e 60 esporocistos, respectivamente. Barra de 20 μ m, em imersão, coloração hematoxilina e eosina.

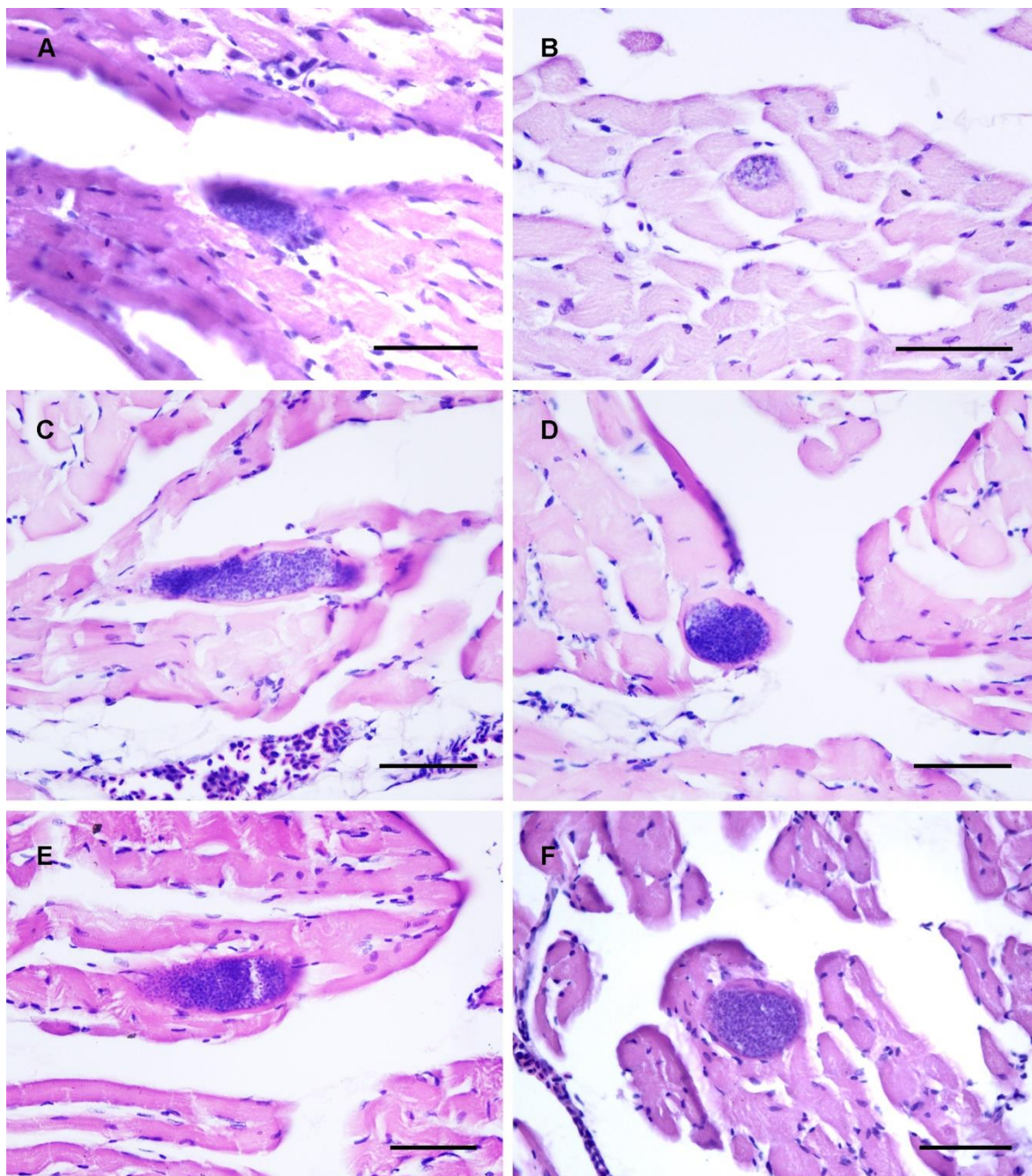


Figura 15. Micrografia de tecido muscular de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) inoculados experimentalmente, via oral, com esporocistos de *Sarcocystis* spp., oriundos de raspado intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), que morreu 108 dias após infecção em (A) cisto maduro no corte transversal em musculatura do peito, (B) cisto imaturo no corte vertical em musculatura do peito. Em (B) e (C) cistos maduros com corte transversal e vertical respectivamente em musculatura da coxa. Em (E) e (F) cistos maduros em corte transversal e vertical musculatura da língua. Barra de 50µm e coloração hematoxilina e eosina

6. DISCUSSÃO

O método de raspado de mucosa intestinal foi eficiente na recuperação dos esporocistos visto o considerável número amostral suficiente para desenvolvimento de nosso experimento. Este método também foi considerado por outros pesquisadores como adequado para obtenção das formas endógenas de *Sarcocystis* spp. no hospedeiro definitivo (DUBEY et al. 1989).

De acordo com os parâmetros aferidos pelo presente trabalho e os encontrados por Gallo et al. (2017) podemos verificar que os esporocistos mensurados possuem um tamanho de comprimento maior que a largura, conferindo a estes um formato elipsoide (Tabela 10). FAYER (1980), afirmou que o tamanho dos oocistos ou esporocistos de um coccídia pode variar de acordo com o tamanho da dose infectante e com as amostras de oocistos e esporocistos obtidas no momento da coleta. O pleomorfismo, também pode estar relacionado com a relação parasito-hospedeiro seja intermediário ou definitivo (FIGUEIREDO, 1989; PEREIRA et al. 2001). Embora tenhamos observado variações nas medidas dos esporocistos estes não foram suficientes para determinar quais espécies estão parasitando os gambás de nossa pesquisa, como já observado por outros pesquisadores (GALLO et al., 2017). Estes pesquisadores citam que as espécies de *Sarcocystis* que são eliminadas pelos gambás são morfologicamente similares, não sendo possível a diferenciação apenas na avaliação feita pela microscopia de luz dos esporocistos encontrados tanto nos exames coproparasitológicos e nos raspados de mucosa intestinal, como realizado no presente estudo. Assim é necessária infecção experimental para determinar a relação presa-predador, separando previamente se o hospedeiro intermediário é um mamífero ou uma ave (DUBEY et al., 2015).

O modelo de hospedeiro intermediário experimental utilizado na presente pesquisa foi o periquito australiano (*M. undulatus*) proposto por Box et al., (1984), embora não sendo nosso objetivo o diagnóstico da espécie, sabe-se que as espécies oriundas de *D. aurita* que parasitam aves são *S. falcatula* ou *S. lindsayi* (FENGER et al., 1995; MARSH et al., 1997; DUBEY; LINDSAY, 1998; CHAEDLE; DAME; GREINER, 2001; STABENOW et al., 2012). Com os resultados obtidos pelo ensaio biológico e da biologia molecular utilizando os primers ITS 18S 9L/1H,

confirmou-se que a espécie encontrada no gambá *D. aurita* é capaz de infectar aves.

Tabela 10. Medidas médias, desvio padrão e maiores e menores valores aferidos de esporocistos provenientes de raspado de mucosa intestinal de gambás (*Didelphis aurita*), através da digestão química com hipoclorito de sódio a 10%.

PARÂMETROS	ESPOROCISTOS AFERIDOS			
	N	Presente pesquisa	n	Gallo et al. (2017)
Comprimento	1000	11,20 ± 0,9 (7-15,6)	100	11,5 ± 0,6 (9,4-13,4)
Largura	1000	7,7 ± 3,8 (3,8-10,9)	100	7,8 ± 0,5 (6,2-9,7)

De acordo com Powell et al., (1986), podemos observar de forma clara os variados graus da patogenicidade das amostras de esporocistos obtidos no raspado intestinal de gambás *D. aurita*, as amostras variaram desde a quantidade de esporocistos à sua patogenicidade, afinal, aves vieram a óbito 12-19 DAI em nossa pesquisa impossibilitando desta forma o aparecimento de cistos maduros nestas aves. Na maioria dos casos não é observado sintomatologia clínica nos periquitos australianos inoculados, porém alguns podem se mostrar inativos e com perda da função de voo, permanecendo no fundo da gaiola, como observado no presente trabalho, corroborando com os resultados de Dubey et al. (1999).

De acordo com a biologia molecular dos tecidos, podemos observar que os periquitos que foram inoculados com uma dose infectante de 120 esporocistos apresentaram maior amplificação comparados aos periquitos que receberam a dose infectante de 60 esporocisto, com isso a quantidade de esporocistos influencia tanto na formação dos sarcocistos quanto na amplificação da PCR (DUBEY; et al.1989).

Os tecidos que foram congelados, mostraram-se efetivos para a utilização da técnica de PCR utilizando os primers ITS 18S 9L/1H. Não houve degradação do DNA, através da técnica de congelamento a -20°C, resultado este que corrobora com o encontrado por Dahlgren et al. (2007), quando utilizou a mesma metodologia de congelamento, porém não especificando o prazo de congelamento dos tecidos, identificaram de forma molecular e morfológica três espécies de *Sarcocystis* em

renas (*Rangifer tarandus tarandus*) na Islândia. Já em outro relato utilizando um curto prazo de tempo de congelamento 2-3 meses os autores descreveram seis espécies de *Sarcocystis* em alces (*Alces alces*) com identificação molecular e filogenética (DAHLGREN; GJERDE, 2008).

Os resultados da estatística aplicada em nossa pesquisa afim de verificar a eficiência dos métodos de conservação, não apresentaram significância estatística na utilização do congelamento com álcool absoluto ou sem o álcool, ambos se mostraram eficientes quanto à amplificação do fragmento de DNA utilizando o primer ITS 18S 9L/1H. Embora não comparando métodos de conservação Dahlgren et al. (2007) e Dahlgren; Gjerde (2008) consideraram o congelamento eficiente na conservação do DNA de espécies de *Sarcocystis*. Nós também não observamos diferença estatística entre os dois métodos de conservação e os órgãos conservados.

Numericamente os valores da avaliação do fragmento de DNA utilizando o primer ITS 18S 9L/1H dos tecidos musculares terem sido superiores aos das vísceras estas diferenças não foram significantes. Stabenow et al., (2012) relataram que houve predominância de cistos na musculatura da perna e língua, justificando os números superiores encontrados na PCR pois na presente pesquisa houve predomínio de cistos na musculatura do peito, coxa e língua, tecidos que foram agrupados formando o grupo dos tecidos musculares

Nos métodos de quantificação utilizando o aparelho Nanodrop foram superiores quando comparados ao gel de agarose, resultado já esperado levando em consideração que o Nanodrop é um aparelho de absorvância que faz a leitura em 260nm, medição do RNA e DNA juntos, com isso superestimando a quantificação. (GARCIA; MACEDO, 2007).

Diferenças estatísticas foram observadas na quantificação do DNA pelo Nanodrop em diversos órgãos e em ambos os métodos, no entanto, o mais importante foi observar que numericamente o pulmão e o fígado apresentaram valores maiores, corroborando com os resultados encontrados por SMITH et al., (1987) e NEILL et al., (1989). Estes pesquisadores observaram em suas pesquisas que *S. falcatula* utilizam os pulmões como órgão importante para a proliferação de merontes em periquitos australianos experimentalmente infectados. Quanto ao fígado, embora não encontrado merontes em nossa pesquisa, foi observado na

histologia hepatite ativa e crônica provavelmente, causada pelo parasitismo na segunda fase da reprodução assexuada que ocorre nas células endoteliais dos capilares e vênulas na maioria dos órgãos do hospedeiro como afirmado em diversos trabalhos (NEILL; SMITH; BOX, 1989; CLUBB; FRENKEL 1992).

Os resultados no gel de agarose apresentaram médias inferiores em relação ao observado no Nanodrop, sem diferenças estatísticas, isto devido ao método de gel levar em consideração um peso molecular de um DNA lambda, não havendo contagens adicionais como exemplo o RNA que tem peso molecular diferente do DNA. Para o gel de agarose foram encontrados valores de DNA superiores na língua e na coxa, o que pode ser explicado pela maior presença de cistos maduros em tais órgãos como relatados por Stabenow et al. (2012).

Na avaliação da quantificação comparando os métodos de armazenamento, houve diferenças estatísticas entre as duas formas de armazenamento do peito, com maiores valores de DNA nas amostras congeladas. O fígado congelado apresentou valores superiores de DNA e uma diferença estatística significativa quando comparado com o cérebro congelado e também ao peito, coxa e coração conservados em álcool absoluto, resultado esperado visto que no fígado foram encontrados lesões histológicas causadas pelo parasito que corroboram com estudos feitos por Neill, Smith; Box (1989) que avaliam o fígado como órgão alvo para a proliferação do parasitismo. Já o peito em álcool absoluto, com menor valor da concentração de DNA, diferiu estatisticamente do pulmão e coração, ambos congelados. Podemos observar que os tecidos congelados apresentaram bom desempenho na preservação do DNA mesmo com tempo prologado de congelamento quando comparado ao estudo de Dahlgren; Gjerde (2008) que utilizaram um período de 2-3 meses apenas, contudo este resultado não é discutido por demais autores, necessitando de novos estudos.

Entre os tecidos alvos do parasito, o fígado e o pulmão se destacaram na quantificação de DNA (Tabela 12), corroborando com o relatado por Neill; Smith; Box, (1989) e Clubb; Frenkel. (1992), que são nestes órgãos que ocorre a segunda geração da reprodução assexuada, justificando os achados histopatológicos caracterizados por hepatite e pneumonia nestes mesmos órgãos.

Os sarcocistos observados foram encontrados na musculatura da língua, coxa, e peito em ordem decrescente, corroborando com os resultados de Stabenow

et al. (2012), que associou tal predileção do parasito para estes tecidos devido aos ataques de gambás nas aves domésticas, segundo relatos populares, que ocorre uma predileção dos gambás pela ingestão das pernas e da cabeça, aumentando a probabilidade da perpetuação do parasito. Uma outra explicação para menor presença do parasito na musculatura peitoral e cardíaca das aves, pode ser o que foi observado por Neill et al. (1989) que verificaram uma degeneração dos cistos nestes tecidos, porém na musculatura da língua e coxa os cistos se mantiveram e amadureceram. Estes pesquisadores presumiram que as musculaturas do peito e do coração possuem alguma deficiência em um ou mais fatores fundamentais para a maturação do cisto. Stabenow et al. (2012), também relatou a diminuição dos cistos no coração e no peito, fato que foi observado na presente pesquisa onde apenas dois cistos foram encontrados na musculatura do peito e nenhum na musculatura cardíaca.

De acordo com Smith et al. (1987), os esquizontes passam por duas gerações assexuadas no endotélio, a primeira ocorre nas células endoteliais das arteríolas e a segunda nas células endoteliais dos capilares e vênulas, sendo os pulmões os principais órgãos afetados, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo onde encontramos três merontes dignos de nota no pulmão (SMITH et al., 1987,1987a, NEILL; SMITH; BOX, 1989; STABENOW et al., 2012).

Algumas aves de nossa pesquisa morreram de insuficiência respiratória devido ao grande infiltrado nos capilares aéreos e edema intersticial. Estas aves tiveram morte súbita, no entanto, relatos descrevem que em aves experimentalmente infectadas apatia, dispneia e anorexia parcial ou total podem ser observadas (CLUBB; FRENKEL 1992). A sarcoposridiose pulmonar aguda com morte subta foi caracterizada pela presença de infiltrado intersticial inflamatório granulomatoso multifocal em região alveolar e parabrônquica como observado na histopatologia.

As aves que vieram a óbito durante o experimento, não apresentaram sarcocistos na sua musculatura somente merontes no tecido pulmonar. Smith et al., (1987, 1989), relataram que há uma relação entre a dose de esporocistos inoculada e a severidade da doença, onde uma maior dose infectante ocasiona uma infecção aguda. Acredita-se que as espécies aviárias que evoluíram no mesmo ambiente que os gambás são capazes de sobreviver à esquizogonia pulmonar chegando a

fase final do ciclo do parasito no hospedeiro intermediário com a formação de sarcocistos, e, portanto, são mais resistentes à doença pulmonar fatal (GODOY et al., 2009).

Não foi encontrado merontes no fígado, no entanto uma hepatite granulomatosa caracterizada por infiltrado inflamatório multifocal com predominância de macrófagos, raros linfócitos e plasmócitos associado a áreas de degeneração hidrópica, foram os achados mais importantes neste órgão. Provavelmente estas alterações observadas no tecido hepático, sejam causadas pelo parasitismo (NEILL; SMITH; BOX, 1989).

7. CONCLUSÃO

Gambás *D. auritas* de Campos dos Goytacazes - RJ estão parasitados de forma enzoóticas por espécies de *Sarcocystis* que têm as aves como hospedeiros intermediários. O diagnóstico molecular em tecidos do hospedeiro intermediário, utilizando periquitos australianos como modelo experimental para aves, pode ser feito através da amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR com primers específicos em tecidos conservados diretamente em temperatura de -20°C imersos ou não em álcool absoluto.

A quantidade de DNA extraído dos tecidos vai depender da dose infectante, da mesma forma que a quantidade de merontes encontrados nas vísceras e principalmente se estas aves morrem de morte súbita, sarcocistos são observados na musculatura quando as aves apresentam uma infecção crônica. Neste caso os órgãos alvos para a maior formação dos sarcocistos seriam as musculaturas do peito, coxa e língua.

As lesões características de uma infecção só podem ser observadas em infecções agudas onde a observação de merontes é rara, no entanto nos casos crônicos com mais de três meses de infecção cistos imaturos e maduros podem ser facilmente observados.

8. REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. In: CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.

BOX, E. D.; MEIER, J. L.; SMITH, J. H. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 521-524, 1984.

BOX, E. D.; SMITH, J. H. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 608-673, 1982.

BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials**. Chicago, Illinois: Field Museum of Natural History, Fieldiana Zoology: New Series. v. 102, 2004.

CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (*Polyprotodontia*, *Didelphidae*). **Journal of Biogeography**, v. 12, n., p. 135-145, 1985

CERQUERIA, R.: LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319-327, 2000.

CHEADLE, M.A., DAME, J.B., GREINER, E.C. Sporocyst size of isolates of *Sarcocystis* shed by the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 305-311, 2001.

CLUBB, S.L., FRENKEL, J.K. (1992) *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. **J. Parasitol.**, 78: 116-124

DAHLGREN, S. S .; GJERDE, B. Caracterização genética de seis espécies de *Sarcocystis* de renas (*Rangifer tarandus tarandus*) na Noruega com base no pequeno gene da subunidade rRNA. **Parasitologia veterinária**, v. 146, n. 3-4, p. 204-213, 2007.

DAHLGREN, S. S.; GJERDE, B. Sarcocystis in moose (*Alces alces*): molecular identification and phylogeny of six Sarcocystis species in moose, and a morphological description of three new species. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 93-110, 2008.

DAME, J. B.; MACKAY, R. J.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; MARSH, A.; GREINER, E. C. Sarcocystis falcatula form passerine and psittacine birds: synonymy with Sarcocystis neurona, agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 930-935, 1995.

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

DUBEY, J. P.; VENTURINI, L.; VENTURINI, C.; BASSO, W.; UNZAGA, J. Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 239-244, 1999.

DUBEY, J.P. A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **J. Am. Med. Vet. Assoc.**, 169: p1061-1078, 1976.

DUBEY, J.P. Prevalence of Sarcocystis species sporocysts in wild-caught opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 86: p. 705-710, 2000.

DUBEY, J.P. Toxoplasma, Neospora, **Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals**. In: KREIER, J. P. (ed.) Parasitic protozoa. 2. ed. San Diego: Academic Press, p. 1-131, 1992.

DUBEY, J.P., DAVIS, S.W., SPEER, C.A., BOWMAN, D.D., DELAHUNTA, A., GRANSTROM, D.E., TOPPER, M.J., HAMIR, A.N., CUMMINGS, J.F., SUTER, M.M. Sarcocystis neurona n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiological agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 212-218, 1991

DUBEY, J.P., KERBER, C.E., GRANSTROM, D.E. Serologic prevalence of Sarcocystis neurona, Toxoplasma gondii, and Neospora caninum in horses from Brazil. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 970-972. 1999 a.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. Int. **Journal of Parasitology**, v. 28, p. 1823-1828. 1998.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Sarcocystis speeri* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, 85: 903-909. 1999 b.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., KERBER, C.E., KASAI, N., PENA, H.F.J., GENNARI, S.M., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., ROSENTHAL, B.M. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South America opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 295-304. 2001(a).

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., VENTURINI, L., VENTURINI, C. Characterization of *Sarcocystis falcatula* isolates from the Argentinian opossum, *Didelphis albiventris*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, p. 260-263. 2000 a.

DUBEY, J.P., ROSENTHAL, B.M., SPEER, C.A. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, p. 595-603. 2001(b).

DUBEY, J.P., SPEER, C.A., FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 215p. 1989.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of Animals and Humans**, 2 Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 481 p., 2015.

DUBEY, J.P.; ODENING, K. Toxoplasmosis and Related Infections. In: SAMUEL, W.M., PYBUS, M.J., KOCAN, A.A. (Eds.), **Parasitic Diseases of Wild Mammals**, Iowa State University Press, Ames, p. 478-511. 2001.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A., FAYER, R. **Sarcocytosis of Animals and Man**. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 1989.

DUCLOS, C. C. A. *Biologia Molecular: História, Descoberta do DNA*, 2004. Disponível em: < <http://www.biomol.org/historia/existencia.shtml>>. Acesso em: 16, set. 2019.

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

FIGUEIREDO, P.C. Espécies dos gêneros *Sarcocystis* LANKESTER, 1882 (Apicomplexa: Sarcocystidae) parasitos de ruminantes domésticos que têm o cão como hospedeiro definitivo: morfologia, biologia e diagnóstico. Tese (Doutorado em Parasitologia) Seropédica RJ, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro UFRRJ**, 124p.1989.

FINNIE, E.P. Monotremes and Marsupials (Anatomy) In: FOWLER, M.E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**, Estados Unidos: Saunders Company, p. 558-560, 1986.

GALLO, S. S. M., LINDSAY, D. S., EDERLI, N. B., MATTEOLI, F. P., VENANCIO, T. M., & DE OLIVEIRA, F. C. R. Identification of opossums *Didelphis aurita* (Wied-Neuweid, 1826) as a definitive host of *Sarcocystis falcatula*-like sporocysts. **Parasitology Research**, 117(1), 213–223. 2017.

GARCIA, A. B.; MACEDO, J. M. B. **Biologia Molecular**. Fundação CECIERJ/ Consórcio CEDERJ, Módulo 1, v. 1, p. 32-41/134-137, 2007.

GARDNER, A. L. **Mammals of the South America**. Chicago: The University of Chicago Press,. v. 1. 2007.

GARDNER, A.L. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (Eds.) **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic**, 3 Ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 3-18, 2005.

GODOY, S. N.; DE PAULA, C. D.; CUBAS, Z. S.; MATUSHIMA, E.; CATÃO-DIAS, J. L. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n 1, p. 18-23, 2009.

HERSHKOVITZ, P. The South American gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989 (Marmosidae, Marsupialia): a taxonomic review with notes on general morphology and relationships. **Fieldiana Zoology**, v. 70, n. New Series, p. 1-56, 1992.

HOLMDAHL, O.J.M.; MATTSSON, J.G.; UGGLA, A.; JOHANSSON, K-E. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal DNA sequences. **Microbiology Letters**, v. 119, p.187-193, 1994.

HUNSAKER, D. **The Biology of Marsupials**. Estados Unidos: Academic Press, 1977.

MARSH, A.E., BARR, B.C., TELL, L., KOSKI, M., GREINER, E., DAME, J., CONRAD, P.A. In vitro cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **J. Parasitol.**, 83: 1189-1192. 1997.

MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; BARBOSA, I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Collection, transport and storage of samples for molecular diagnosis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

MUDRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; JÄKEL, T.; HECKEROTH, A.R.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M. Effects of sequence alignment and structural domains or ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 12, p.1842- 1853, 2000.

NAGY, Z.T. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 10, n. 1, p. 91-105, 2010.

NEILL, P.J.G., SMITH, J.H., BOX, E.D. (1989) Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). IV. Ultrastructure of developing, mature and degenerating sarcocysts. **J. Protozool.**, 36: 430-437.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. Baltimore: the Johns Hopkins University Press, v. 1. 1999.

ODENING, K. The present state of species systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidie). **Systematic Parasitology**, v. 41, p. 209-233, 1998.

OLIVEIRA, F.C.R., ALBUQUERQUE, G.R., LOPES, C.W.G., MASSAD, F.V., MUNHOZ, A.D. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa:Cystoisosporinae) recuperados de órgãos de camundongos através da digestão péptica. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 10, p. 29-35. 2001.

PEREIRA, M.J.S., FONSECA, A.H., LOPES, C.W.G. Regressão linear na caracterização de variações morfométricas em coccidia. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 10: 75-78. 2001.

PORTER, R.A., GINN, P.E., DAME, J.B., GREINER, E.C. Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 313-319. 2001.

POWELL, E.C., PEZESHKPOUR, G., DUBEY, J.P., FAYER, R. Types of myofibers parasitized in experimentally induced infections with *Sarcocystis cruzi* and *Sarcocystis capracanis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 514-517. 1986.

PRAKAS, P.; KUTKIENE, L.; SRUOGA, A.; BUTKAUSKAS, D. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1603-1608, 2011.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBÍN, L.H. Laboratory Methods In: Histotechnology, Washington, D.C., **Armed Forces Institute of Pathology**, 274p., 1994.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2019.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103–117, 2004.

SHEFFIELD, H. G.; FAYER, R. Fertilization in the coccidia: fusion of *Sarcocystis bovicanis* gametes. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, v. 47, p. 118-121, 1980.

SILVA, M. R. As controvérsias a respeito da participação de Rosalind Franklin na construção do modelo da dupla hélice. *Scientiæ Zudia*, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 69-92, 2010.

SMITH, J.H., MEIER, J.L., NEILL, P.J.G., BOX, E.D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. I. Early pulmonary schizogony. **Lab. Invest.**, 56: 60-71. 1987.

SMITH, J.H., MEIER, J.L., NEILL, P.J.G., BOX, E.D Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. II. Pulmonary pathology. *Lab. Invest.*, 56: 72-84. 1987a.

SMITH, J.H., NEILL, P.J.G., BOX, E.D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). III. Pathologic and quantitative parasitologic analysis of extrapulmonary disease. **J. Parasitol.**, 75: 270-287, 1989.

STABENOW, C.S.; EDERLI, N.B.; LOPES, C.W.G.; OLIVEIRA, F.C.R. *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphidae): A New Host for *Sarcocystis lindsayi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 6, p. 1262–1265, 2012

TANHAUSER, S.M.; YOWELL, C.A.; CUTLER, T.J.; GREINER, E.C.; MACKAY, R. J.; DAME, J.B. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 221-228, 1999.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. Random and mixed effects. In: **Modern applied statistics with S**. Springer, New York, NY, p. 271-300, 2002.