

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PESQUISA DE *Trypanosoma cruzi* E RELATO DE OCORRÊNCIA DE HELMINTES
GASTROINTESTINAIS EM GAMBÁ-DE-ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) E
GAMBÁ-DE-ORELHA-PRETA (*Didelphis aurita*) NUM CRAS DO MUNICÍPIO DE JUNDIAÍ,
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

LÍGIA PARREIRA DA CRUZ

ORIENTADORA:
Doutora Cristina Harumi Adania

COORIENTADOR:
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PESQUISA DE *Trypanosoma cruzi* E RELATO DE OCORRÊNCIA DE HELMINTES
GASTROINTESTINAIS EM GAMBÁ-DE-ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) E
GAMBÁ-DE-ORELHA-PRETA (*Didelphis aurita*) NUM CRAS DO MUNICÍPIO DE JUNDIAÍ,
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

LÍGIA PARREIRA DA CRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de
Sampaio

ORIENTADORA:

Doutora Cristina Harumi Adania

VOGAIS:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2021

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Lígia Parreira da Cruz

Título da Tese ou Dissertação: Pesquisa de *Trypanosoma cruzi* e relato de ocorrência de helmintes gastrointestinais em gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) num CRAS do município de Jundiaí, estado de São Paulo, Brasil

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutorado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 24 de Fevereiro de 2021

Assinatura: Lígia Parreira da Cruz

Agradecimentos

À Doutora Cristina Adania, pelo acompanhamento e enorme inspiração.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por ser aquilo a que se pode chamar um verdadeiro pedagogo, sempre atento e prestável, e por ter sido correspondência assídua e crucial quando estive além Atlântico.

Às companheiras de estágio Ana, Beatriz, Alice e Edna, por tantas aventuras e companheirismo, às vets Bia, Isabella, Kiti e Jéssica, aos biólogos Mosca, Pedro e Yago, à Letícia e aos tratadores da Mata, principalmente Bigati e Kadu, por me terem ensinado tanto, ao Jorge por me ter recebido tão bem, à Dra. Emília pelo entusiasmo e ensinamentos, ao restante pessoal da Mata que é impossível enumerar aqui, mas que foram tão importantes na minha estada no Brasil.

Ao pessoal de Jaboticabal, em especial ao Professor Doutor Estevam Hope e à Dália, por terem sido incansáveis comigo.

Ao Pedro, à Ritinha, à Helena, à Ervi, à Laura, ao António, à Pinto e a todas as demais pessoas que durante o meu percurso académico foram companheiras dentro da faculdade.

Ao FAUNA, por ter mantido aceso o sonho de trabalhar com animais selvagens.

Ao TUT, especialmente ao Júlio e à Helena, por me terem dado espaço para a expressão dramática. Ao João Mota, da Comuna, que me disse “Acabe o curso, mas não deixe nunca de fazer teatro” e que me serviu de motivação para voltar para Veterinária num momento de pausa e muitas dúvidas.

Ao Hélder, dos tempos no Chapitô, e à Susana, dos tempos no Bosque Bio, com quem tanto ri, desabafei, e com quem aprendi que também se fazem grandes amigos a trabalhar.

Ao David, Sofia, Joana, Miguel, Suzana e Nuno pela amizade e companheirismo.

Ao meu avô Mel pela casa de Linda-a-Velha e por ter estado sempre de braços abertos e efusivos para me receber em sua casa, em Lisboa.

Ao meu avô Adalberto pela ajuda indispensável a vida toda e à saudosa avó Angelina pelo seu constante carinho e que ainda apanhou parte do meu caminho em Veterinária.

Ao meu irmão Micael por, ainda que a maioria das vezes distante, ter sido sempre uma energia boa na minha vida.

Ao meu pai por ter plantado em mim o senso crítico que me salva e motiva.

À minha mãe, irmão Anselmo e irmãs Gisela e Marília por terem sido sempre lar.

Ao Joaquim por ter sido um padrasto impecável e que me motivou a prosseguir quando eu não via caminho possível em Veterinária.

À memória do Joaquim

Pesquisa de *Trypanosoma cruzi* e relato de ocorrência de helmintes gastrointestinais em gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) num CRAS do Município de Jundiaí, Estado de São Paulo, Brasil

Resumo

Os gambás (*Didelphis* spp.) são mamíferos marsupiais que ocorrem ao longo do continente americano e que, devido à cada vez maior destruição dos seus habitats e aproximação dos centros urbanos, são hoje considerados animais sinantrópicos.

Estes animais constituem um importante reservatório natural de *Trypanosoma cruzi*, protozoário agente da Doença de Chagas, considerada, pela Organização Mundial de Saúde, uma Doença Tropical Negligenciada.

Os estudos sobre a fauna helmintológica dos gambás restringem-se sobretudo ao gambá-da-virgínia (*Didelphis virginiana*) e ao gambá-comum (*Didelphis marsupialis*). Os registros feitos de helmintes em gambás no Brasil são esporádicos, dispersos e também muito variáveis, conforme as dinâmicas ecológicas nas diferentes regiões e biomas. No Estado de São Paulo, ocorrem as espécies gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*).

Os objetivos deste trabalho foram averiguar a existência de *T. cruzi*, bem como pesquisar helmintes nos gambás que deram entrada na Associação Mata Ciliar (Jundiaí, São Paulo, Brasil), oriundos do município de Jundiaí e municípios circundantes. Para tal, foram colhidas amostras nos gambás-de-orelha-branca e de orelha-preta em recuperação (n=20) e realizadas necrópsias (n=11), na Associação Mata Ciliar, entre os dias 10 e 19 de Maio de 2019, para posterior processamento das amostras na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, São Paulo. As análises feitas por RCP, bem como os esfregaços de conteúdo perianal e sangue, revelaram-se negativos para a pesquisa de *T. cruzi*. A pesquisa de helmintes revelou que 5 dos 10 animais sujeitos a necrópsia estavam infetados. Os helmintes encontrados e respectivas prevalências foram *Cruzia* sp. (40%, 4/10), *Strongyloides* sp. (40%, 4/10), *Trichuris* sp. (30%, 3/10), *Turgida* sp. (10%, 1/10), *Oligacanthorhynchus* sp. (10%, 1/10) e Cestoda (40%, 4/10). Este estudo representa, assim, um importante contributo para o conhecimento da fauna helmintológica dos gambás do município de Jundiaí e municípios circundantes e poderá constituir uma base para investigações futuras sobre este tema.

Palavras-chave: Gambás, *Didelphis*, Brasil, *Trypanosoma cruzi*, Helmintes.

Research of *Trypanosoma cruzi* and report of occurrence of gastrointestinal helminths in White-eared Opossum (*Didelphis albiventris*) and Brazilian Common Opossum (*Didelphis aurita*) in a wildlife rehabilitation center in the municipality of Jundiaí, State of São Paulo, Brazil

Abstract

Opossums (*Didelphis* spp.) are marsupial mammals that occur throughout the American continent. Nowadays they are considered synanthropic animals due to the increasing destruction of their habitats and the proximity of urban centers.

These animals are an important reservoir of *Trypanosoma cruzi*, a protozoan agent of Chagas disease which is considered a Neglected Tropical Disease by the World Health Organization. Studies on the helminthological fauna of opossums are mainly restricted to the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) and the common opossum (*Didelphis marsupialis*). The records of helminths from opossums in Brazil are sporadic, dispersed and very variable, according to the ecological dynamics in the different regions and biomes. In the state of São Paulo, the species that occur are the White-eared Opossum (*Didelphis albiventris*) and Brazilian Common Opossum (*Didelphis aurita*).

The objectives of this work were to investigate the existence of *T. cruzi*, as well as to search for helminths in the opossums admitted to the Associação Mata Ciliar (Jundiaí, São Paulo, Brazil), from the municipality of Jundiaí and surrounding municipalities. To this end, samples were collected from opossums in rehabilitation (n=20) and necropsies (N=11) were performed at Associação Mata Ciliar between 10th and 19th May 2019, for further sample processing at Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, São Paulo. PCR analyzes, as well as smears of perianal content and blood for *T. cruzi* research, were negative. The helminth research revealed that 5 out of 10 necropsied opossums were infected. The helminths found and their prevalence were *Cruzia* sp. (40%, 4/10), *Strongyloides* sp. (40%, 4/10), *Trichuris* sp. (30%, 3/10), *Turgida* sp. (10%, 1/10), *Oligacanthorhynchus* sp. (10%, 1/10) and Cestoda (40%, 4/10).

This study thus constitutes an important contribution to the knowledge of the helminthological fauna of opossums in the municipality of Jundiaí and surrounding municipalities and could provide a basis for future research on this topic.

Keywords: Opossums, *Didelphis*, Brazil, *Trypanosoma cruzi*, Helminths.

Índice

1. Introdução	1
2. Relatório de Estágio	2
2.1. Sobre a Associação Mata Ciliar	2
2.2. Atividades desenvolvidas	3
2.2.1. Rotineiras	3
2.2.2. Pontuais	3
2.2.3. Outras	4
2.2.4. Exemplos	4
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Caracterização das espécies <i>Didelphis albiventris</i> Lund, 1840 e <i>Didelphis aurita</i> Wied-Neuwied, 1826	7
3.1.1. Caracterização taxonómica do género <i>Didelphis</i>	7
3.1.2. Estado de conservação e distribuição	7
3.1.3. Hábitos alimentares, período de atividade e ecologia	7
3.1.4. Reprodução	9
3.2. Caracterização de <i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909.....	10
3.2.1. Evolução do conhecimento sobre a epidemiologia de <i>T. cruzi</i>	10
3.2.2. Enquadramento taxonómico.....	11
3.2.3. Ciclo biológico	13
3.2.4. Relação de <i>T. cruzi</i> com os gambás	15
3.3. Epidemiologia da Doença de Chagas.....	17
3.3.1. Distribuição	17
3.3.2. Situação epidemiológica no Brasil.....	17
3.3.3. Sinais clínicos	19
3.3.4. Tratamento.....	20
3.4. Deteção e diagnóstico de infeção por <i>T. cruzi</i>	21

3.4.1. Esfregaços de sangue.....	21
3.4.2. Esfregaço por aposição de órgãos.....	21
3.4.3. Esfregaço do conteúdo das glândulas perianais	22
3.4.4. Hemocultura.....	22
3.4.5. Xenodiagnóstico.....	22
3.4.6. Reação de Imunofluorescência Indireta	22
3.4.7. Histopatologia	23
3.4.8. Técnicas moleculares.....	23
3.5. Helmintes em <i>Didelphis</i> spp.	24
3.5.1. Filo Nematoda.....	24
3.5.1.1. <i>Cruzia</i> spp.	25
3.5.1.2. <i>Strongyloides</i> spp.	26
3.5.1.3. <i>Trichuris</i> spp.	28
3.5.1.4. <i>Turgida</i> spp.	29
3.5.2. Filo Acanthocephala.....	31
3.5.2.1. <i>Oligacanthorhynchus</i> spp.	31
3.5.3. Platelminthes	33
3.5.3.1. Trematodes Digenea em <i>Didelphis</i> spp. no Brasil	33
3.5.3.2. Cestodes em <i>Didelphis</i> spp. no Brasil	33
3.6. Meios de diagnóstico das helmintoses gastrointestinais	35
3.6.1. Exame das fezes.....	35
3.6.2. Exame <i>post-mortem</i>	37
3.7. Tratamento	37
4. Objetivos	38
5. Material e métodos.....	38
5.1. Para a pesquisa de <i>T. cruzi</i>	39
5.1.1. Processamento por RCP convencional	40

5.2. Para a pesquisa de helmintos.....	40
6. Resultados.....	42
6.1. Pesquisa de <i>T. cruzi</i>	42
6.2. Pesquisa de helmintos.....	43
7. Discussão	50
7.1. Pesquisa de <i>T. cruzi</i>	51
7.2. Pesquisa de helmintos.....	56
8. Conclusão	62
9. Bibliografia	63
Anexos.....	73
Anexo 1 – Exemplos de gambás e das suas características anatómicas distintas	73
Anexo 2 – Mapas de distribuição de <i>Didelphis albiventris</i> e <i>Didelphis aurita</i>	75
Anexo 3 - Géneros de nematodes encontrados em <i>Didelphis</i> spp. no Brasil	76
Anexo 4 – Exemplos de ovos de helmintos em <i>Didelphis</i> spp.	77
Anexo 5 - Fármacos utilizados na desparasitação interna e externa de Didelphidae.....	78
Anexo 6 – Dados brutos dos gambás analisados para pesquisa de <i>T. cruzi</i> e helmintos gastrointestinais	79

Lista de Figuras

- Figura 1. Exemplos de animais internados na clínica. (A) Fêmea de gambá-de-orelha-preta encontrada atropelada com crias; (B) Coruja-buraqueira a recuperar de uma lesão no membro anterior direito; (C) Alimentação de um beija-flor com preparação de néctar de flores; (D) Chegada de fêmea de lobo-guará com forte suspeita de sarna demodécica (fonte: arquivo pessoal). 4
- Figura 2. Exemplos de enriquecimento ambiental em (B) gato-do-mato, (C) ocelote e (D) jaguar. Foram utilizados pedaços de coração de vaca envoltos em capim e embrulhados em folha de capim-palmeira e cipó (A) que eram depois pendurados nos recintos, simulando presas, de forma a estimular os instintos de caça que estes animais apresentam na natureza (fonte: arquivo pessoal). 5
- Figura 3. Intervenção oral num puma macho com disfagia. Anestesiou-se o animal com dardo para se proceder a radiografia e observação da cavidade oral. O animal apresentava uma bolsa periodontal com fístula no dente canino direito da maxila. (A) Médico Veterinário Dentista a observar a boca do puma; (B) Realização da biometria; (C) Animal no período pós-cirúrgico (fonte: Rafael Bigati). 5
- Figura 4. Participação no resgate de um gato-mourisco encontrado com dificuldades de locomoção e sinais de trauma, próximo de uma estrada movimentada. (A) Passagem do animal para uma jaula de contenção; (B) Observação clínica já nas instalações da AMC (fonte: AMC).5
- Figura 5. Radiografia nos planos VD e LL (B) a um sagui-de-tufo-preto (A), evidenciando fratura vertebral a nível torácico (►). O animal foi encontrado prostrado com paresia dos posteriores, próximo de uma linha de alta tensão, tendo, presumivelmente, caído como consequência de um choque elétrico. Acabou por se proceder à eutanásia neste animal (fonte: arquivo pessoal). 6
- Figura 6. Aleitamento de crias órfãs. (A) Capivara (fonte: Beatriz Pessoa); (B) Gambá-de-orelha-branca (fonte: Alice Araújo); (C) Porco-espinho (fonte: arquivo pessoal). 6
- Figura 7. Soltura de uma preguiça-de-três-dedos na Serra do Japi, S.P. (fonte: arquivo pessoal). 6
- Figura 8. Tucano-toco no seu recinto de reabilitação (fonte: arquivo pessoal). 6
- Figura 9. Diferentes formas de *Trypanosoma cruzi*. (A) A forma epimastigota em cultura (corada por Giemsa); (B) A forma tripomastigota numa amostra de sangue periférico de um indivíduo com infecção aguda da Doença de Chagas (corada por Giemsa); (C) Pseudoquisto dentro de um miócito cardíaco de um indivíduo com Doença de Chagas crónica (corada por hematoxilina e eosina). Adaptado de Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach – Figura científica em ResearchGate. Disponível em <https://www.researchgate.net/figure/Trypanosoma->

cruzi-morphological-forms-A-The-replicating-epimastigote-form-in-culture_fig1_337566419 [acedido a 4 Out, 2020]).....	12
Figura 10. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adaptado de CDC (2019a).....	14
Figura 11. Conteúdo das glândulas perianais de gambás naturalmente infetados por <i>Trypanosoma cruzi</i> , mostrando a forma epimastigota (A), tripomastigota (B), tripomastigota metacíclica (C) e esferomastigota em divisão (D) (ampliação de 1000x). Adaptado de Urdaneta- Morales e Nironi (1996).....	16
Figura 12. Distribuição dos triatomíneos colhidos segundo espécie - (A) <i>Triatoma sordida</i> , (B) <i>Panstrongylus megistus</i> , (C) <i>Rhodnius neglectus</i> e (D) <i>Triatoma tibiamaculata</i> - no estado de São Paulo, de 2014 a 2017. Região de Jundiaí e municípios circundantes assinalados a vermelho. Adaptado de Silva (2019).....	19
Figura 13. Dois espécimes de <i>Cruzia tentaculata</i> provenientes de um gambá. i) Extremidade bucal; ii) Faringe; iii) Esófago; iv) Bulbo; v) Ceco anterior; vi) Extremidade posterior do macho (forma cônica). Lâmina preparada com bálsamo sintético. Adaptado de Yale Peabody Museum of Natural History (2018a). Autor da imagem original: D. Drew.	25
Figura 14. Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i> . Adaptado de CDC (2019b).	27
Figura 15. Ciclo de vida de <i>Trichuris trichiura</i> . Adaptado de CDC (2017b).....	28
Figura 16. Indivíduos da espécie <i>Turgida turgida</i> no interior do estômago de um gambá (<i>Didelphis</i> sp.). Imagem adaptada de https://www.dailymotion.com/video/x2n90z6	29
Figura 17. Porção anterior de <i>Oligacanthorhynchus microcephalus</i> . (a) Probóscide; (b) bainha; (c) pescoço; (d) tronco com pregas transversais marcadas. Lâmina preparada com bálsamo sintético. Adaptado de Yale Peabody Museum of Natural History (2018). Autor da imagem original: A. Gomez-Colunga.	32
Figura 18. Ciclo de vida de <i>Rodentolepis nana</i> . Adaptado de CDC (2017a).	34
Figura 19. Ciclo de vida das espécies da ordem Diphyllbothriidea. Adaptado de CDC (2020b).	35
Figura 20. Rede de captura do tipo puçá utilizada na contenção dos gambás (fonte: Rafael Oli- veira).....	39
Figura 21. Mapa de distribuição dos indivíduos de <i>Didelphis</i> spp. a quem foi realizada a necrópsia para pesquisa de helmintes e respetivo resultado. Adaptado de Google My Maps (2020).....	44
Figura 22. Achado à necrópsia de um indivíduo único de <i>Turgida</i> sp. na mucosa do estômago de G2 (<i>Didelphis aurita</i> , fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí).	44

Figura 23. Conteúdo intestinal de G2 (<i>Didelphis aurita</i> , fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí) disposto numa placa de Petri (diâmetro de 90mm) para visualização e contagem à lupa estereoscópica. A barra (—) corresponde a 1cm.	46
Figura 24. Conteúdo intestinal de G2 (<i>Didelphis aurita</i> , fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí) visualizado à lupa estereoscópica. (a) Fêmea de <i>Cruzia</i> sp. – é visível a cauda a terminar em ponta fina; (b) Macho de <i>Cruzia</i> sp. em que é visível a curvatura na extremidade posterior. As setas vermelhas apontam para indivíduos de <i>Strongyloides</i> sp. A barra (—) corresponde a 1cm.	46
Figura 25. Tubo de Eppendorf com um indivíduo de <i>Oligacanthorhynchus</i> sp. conservado em álcool absoluto no seu interior, achado no intestino delgado de G2 (<i>Didelphis aurita</i> , fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí). Apesar de desfocada, consegue notar-se na imagem a forma espiral e em plissada do acantocéfalo.	47
Figura 26. Resquício de plástico no interior do estômago de G2 (<i>Didelphis aurita</i> , fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí), observado à lupa estereoscópica.	47
Figura 27. Bloco de órgãos de G3 (<i>Didelphis albiventris</i> , macho, jovem, proveniente de Campinas) obtido após necrópsia. É possível ver, à transparência, nematodes no interior do intestino grosso (setas vermelhas).....	48
Figura 28. Cestodes presentes no intestino delgado de G3 (<i>Didelphis albiventris</i> , macho, jovem, proveniente de Campinas) obtidos após necrópsia.....	48
Figura 29. Grânulos provocados pela fixação de cestodes na mucosa do intestino delgado do indivíduo de estudo G7 (<i>Didelphis aurita</i> , macho, adulto, proveniente de Itatiba).....	49
Figura 30. Visíveis dois nematodes fixados na mucosa do intestino grosso de G31 (<i>Didelphis aurita</i> , macho, adulto, proveniente de Valinhos), causando reação inflamatória.	49

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Divisão percentual por classes de animais que deram entrada na AMC durante o estágio curricular da autora (18/02/2019 a 30/05/2019).	3
Gráfico 2. N.º total e n.º por espécie de indivíduos utilizados nas diferentes pesquisas.	38
Gráfico 3. Caracterização dos indivíduos que participaram no total do estudo (pesquisa de <i>T. cruzi</i> e de helmintes) pelo método de observação direta.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados da pesquisa de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Id. = Identificação do animal; Sp.=Espécie; M=Macho; F=Fêmea; A=Adulto; J=Jovem; CC = Condição Corporal; Ins = linfonodos (submandibulares); gl.=glândulas; RCP = Reação em Cadeia da Polimerase.	43
Tabela 2. Identificação e resultados dos indivíduos de <i>Didelphis</i> spp. submetidos a necrópsia para pesquisa de helmintes. Id.=Identificação; Sp.=Espécie; F=fêmea; M= Macho; A= Adulto; J= Jovem; S.A.D.R. = Sem alterações dignas de registo.	45
Tabela 3. Identificação taxonômica, prevalência (%), intensidade média, intensidade máxima e abundância dos achados helmintológicos.	50

Lista de Siglas e Acrônimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMC – Associação Mata Ciliar

AMP cíclico - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ARN – Ácido ribonucleico

CETAS – Centro de Triagem de Animais Silvestres

CRAS – Centro de Reabilitação de Animais Silvestres

DTN – Doença Tropical Negligenciada

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

EUA – Estados Unidos da América

FCAV–UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista

FMV–ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GEFAU - Sistema Integrado de Gestão da Fauna Silvestre do Estado de São Paulo

HAI – Hemaglutinação indireta

kADN – Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

LC – *Least Concern*

LIT – *Liver Infusion Triptose*

LL – Plano latero-lateral

LSU 24Sa-rARN - Subunidade maior do ARN ribossomal

LUC - *Land Use Change*

MLST – Tipagem por sequenciação de múltiplos loci

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

RCP – Reação em cadeia da polimerase

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SSU 24Sa-rARN - Subunidade menor do ARN ribossomal

Tc-Tox - *C9 cross-reactive protein*

UDTs - Unidades Discretas de Tipagem

UICN - União Internacional para a Conservação da Natureza

Lista de Abreviaturas

ag – antigénio

BID – Administração duas vezes ao dia

cm - centímetro

F/R - Forward/ Reverse

g – grama

G – gauge

h – hora

Ig – Imunoglobulina

kg - quilograma

L1, L2, L3, L4 e L5 - Larva no primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto estágio, respectivamente.

mm - milímetro

OPG – Ovos Por Grama

PO - *Per Os*

S.A.D.R. – Sem alterações dignas de registo

SC - Subcutâneo

SID - Administração uma vez ao dia

sp. - Espécie

spp. – Espécies

VD – Projeção radiográfica ventrodorsal

Lista de Símbolos

μm – micrómetro

° - graus

°C – graus centígrados

® - Marca registada

+ - Mais

x – Vezes

= - Igual

~ - Aproximadamente

% - Percentagem

1. Introdução

A crescente ação antrópica nos ecossistemas, nomeadamente por meio da desflorestação, leva a que muitos animais percam o seu habitat natural. Como consequência, muitas espécies têm vindo a aproximar-se das áreas urbanas em busca de habitação e alimento. Não raras vezes, estes animais são reservatórios, frequentemente assintomáticos, de agentes patogénicos nocivos à espécie humana e/ou espécies animais domésticas. De facto, a ligação entre os agentes patogénicos, o ambiente, as espécies animais e espécie humana são indissociáveis. Esta é a razão por que diferentes áreas do conhecimento devem unir esforços para compreender os problemas sanitários atuais e agir em concordância, de modo a evitá-los e, quando já existem, minimizá-los. Esta abordagem denomina-se *One Health* (Jenkins et al. 2015) e, nos dias que correm, muito pelo contexto pandémico em que vivemos devido ao SARS CoV-2, agente da Covid-19, tem crescido o reconhecimento da sua relevância.

Trypanosoma cruzi é um dos exemplos da importância da abordagem *One Health*. Sendo o agente da Doença de Chagas, considerada, pela Organização Mundial de Saúde, uma Doença Tropical Negligenciada (OMS 2020), que ainda afeta milhões de pessoas por ano, principalmente na América Latina, o conhecimento sobre a sua biologia e epidemiologia, nomeadamente pelo estudo dos seus vetores naturais e hospedeiros reservatório, é fulcral para o seu controlo. Uns dos principais reservatórios da Doença de Chagas são as espécies pertencentes ao género *Didelphis*. Estes animais, conhecidos vulgarmente por gambás, no Brasil, e como *opossums*, nos países anglo-saxónicos, são sinantrópicos e ocorrem ao longo de todo o continente americano.

As helmintoses são pouco estudadas nas espécies selvagens, muito pelo difícil contacto com estes animais, mas também pela falta de retorno económico após a obtenção dos resultados, divergindo, desta forma, dos estudos feitos na espécie humana e nos animais domésticos que resultam numa melhoria direta do estado geral da saúde e eventual aumento da produtividade. Contudo, o estudo de helmintes na vida selvagem traduz-se não só num maior conhecimento científico *per se*, como também na obtenção de informação importante em matérias como zoonoses, saúde dos ecossistemas e conservação de espécies em risco de extinção. Com efeito, os gambás são espécies cuja fauna helmintológica é pouco conhecida, restringindo-se as pesquisas realizadas sobretudo ao gambá-da-virgínia (*Didelphis virginiana*) e ao gambá-comum (*Didelphis marsupialis*) (Silva & Costa 1999).

O presente trabalho propõe a pesquisa de *Trypanosoma cruzi* e o registo da fauna helmintológica dos gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) da Associação Mata Ciliar, Jundiá, São Paulo.

2. Relatório de Estágio

O estágio curricular referente ao 12.º semestre do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da autora teve lugar na Associação Mata Ciliar (AMC) – Jundiáí, São Paulo, Brasil, sob a orientação da Doutora Cristina Adania, no período compreendido entre 19 de fevereiro de 2019 e 30 de maio de 2019, de onde foi atingido um cumulativo de 696 horas pelos diversos serviços inerentes à Associação Mata Ciliar, bem como pela pesquisa para o meu trabalho final a ser apresentado no último dia de estágio e que serviria de base para a minha dissertação de mestrado.

2.1. Sobre a Associação Mata Ciliar

Fundada em 1987, a AMC é uma Organização Não Governamental (ONG) que originalmente se destinava a conservar os cursos de água e repor a flora das matas ciliares no interior do estado de São Paulo. Em 1997, para além da conservação da flora e dos recursos hídricos, a AMC passou a ter um CRAS e, mais tarde, um Centro de Conservação de Felinos Neotropicais. Este último conta hoje com indivíduos de 8 das 9 espécies felinas que ocorrem no Brasil - gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), puma (*Puma concolor*) e jaguar (*Panthera onca*) - e tem como objetivo implementar estratégias para a conservação destas espécies, sendo um centro de referência internacional.

O CRAS tem como principal missão receber os animais silvestres, prestar-lhes atendimento veterinário, reabilitá-los sempre que possível e, uma vez que estejam aptos, realizar a sua libertação no seu habitat natural, próximo do local onde foram encontrados. A maioria dos animais que dá entrada na AMC é trazida pela Polícia Ambiental, Corpo de Bombeiros, Guarda Municipal e Defesa Civil de Jundiáí e municípios circundantes. Mais raramente, também são trazidos por munícipes. As principais causas de admissão destes animais são o atropelamento, eletrocussão, queimadas, caça, tráfico e demais atuações antrópicas. Alguns destes animais não conseguem uma total recuperação, precisando de permanecer em cativeiro. Para estes, procura-se proporcionar a melhor condição de vida possível, trabalhando-se com a ambientação dos recintos, enriquecimento ambiental e uma nutrição adequada para cada espécie.

Durante o estágio da autora, entre os animais em processo de reabilitação, os que aguardavam a reabilitação e os que permaneciam em cativeiro por impossibilidade de recuperação, o CRAS mantinha cerca de 800 animais. Neste período, deram entrada na AMC 364 indivíduos da

classe Aves, 163 da classe Mammalia, 48 da classe Reptilia e 1 da classe Arachnida (**Gráfico 1**).

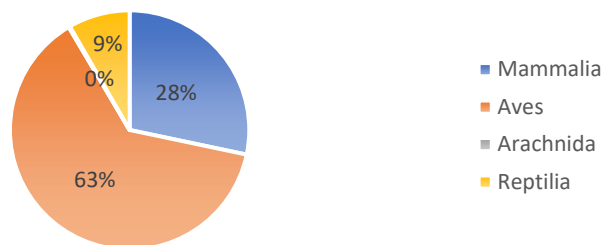


Gráfico 1. Divisão percentual por classes de animais que deram entrada na AMC durante o estágio curricular da autora (18/02/2019 a 30/05/2019).

2.2. Atividades desenvolvidas

2.2.1. Rotineiras

- Contenção, realização de curativos, preparação e administração de fármacos e manejo alimentar e higiênico dos diferentes mamíferos, aves e répteis que chegavam à AMC;
- Higienização dos recintos, enriquecimento ambiental, alimentação e administração de fármacos a animais do CRAS;
- Preparação da dieta para os diferentes animais em convalescença e do CRAS;
- Necrópsias (~60);
- Cuidados neonatais a órfãos de mamíferos (~60), principalmente *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*, e de aves (~100), principalmente *Psittacara leucophthalmus*.

2.2.2. Pontuais

- Controlo de anestesia (~10) ;
- Participação em cirurgias (~10);
- Sedação (~15);
- Radiografias (~10);
- Eutanásia (~5);
- Urgências noturnas (~10);
- Resgates (~4);
- Libertações de animais reabilitados (~6);
- Videomonitorização (de madrugada, durante 1 semana) de 3 fêmeas de jaguar submetidas a inseminação artificial.

2.2.3. Outras

- Educação Ambiental (na própria AMC, em escolas e até numa reunião de condomínio);
- Atividades administrativas, nomeadamente, o registo online das entradas dos animais na AMC, no Sistema Integrado de Gestão da Fauna Silvestre do Estado de São Paulo (GEFAU).

2.2.4. Exemplos

As atividades desenvolvidas durante o período de estágio na AMC foram diversas. Alguns exemplos podem ser observados nas **Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**.



Figura 1. Exemplos de animais internados na clínica. (A) Fêmea de gambá-de-orelha-preta encontrada atropelada com crias; (B) Coruja-buraqueira a recuperar de uma lesão no membro anterior direito; (C) Alimentação de um beija-flor com preparação de néctar de flores; (D) Chegada de fêmea de lobo-guará com forte suspeita de sarna demodécica (fonte: arquivo pessoal).



Figura 2. Exemplos de enriquecimento ambiental em (B) gato-do-mato-pequeno, (C) ocelote e (D) jaguar. Foram utilizados pedaços de coração de vaca envoltos em capim e embrulhados em folha de capim-palmeira e cipó (A) que eram depois pendurados nos recintos, simulando presas, de forma a estimular os instintos de caça que estes animais apresentam na natureza (fonte: arquivo pessoal).

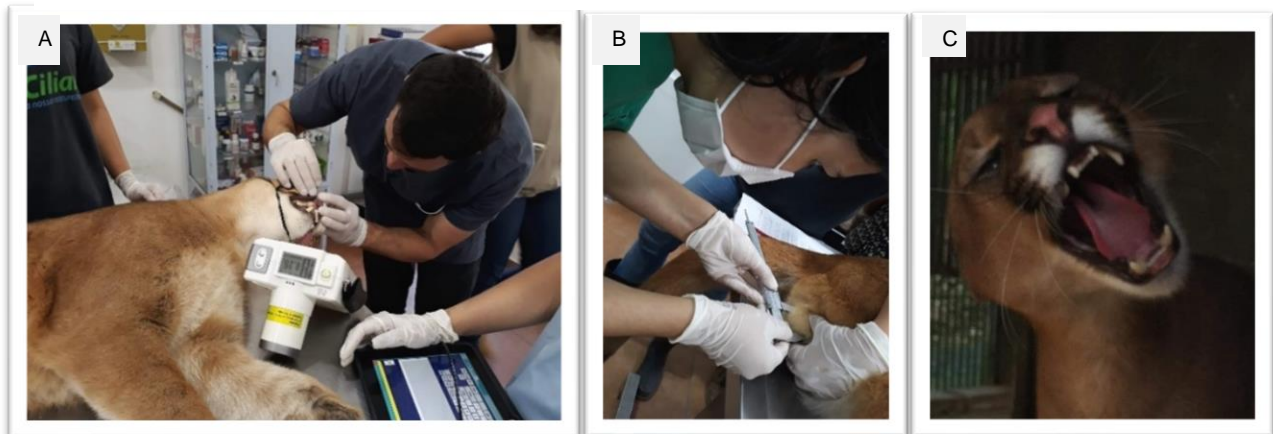


Figura 3. Intervenção oral num puma macho com disfagia. Anestesiou-se o animal com dardo para se proceder a radiografia e observação da cavidade oral. O animal apresentava uma bolsa periodontal com fístula no dente canino direito da maxila. (A) Médico Veterinário Dentista a observar a boca do puma; (B) Realização da biometria; (C) Animal no período pós-cirúrgico (fonte: Rafael Bigati).



Figura 4. Participação no resgate de um gato-mourisco encontrado com dificuldades de locomoção e sinais de trauma, próximo de uma estrada movimentada. (A) Passagem do animal para uma jaula de contenção; (B) Observação clínica já nas instalações da AMC (fonte: AMC).

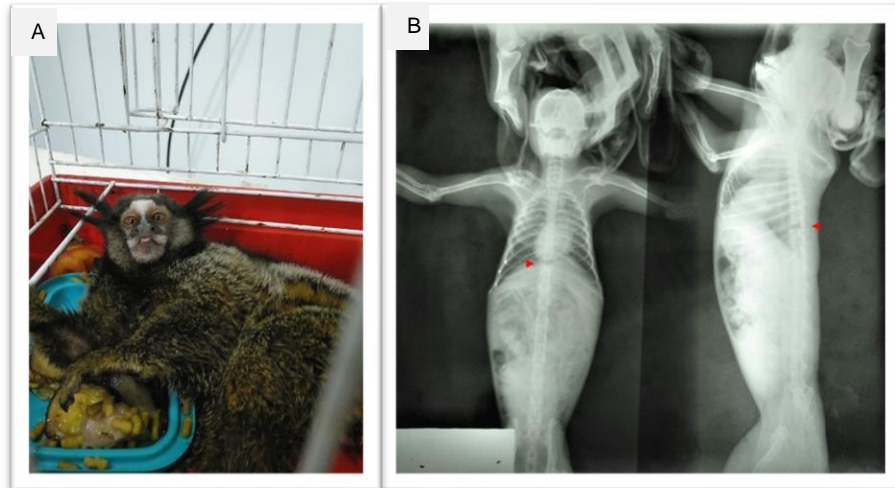


Figura 5. Radiografia nos planos VD e LL (B) a um saguim-de-tufo-preto (A), evidenciando fratura vertebral a nível torácico (▶). O animal foi encontrado prostrado com paresia dos membros posteriores, próximo de uma linha de alta tensão, tendo, presumivelmente, caído como consequência de um choque elétrico. Acabou por se proceder à eutanásia neste animal (fonte: arquivo pessoal).

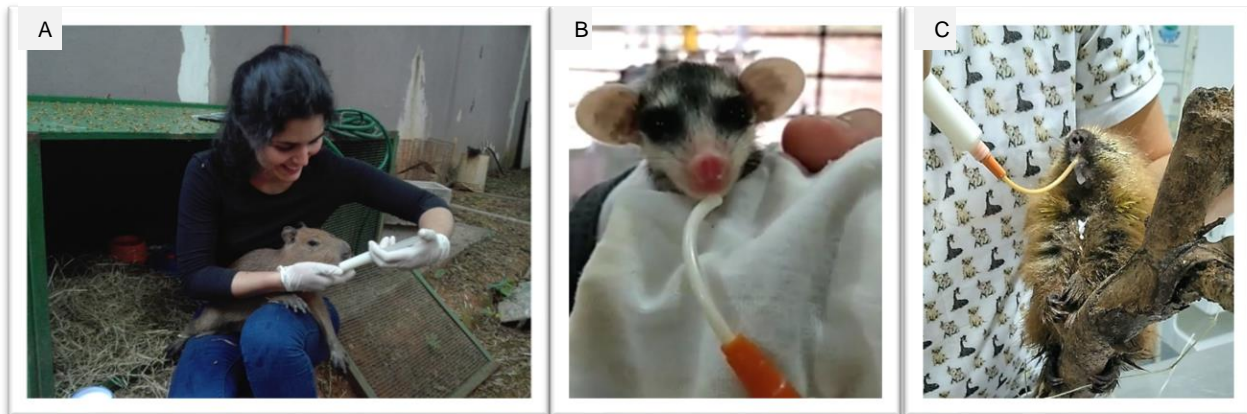


Figura 6. Aleitamento de crias órfãs. (A) Capivara (fonte: Beatriz Pessoa); (B) Gambá-de-orelha-branca (fonte: Alice Araújo); (C) Porco-espinho (fonte: arquivo pessoal).



Figura 7. Libertação de uma preguiça-de-três-dedos na Serra do Japi, S.P. (fonte: arquivo pessoal).

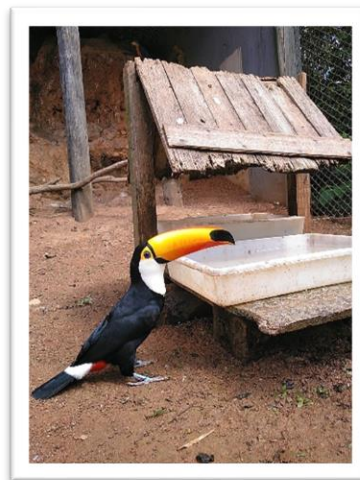


Figura 8. Tucano-toco no seu recinto de reabilitação (fonte: arquivo pessoal).

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Caracterização das espécies *Didelphis albiventris* Lund, 1840 e *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826

3.1.1. Caracterização taxonômica do gênero *Didelphis*

Didelphis albiventris Lund, 1840 e *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 pertencem ao gênero *Didelphis* Linnaeus, 1758, subfamília Didelphinae, família Didelphidae (do grego di-duo; delphos – útero), ordem Didelphimorphia, infraclasse Metatheria (~ Marsupialia), subclasse Theria, classe Mammalia, filo Chordata e reino Animalia.

No Brasil, consoante a região, os indivíduos do gênero *Didelphis* possuem várias designações, entre elas sarigueia, mucura, timbu e gambá, sendo esta última a mais frequente. “Gambá” deriva do tupi-guarani e significa “ventre aberto”, fazendo referência ao marsúpio das fêmeas (Dicio 2020) (**Anexo 1**).

3.1.2. Estado de conservação e distribuição

Estão registadas 62 espécies diferentes de marsupiais no Brasil, todas pertencentes à família Didelphidae (SIBBr 2020). O gênero *Didelphis* ocorre exclusivamente no continente americano, desde o Sudoeste do Canadá até ao Sudeste da Argentina (Austad 1988), apresentando 6 espécies: *D. aurita*; *D. albiventris*; *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758; *Didelphis imperfecta* Mondolfi & Pérez-Hernández, 1984; *Didelphis pernigra* J. A. Allen 1900; *Didelphis virginiana* Kerr 1792. Existem evidências fósseis que sugerem que a origem dos gambás se deu na América do Sul, há cerca de quatro milhões de anos atrás (Austad 1988).

As espécies *D. albiventris*, vulgo gambá-de-orelha-branca, e *D. aurita*, vulgo gambá-de-orelha-preta, ocorrem exclusivamente na América do Sul, com uma elevada distribuição no Brasil, incluindo o estado de São Paulo (**Anexo 2**). Ambas aparecem na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) com baixo risco de extinção (LC) (Costa et al. 2015; Moraes et al. 2015). As espécies *D. marsupialis* e *D. imperfecta* também ocorrem no Brasil (SIBBr 2020), porém, no estado de São Paulo, *D. aurita* e *D. albiventris* são as únicas existentes.

3.1.3. Hábitos alimentares, período de atividade e ecologia

As espécies *D. albiventris* e *D. aurita* são consideradas frugívoras-omnívoras (Paglia et al. 2012). A dieta de ambas é majoritariamente constituída por invertebrados como insetos,

aranhas e até escorpiões, incluindo os venenosos, por apresentarem resistência ao seu veneno, e, no caso de *D. albiventris*, secundariamente por fruta (Cáceres 2002; Costa et al. 2015). A espécie *D. aurita* também se alimenta de frutos, mas mais esporadicamente (Cáceres & Monteiro-Filho 2001). Ambas as espécies são também capazes de predação de pequenos vertebrados. Tanto *D. albiventris* como *D. aurita* adaptam facilmente a sua dieta à disponibilidade de alimentos e, por terem uma longa área de locomoção e por se deslocarem frequentemente entre biomas, funcionam como importantes dispersores de sementes (Cáceres & Monteiro-Filho 2001; Cáceres 2002).

Um estudo realizado entre 2016 e 2017, numa área urbana de Leopoldina (Minas Gerais, Brasil), relata a observação de indivíduos adultos e jovens de *D. aurita* a alimentarem-se naturalmente de caramujos-gigantes-africanos (*Achatina fulica*), um gastrópode invasor de origem africana, considerado praga no Brasil, com efeitos nefastos nos ecossistemas, plantações e saúde pública, podendo servir como hospedeiro intermediário de angiostrongilíase cerebral, uma meningite comum no continente africano (Rabelo & Veira 2017).

Os gambás são reconhecidos popularmente por serem resistentes ao veneno de cobras peçonhentas como as cascavéis (*Crotalus* spp.), jararacas (*Bothrops* spp.) e cobras-coral (*Micrurus* spp.), o que, para além de servir de mecanismo de escape, também se traduz numa fonte alimentar alternativa. O reconhecimento dos gambás como resistentes à hemorragia e miocrose tecidual localizada provocadas pelas cobras peçonhentas, foi confirmado cientificamente ao longo dos anos: ao comprovar-se a eficácia do soro de *D. marsupialis* quando aplicado diretamente em lesões provocadas experimentalmente em ratos (Perales et al. 1992); ao estudar-se a proteína antimiotóxica com uma estrutura tipo-imunoglobulina presente no soro de *D. marsupialis* (Rocha et al. 2002); e ao isolar-se no plasma, soro e músculo de *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. virginiana* inibidores de metaloproteinases de veneno ofídico, responsáveis pela hemorragia (Perales et al. 2005). Os mesmos autores sugerem que estes inibidores fazem parte do sistema imunitário inato dos gambás (idem).

Keesing et al. (2009), num estudo levado a cabo no estado de Nova Iorque, EUA, em que carraças do género *Ixodes* na fase larvar foram colocadas em contacto com várias espécies de hospedeiros para perceber o papel destes como armadilhas ecológicas para a Doença de Lyme (infecção provocada por *Borrelia burgdorferi*), concluíram que indivíduos de *D. virginiana* são capazes de ser abundantemente parasitados por ixodídeos na natureza, podendo hospedar mais de 5500 por semana nas épocas de maior humidade e calor, dos quais só 3,5% conseguem levar a sua refeição avante, sendo os restantes ingeridos. No contexto brasileiro, tal comportamento por parte dos gambás terá, presumivelmente, um papel no controlo de infeções que se servem

de carrças dos géneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus* como hospedeiras intermediárias, responsáveis pela transmissão da Doença de Lyme Brasileira (infecção por *Borrelia burgdorferi*) e da Febre Maculosa (infecção por *Rickettsia rickettsii*). Porém, serão necessárias pesquisas para confirmar esta ideia.

Os gambás são mamíferos escansoriais, sendo ágeis a moverem-se entre árvores, porém, lentos na sua locomoção no solo. Apresentam hábitos crepusculares, noturnos e solitários, só se agrupando na época reprodutiva, quando formam casais e se juntam em tocas (Nascimento & Horta 2014).

O peso adulto de *D. albiventris* varia entre 500g e 2700g e o de *D. aurita* entre 670g e 1800g (Paglia et al. 2012), sendo o comprimento médio de ambas as espécies de 98 cm (corpo e cauda) (idem).

Na natureza, *D. albiventris* é sobretudo encontrado nos biomas Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa, enquanto *D. aurita* habita principalmente o bioma Mata Atlântica (Paglia et al. 2012). Contudo, e como consequência da desflorestação crescente, os gambás aproximam-se cada vez mais dos espaços ocupados por humanos em busca de alimento e abrigo, sendo, por isso, atualmente considerados animais sinantrópicos. De facto, é comum observá-los em áreas urbanas e periurbanas, sendo muitos os relatos sobre gambás que são mortos por serem confundidos com outros mamíferos indutores de pragas, como *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*.

Os principais predadores de gambás na América Latina são espécies do género *Leopardus* (Paglia et al. 2012).

Os gambás possuem duas estratégias de defesa: a tanatose, que consiste em fingirem-se de mortos até que o predador se afaste, e a libertação de uma substância odorífera forte e desagradável proveniente das suas glândulas perianais (duas) quando se sentem ameaçados.

As principais causas de entrada de gambás em CRAS são ataques por animais domésticos e atropelamentos (Nascimento & Horta 2014), sendo muitos destes casos fêmeas com crias no marsúpio, ou agarradas ao seu pelo, dependentes de lactação e estimulação materna para defecar e urinar. Estas fêmeas muitas vezes não resistem aos ferimentos e acabam por morrer, deixando as suas crias órfãs e dependentes de cuidados humanos para sobreviverem.

3.1.4. Reprodução

Os gambás pertencem à infraclasse Metatheria, sendo esta anatomicamente caracterizada pela existência, nas fêmeas, de um marsúpio que deriva de um excesso de pele na região abdominal caudal, com glândulas mamárias no seu interior. Esta infraclasse é ainda caracterizada pela ausência de placenta e também por um trato urogenital com uma disposição diferente

da dos mamíferos placentários. De facto, em todos os marsupiais, os ureteres encontram-se medialmente aos ductos genitais, enquanto que nos mamíferos placentários ocorrem lateralmente (Gonçalves et al. 2009). Relativamente ao aparelho reprodutivo, as fêmeas marsupiais apresentam um útero do tipo duplo com dois úteros e dois cérvices independentes, um complexo vaginal composto por duas vaginas dispostas lateralmente a uma pseudovagina (estrutura em fundo de saco) e um seio urogenital medialmente (idem). As vaginas laterais servem apenas para a passagem de sémen. Durante o parto, forma-se um canal de passagem para o(s) feto(s) entre a pseudovagina e o seio urogenital (idem). O aparelho reprodutor masculino da família Didelphidae, à semelhança de muitos outros marsupiais, apresenta uma glândula bífida e uma bolsa escrotal localizada cranialmente ao pénis (Nascimento & Horta 2014) (**Anexo 1**).

As fêmeas de *Didelphis* spp. são poliétricas sazonais, com ciclos éstricos de 28 dias. Tanto os machos como as fêmeas deste género atingem a maturidade sexual entre os 6 e os 8 meses de idade. No Brasil, o seu período reprodutivo começa em julho e, posteriormente, em novembro, podendo haver variações individuais e/ou com as condições climáticas (idem).

O período de gestação de *D. albiventris* e *D. aurita* é de aproximadamente 13 dias, com um número de neonatos entre 5 e 13. No parto, durante a fase de expulsão, a fêmea curva-se e desloca a sua cauda ventrocranialmente, de modo a facilitar a caminhada dos neonatos para o seu marsúpio (idem). Um marsupial neonato tem cerca de 2 a 5 cm e pesa entre 0,01% e 0,05% do peso materno, contrastando com os neonatos de animais placentários que pesam entre 2% e 3% do peso materno (Jansen et al. 2002), é surdo e cego, completando a sua organogénese dentro do marsúpio. Aqui, cada neonato fixa-se a uma papila mamária - treze papilas em *Didelphis* spp. -, permanecendo assim entre 3 e 4 meses (Nascimento & Horta 2014).

3.2. Caracterização de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909

3.2.1. Evolução do conhecimento sobre a epidemiologia de *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 é um protozoário monoflagelado da família Trypanosomatidae conhecido por ser o agente da Doença de Chagas, também apelidada de Tripanosomíase Americana. Esta doença deve a sua designação a Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas que a descobriu, em 1909. Por esta altura, isolou *T. cruzi* em triatomíneos (vulgarmente denominados por barbeiros) da espécie *Panstrongylus megistus*, infetou animais em laboratório e descreveu os sinais clínicos da fase aguda da doença numa criança infetada (Chagas 1909). Em 1912, Chagas descobriu ser o tatu-galinha (*Dasytus novemcinctus*), pertencente à superordem Xenarthra, um dos reservatórios selvagens de *T. cruzi* e, no mesmo biótopo, encontrou

exemplares de triatomíneos da espécie *Panstrongylus geniculatus* com o protozoário, definindo, assim, o ciclo selvagem da Doença de Chagas (Chagas 1912).

Desde então, foi grande a evolução no conhecimento sobre a epidemiologia desta doença. As descobertas incluíram: mais espécies de triatomíneos vetores - para além de *P. megalistus* e *P. geniculatus*, também *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, entre mais de trezentas outras espécies que podem transmitir o protozoário (Barretto 1967; Coura & Dias 2009); mais espécies domésticas afetadas – os animais mais importantes são o cão, gato, ratos, ratazanas e porquinhos-da-índia, nos países onde se faz a sua criação (Roque & Jansen 2014); mais reservatórios naturais - estão descritos mais de cem espécies reservatório entre marsupiais, xenartros, morcegos, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas não humanos, sendo os indivíduos do género *Didelphis*, e em especial *D. marsupialis*, os mais importantes no ciclo selvagem da doença (Barretto 1967; Coura & Dias 2009; Jansen et al. 2018). Várias fontes referem que as aves, os répteis e os peixes são naturalmente resistentes à infeção por *T. cruzi* (Coura & Dias 2009; Roque & Jansen 2014; Jansen et al. 2018). Kierszenbaum et al. (2015) sugerem que a resistência em aves ocorre por lise mediada pelo sistema de complemento, refutando, assim, a ideia anterior dominante de que esta seria dependente de anticorpos.

A partir da década de 1960, começaram a surgir muitos estudos sobre os aspetos morfológicos, imunológicos, patogénicos e terapêuticos de *T. cruzi*, os quais trouxeram uma maior compreensão acerca do complexo ciclo biológico desta doença, permitindo a implementação de medidas de controlo adequadas a cada região afetada (Coura & Dias 2009).

3.2.2. Enquadramento taxonómico

A espécie *Trypanosoma cruzi* pertence ao reino Protozoa e filo Sarcomastigophora, o qual é constituído pelos subfilos Mastigophora (flagelados), Sarcodina (amebas) e Opalinata (opalinas). Como protozoário flagelado, insere-se no subfilo Mastigophora. A sua classe é Zoomastigophora, pertencendo à ordem Kinetoplastida, cujos membros são caracterizados por possuírem uma mitocôndria modificada, designada por cinetoplasto, que está localizada na base flagelar, intervindo ativamente na sua locomoção, e que contém um grânulo de ADN (kADN). A espécie *T. cruzi* insere-se na família Trypanosomatidae, a qual também é constituída pelos géneros *Leishmania*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, entre outros (Souza & Vidal 2017). Destes, é de destacar o género *Leishmania*, por possuir espécies agentes zoonóticas da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar, das quais os gambás são importantes reservatórios naturais (Santiago 2007; Monteiro 2010). Outros exemplos do género *Trypanosoma* incluem *Trypanosoma brucei*, agente zoonótico responsável pela Tripanossomíase Humana Africana

(vulgo Doença do Sono) na África subsariana (CDC 2020a), *Trypanosoma evansi*, agente da surra nos animais, com ampla distribuição geográfica (Paraguassu et al. 2016), e *Trypanosoma rangeli*, que afeta muitos mamíferos no continente americano, mas que não é patogénico quando afeta a espécie humana (Grisard et al. 1999). A espécie *T. cruzi* pertence ao subgénero (*Schizotrypanum*), que se caracteriza por possuir formas de desenvolvimento intracelulares (amastigotas) (Souza and Vidal 2017). Ao microscópio ótico, os tripanosomatídeos apresentam formas distintas, consoante a posição do cinetoplasto relativamente ao núcleo, bem como a presença, ou não, de flagelo. Em relação a *T. cruzi*, é possível distinguir quatro formas:

- A forma amastigota (3-5µm de diâmetro), arredondada, que não tem flagelo visível ao microscópio ótico, é intracelular e replicativa (**Figura 9-C**), estando presente no mamífero infetado sob a forma de pseudoquistos e no intestino médio dos vetores triatomíneos (antes de se diferenciarem em epimastigotas) (Tyler and Engman 2001);
- A forma esferomastigota, resultante do alargamento da forma amastigota, extensão do flagelo e começo de movimentação na transição para a forma epimastigota (idem);
- A forma epimastigota, flagelada e replicativa, com o cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo do parasita (**Figura 9-A**), presente no intestino médio dos vetores triatomíneos (idem) e nas glândulas perianais de *Didelphis* spp. (Deane et al. 1986; Urdaneta-Morales and Nironi 1996);
- A forma tripomastigota, em que o cinetoplasto se insere no polo posterior da célula, por onde sai um flagelo, que, em conjunto com a membrana celular, forma uma membrana ondulante (**Figura 9-B**). No sangue periférico dos mamíferos, assume a forma tanto delgada, como atarracada. Os tripomastigotas designam-se por metacíclicos quando estão presentes no intestino posterior dos triatomíneos (Tyler and Engman 2001) e no lúmen

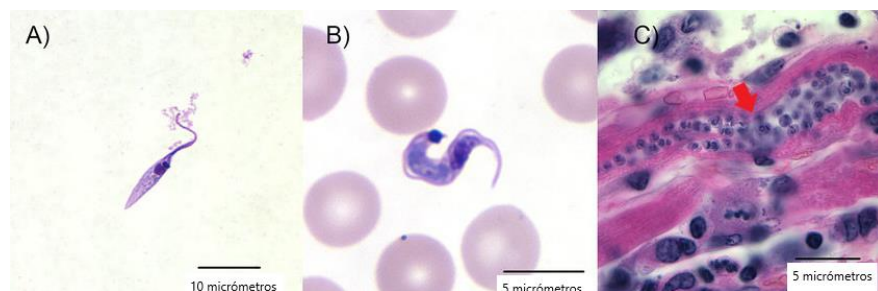


Figura 9. Diferentes formas de *Trypanosoma cruzi*. (A) A forma epimastigota em cultura (corada por Giemsa); (B) A forma tripomastigota numa amostra de sangue periférico de um indivíduo com infeção aguda da Doença de Chagas (corada por Giemsa); (C) Pseudoquisto (seta vermelha) dentro de um miócito cardíaco de um indivíduo com Doença de Chagas crónica (corada por hematoxilina e eosina). Adaptado de Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach – Figura científica em ResearchGate. Disponível em https://www.researchgate.net/figure/Trypanosoma-cruzi-morphological-forms-A-The-replicating-epimastigote-form-in-culture_fig1_337566419 [acedido a 4 Out, 2020]].

das glândulas perianais de *Didelphis* spp. (Deane et al. 1986; Urdaneta-Morales and Nironi 1996), prontos a infetar.

3.2.2.1. Unidades Discretas de Tipagem (UDTs)

T. cruzi foi dividido por muitos anos em dois grupos principais para fins epidemiológicos: o grupo I, mais associado aos reservatórios naturais de Didelphimorphia (nomeadamente gambás); o grupo II, associado à superordem Xenarthra, com subdivisões adicionais (Zingales et al. 2009). Em 2009, foi publicado um consenso para a nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi* com base em genotipagem por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), sendo hoje reconhecidas sete Unidades Discretas de Tipagem (UDTs), seis de *T. cruzi* I a *T. cruzi* VI (TcI-TcVI) (idem) e uma associada ao genótipo de morcego, *T. cruzi* bat/VII (Tcbat/VII) (Marcili et al. 2009). Algumas UDTs podem predominar em certos ciclos selvagens ou domésticos, ou ocorrer em diferentes áreas geográficas (idem). Acredita-se que podem também ter uma tendência para causar síndromes diferentes entre elas. No entanto, este facto ainda não foi completamente compreendido. Infecções mistas com mais de uma UDT são comuns. Todas as UDTs, incluindo Tcbat, podem infetar a espécie humana (Marcili et al. 2009; Zingales et al. 2009; Murillo-Godínez 2018).

3.2.3. Ciclo biológico

Quando os triatomíneos se alimentam do sangue periférico de mamíferos infetados por *T. cruzi*, estão a ingerir uma população pleomórfica de tripomastigotas delgados e atarracados e cerca de 10% de formas amastigotas (Rodriguez et al. 1996) (**Figura 10**). Ao chegarem ao intestino médio do triatomíneo, os tripomastigotas de *T. cruzi* diferenciam-se em amastigotas, sendo que a forma delgada passa intermedicamente pela forma atarracada. Os amastigotas são geralmente replicativos e, no ambiente do intestino médio do vetor, transformam-se em epimastigotas. No início da transição, os amastigotas alargam-se e estendem o flagelo que começa a movimentar-se (fase esferomastigota). À medida que a densidade celular aumenta, o corpo celular e o flagelo alongam-se, dando lugar à clássica forma epimastigota, que também é replicativa (Tyler and Engman 2001). Os epimastigotas vão depois aderir hidrofobicamente à cutícula cerosa da parede do intestino posterior num processo presumivelmente mediado por adenosina 3',5' - monofosfato cíclico (AMP cíclico) (Gonzales-Perdomo et al. 1988) designado por metaciclogénese. Uma vez formados, os tripomastigotas metacíclicos libertam-se e são eliminados nas fezes. Quando o triatomíneo se alimenta, a penetração do seu aparelho bucal, do tipo picador-sugador, na pele, causa uma solução de continuidade. O contacto das fezes do triatomíneo com as mucosas do mamífero conduz a infeção (CDC 2019a). Uma vez na corrente sanguínea, os

tripomastigotas metacíclicos são capazes de parasitar um grande número de células nucleadas por mecanismos de reconhecimento, sinalização e fagocitose complexos, diferentes entre UDTs (Carvalho & Barrias 2017). Durante a fagocitose, o citoesqueleto da célula é direcionado para recrutar lisossomas até ao local da aderência do parasita, onde se fundem com a membrana plasmática, formando, primeiramente, uma junção com os parasitas e, posteriormente, um compartimento vacuolar, permitindo a entrada do parasita na célula. A fusão lisossomal resulta numa acidificação do vacúolo parasitóforo, que servirá para ativar a secreção de *C9 cross-reactive protein* (Tc-Tox), um péptido que tem homologia com o fator 9 do complemento humano, que forma pequenos poros na membrana vacuolar, facilitando, assim, a saída dos tripomastigotas para o citoplasma (Rodriguez et al. 1996). Aqui, diferenciam-se em amastigotas, os quais proliferam formando um pseudoquisto. Quando se atinge uma alta densidade de amastigotas dentro do pseudoquisto, estes diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos por meio de formas intermédias, algumas das quais com morfologia epimastigota. Uma vez formados, os tripomastigotas escapam do pseudoquisto para o sangue e linfa sob a forma delgada, invadindo as células de uma forma semelhante à invasão metacíclica existente nos vetores. Quando as formas delgadas falham na invasão de uma nova célula, sofrem uma mudança morfológica, primeiro para a forma tripomastigota atarracada e depois para a forma amastigota. Esta falha na diferenciação é a

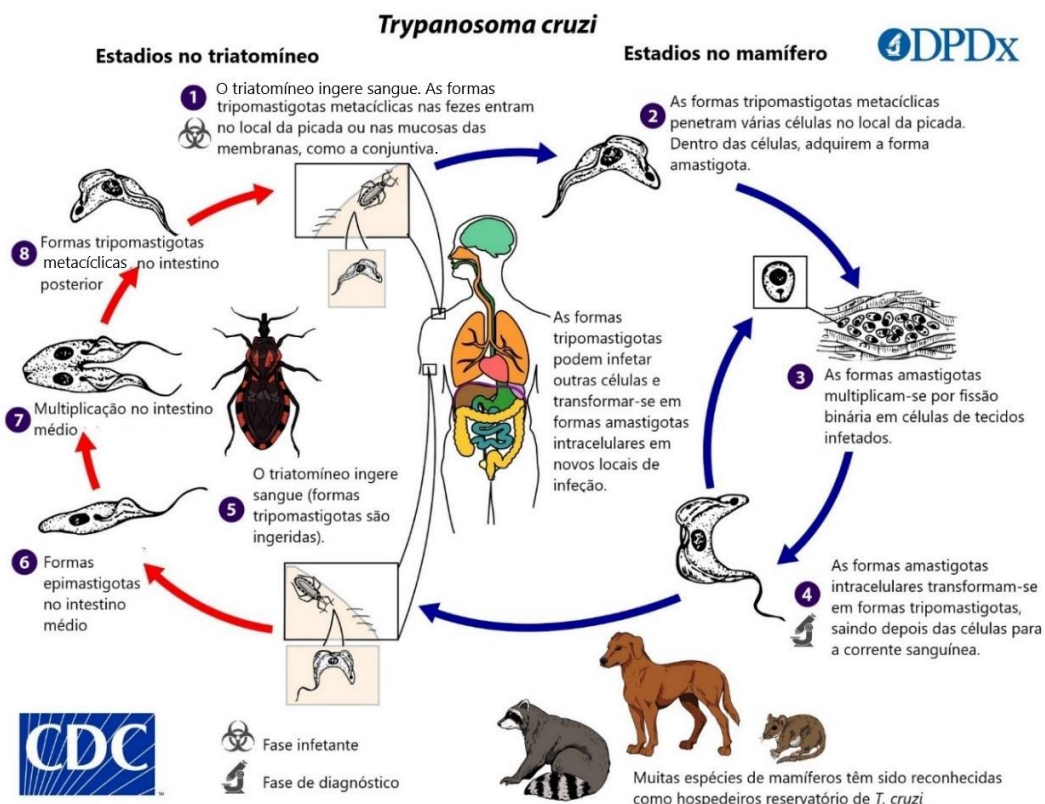


Figura 10. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de CDC (2019a).

causa presumível do pleomorfismo observado nos tripomastigotas do sangue periférico. As células que sofrem lise prematura podem também libertar amastigotas que são observados na corrente sanguínea durante a fase aguda da infecção, os quais, embora por um mecanismo diferente dos tripomastigotas, podem servir para propagar a infecção, pois também são capazes de infectar células, particularmente células fagocitárias. A mistura de tripomastigotas e amastigotas presente no sangue de um mamífero infetado por *T. cruzi* serve para completar o ciclo de vida quando são ingeridos por um triatomíneo (Rodriguez et al. 1996; Carvalho & Barrias 2017). Para além da forma vetorial, não é de descurar a transmissão oral que ocorre por contaminação alimentar com triatomíneos triturados, fezes de triatomíneos infetados (caldo de cana, açai, entre outros) (OMS 2020), ou excreção do conteúdo das glândulas perianais de gambás infetados.

T. cruzi perpetua-se pelos ciclos domiciliar, peridomiciliar e selvagem e interação entre eles: o ciclo domiciliar mantém-se por meio de espécies domiciliárias de triatomíneos que transmitem o protozoário de animais domésticos para humanos e de humanos para humanos; o ciclo selvagem é enzoótico e é mantido pelos triatomíneos e hospedeiros selvagens; o ciclo peridomiciliar tem origem no ciclo selvagem e mantém a infecção entre os animais domésticos em áreas próximas de zonas habitadas por humanos, através da ação de triatomíneos peridomiciliares e, ocasionalmente, através de trocas com o ciclo selvagem (por exemplo: cães e gatos que predam animais selvagens; animais selvagens, como roedores e *Didelphis* spp., que invadem áreas de habitação humana) (Coura & Dias 2009).

Embora os triatomíneos sejam conhecidos na natureza desde o século XVI, a sua aproximação aos espaços domiciliários e peridomiciliares só começou com o ciclo agrícola e foi intensificada com o ciclo pecuário, com o aumento da desflorestação e com a diminuição da fauna selvagem, que era a sua fonte alimentar (Forattini 2006). Sob o ponto de vista biogeográfico, a domiciliação triatomínea possui uma distribuição geral que coincide com os espaços abertos, os quais se têm expandido com a crescente ação antrópica (Forattini et al. 1971).

3.2.4. Relação de *T. cruzi* com os gambás

Os indivíduos do género *Didelphis* apresentam índices de infecção relativamente altos, conforme confirmado por Schweigmann et al. (1995), e uma parasitémia patente de longa duração (Fernandes et al. 1991; Jansen-Franken 2017). Deane et al. (1986) detetaram pela primeira vez formas epimastigotas, tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicas no conteúdo das glândulas perianais de gambás inoculados com fezes de triatomíneos infetados, concluindo que indivíduos de *Didelphis* spp. possuem a capacidade de desenvolver um ciclo biológico duplo de *T.*

cruzi. Urdaneta-Morales e Nironi (1996) comprovaram a presença de todos os estádios de *T. cruzi* nas glândulas perianais em *D. marsupialis*, encontrando formas amastigotas no parênquima e formas epimastigotas, tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicas no seu lúmen (**Figura 11**). A capacidade única de as glândulas perianais comportarem o ciclo biológico completo de *T. cruzi*, excretando formas tripomastigotas metacíclicas para o lúmen e daí para o exterior, sendo esta uma via de infecção, reforça a sua importância como reservatório da Doença de Chagas. A somar a estes fatores, há ainda a extensa distribuição geográfica e o caráter sinantrópico, que lhes permite servir de ligação entre o ciclo de transmissão selvagem e domiciliar, nomeadamente ao servir de fonte alimentar para triatomíneos domiciliários.

Com a erradicação, no Brasil, em 2006, de *Triatoma infestans*, vetor domiciliar e antropofílico, a transmissão domiciliar da Doença de Chagas foi interrompida (Ferreira & Silva 2006). Contudo, tendo em conta a capacidade de transmissão de *T. cruzi* por outros triatomíneos e a cada vez maior proximidade de mamíferos silvestres, nomeadamente do género *Didelphis*, dos espaços humanos, é necessário manter uma vigilância epidemiológica apertada, a qual inclui a aplicação de inseticida nos espaços domiciliar e peridomiciliar, assim como a avaliação da taxa de infecção por *T. cruzi* em hospedeiros reservatórios peridomiciliados (Silva 2019).

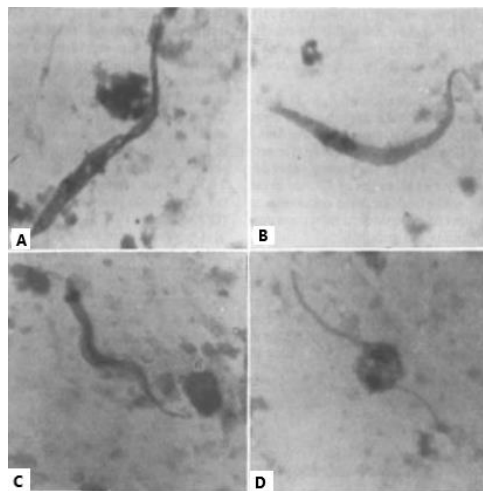


Figura 11. Conteúdo das glândulas perianais de gambús naturalmente infetados por *Trypanosoma cruzi*, mostrando a forma epimastigota (A), tripomastigota (B), tripomastigota metacíclica (C) e esferomastigota em divisão (D) (ampliação de 1000x). Adaptado de Urdaneta-Morales e Nironi (1996).

3.3. Epidemiologia da Doença de Chagas

3.3.1. Distribuição

A distribuição da Doença de Chagas, incluindo os seus reservatórios e vetores naturais, estende-se desde o sul dos EUA até ao sul da Argentina e Chile (Coura & Dias 2009). A OMS estima que atualmente cerca de oito milhões de pessoas estão infetadas em todo o mundo, maioritariamente na América Latina, onde esta doença continua a ser um dos principais problemas de saúde pública, causando incapacidade nos indivíduos humanos infetados e mais de dez mil mortes por ano (OMS 2020).

No Brasil, estima-se que atualmente exista pelo menos um milhão de pessoas infetadas por *T. cruzi*, estando a maior distribuição, cerca de 95%, concentrada na região norte do país. A forma predominante da doença crónica no país é a cardíaca (Ministério da Saúde 2020).

A Doença de Chagas é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), tendo recebido maior visibilidade e interesse nos últimos anos devido às migrações internacionais de áreas endémicas para áreas não endémicas, sendo hoje um problema emergente na América do Norte e Europa. Para além das migrações, também há casos descritos de viajantes infetados que retornam de países endémicos e até mesmo casos de crianças adotadas nesses países que estão infetadas. A subsequente transmissão surge principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, contacto sexual, via transplacentária ou durante o parto (OMS 2020).

3.3.2. Situação epidemiológica no Brasil

3.3.2.1. Sobre o controlo vetorial

Existem programas de controlo de vetores que se realizam desde a década de 1970, tendo o Brasil, em 2006, recebido o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas por *Triatoma infestans*, espécie exótica e responsável pela maior parte da transmissão vetorial no passado, pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) (Ferreira & Silva 2006), só persistindo focos residuais de pouca importância epidemiológica no noroeste do Rio Grande do Sul e no oeste do estado da Bahia (Ministério da Saúde 2020). Apesar da eliminação do principal vetor de *T. cruzi*, o risco de transmissão vetorial persiste devido à existência de espécies de triatomíneos autóctones com elevado potencial de colonização, nomeadamente *Panstrongylus megistus*, hoje considerado o principal vetor de *T. cruzi* no Brasil, e à presença de espécies reservatório que se aproximam cada vez mais das populações humanas.

Nas décadas de 1980 e 1990, com o aumento do controlo da transmissão natural, especialmente pela via de transmissão vetorial, em alguns dos países endémicos, incluindo o Brasil, a transfusão sanguínea passou a ser o principal mecanismo de disseminação da doença. Atualmente, para além de programas de vigilância e controlo entomológico, existem programas de controlo de transfusão sanguínea com triagem sorológica obrigatória nos bancos de sangue no Brasil e na maioria dos países endémicos (Moraes-Souza & Ferreira-Silva 2011; SVS 2019).

3.3.2.2. Vigilância entomológica no estado de São Paulo

Atualmente, não há registos de contacto entre humanos e triatomíneos infetados no estado de São Paulo, só sendo detetados triatomíneos infetados em áreas peridomiciliares (SVS 2019).

Triatoma infestans foi a principal espécie vetora de *T. cruzi* no estado de São Paulo, até à sua eliminação no estado, em 1989. Atualmente, a espécie de triatomíneo predominante é *Triatoma sordida*, que exerce um papel secundário na transmissão de *T. cruzi*, apesar de ser encontrado em áreas peridomiciliares (Silva 2019). *T. sordida* prefere alimentar-se de sangue de aves, sendo essa apontada como a principal razão pela qual tem baixos índices de infeção por *T. cruzi*. Estes triatomíneos encontram-se normalmente em refúgios naturais, como ninhos e tocas, que nem sempre estão ao alcance dos inseticidas e ação humana (SVS 2019). A espécie que atualmente constitui o maior desafio no estado de São Paulo é *Panstrongylus megistus*, que, desde a eliminação de *T. infestans*, é considerada o principal vetor de *T. cruzi* no Brasil (idem). Este triatomíneo tem uma grande capacidade de invadir biótopos artificiais, colonizando facilmente espaços domiciliares e peridomiciliares. Apesar da sua ampla distribuição no Brasil, no estado de São Paulo a distribuição é mais limitada, sendo favorecida por um regime de chuvas, maior humidade, vegetação mais densa, como as áreas de Mata Atlântica, estando associada principalmente a didelfídeos e roedores (idem). De outros triatomíneos com expressão no estado de São Paulo são exemplo *Rhodnius neglectus* - que habita sobretudo palmeiras, incluindo em áreas urbanas, mas que também pode ser encontrado dentro das habitações - e *Triatoma tibia-maculata*, cujo bioma é a Mata Atlântica, onde infeta mamíferos silvestres, incluindo didelfídeos, mas que não é encontrado em ciclos domiciliares ou peridomiciliares no estado (Silva 2019).

A situação epidemiológica da doença em São Paulo permitiu que fossem implementadas modificações na normalização técnica do Programa de Controle da Doença de Chagas no estado de São Paulo. Desde 2004, o estado suspendeu a procura ativa de triatomíneos nos domicílios paulistas, restringindo a vigilância à notificação destes insetos pela população (Wanderley et al. 2007). Contudo, nos últimos anos, com o aumento do êxodo rural, há menos contactos (Silva

2019). Entre 2014 e 2017, foram registados triatomíneos positivos para *T. cruzi* em 35 municípios do estado (5,4% dos existentes), sendo a média de triatomíneos positivos colhidos por ano de 25 exemplares (idem). A determinação do hábito alimentar de triatomíneos, através de técnicas de precipitação, foi feita regularmente até 2013. Na última determinação, os tipos de sangue verificados foram de gambá (15,4%), ave (9,6%) e roedor (3,8%), não tendo havido registo de sangue humano (idem). Atualmente, considera-se que a vigilância deve incluir a monitorização de mamíferos silvestres, como gambás, preás e ratos, próximo das habitações, pelo potencial risco de estarem infetados por *T. cruzi* e, assim, manterem o ciclo de infeção (SVS 2019).

Como observado na **Figura 12**, *Panstrongylus megistus* é o único triatomíneo com expressão próxima de Jundiaí, de acordo com colheitas feitas no local após notificação, entre 2014 e 2017 (Silva 2019), o que provavelmente está associado ao bioma Mata Atlântica presente na região.

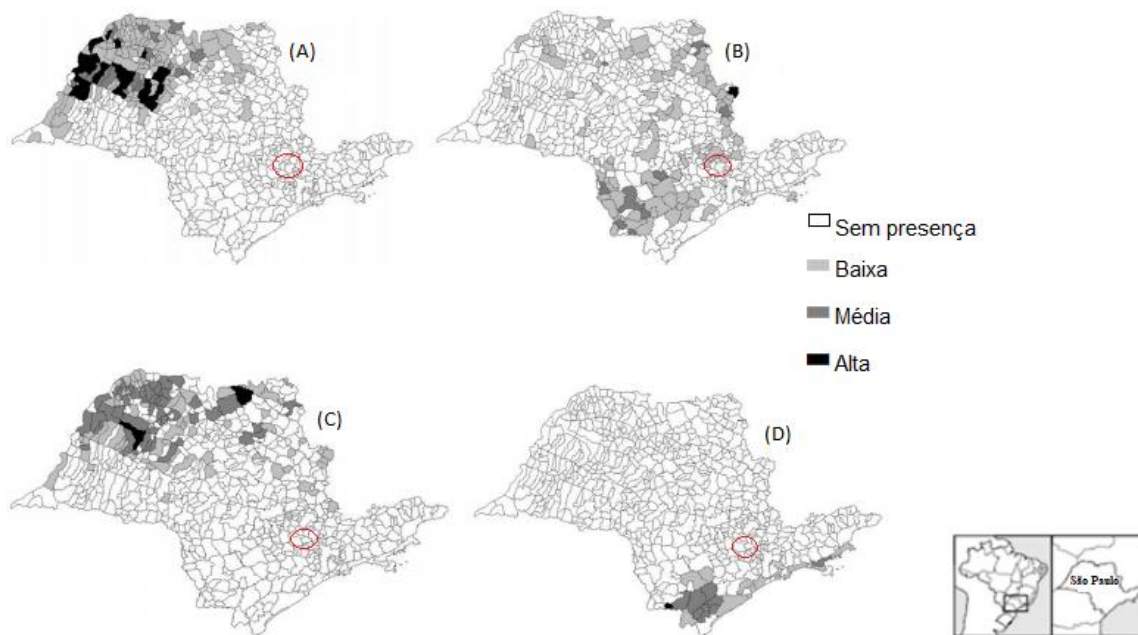


Figura 12 - Distribuição dos triatomíneos colhidos segundo espécie (A) *Triatoma sordida*, (B) *Panstrongylus megistus*, (C) *Rhodnius neglectus* e (D) *Triatoma tibiamaculata* no estado de São Paulo, de 2014 a 2017. Região de Jundiaí e municípios circundantes assinalados a vermelho. Adaptado de Silva (2019).

3.3.3. Sinais clínicos

Os quadros clínicos são variáveis consoante a espécie do hospedeiro, a UDT e a própria resposta imunitária do hospedeiro. Os sinais clínicos da Doença de Chagas na sua forma crónica advêm principalmente da rotura de pseudoquistos e consequente reação inflamatória, que pode

ser mais ou menos exuberante. Esta inflamação vai, por fim, provocar necrose e fibrose (exceto no caso da destruição da neuróglia), dificultando a contractilidade muscular. A evolução dos quadros cardíacos e neurológicos culmina quase sempre em morte, por vezes súbita (Murillo-Godínez 2018).

Os sinais clínicos agudos da Doença de Chagas em humanos ocorrem entre 5 e 14 dias após a picada do triatomíneo e entre 3 a 30 dias após a ingestão de alimentos contaminados (Murillo-Godínez 2018). Estes incluem febre persistente (mais de 7 dias), cefaleia, mialgia, letargia, edema, exantema, adenomegália, hepatomegália, esplenomegália, icterícia, manifestações hemorrágicas e, mais raramente, meningoencefalite aguda e miocardite aguda. A Doença de Chagas apresenta um decurso clínico bifásico, composto por uma fase aguda (clinicamente aparente, ou não) e uma fase crônica, que pode manifestar-se de forma indeterminada, cardíaca, digestiva (principalmente com megacólon e/ou megaesófago) ou cardiodigestiva. No caso de a transmissão ter sido vetorial, poderá haver uma lesão no local da picada, denominada chagoma de inoculação, que quando ocorre na pálpebra origina o chamado sinal de Romaña, um edema bipalpebral exuberante e unilateral muito característico da Doença de Chagas (OMS 2020).

Há registo de miocardite ligeira, histologicamente evidente, mas sem sinais clínicos óbvios, em gambás e guaxinins (Murillo-Godínez 2018). Os primatas não-humanos não apresentam sinais clínicos significativos na fase aguda, porém podem desenvolver miocardite irreversível e cardiomiopatia durante a fase crônica, estando também descritos megaesófago e encefalite (idem). Os quadros clínicos mais frequentemente reportados em cães naturalmente infetados têm a doença cardíaca como síndrome mais comum, tanto em jovens, como em adultos. A morte súbita é a apresentação mais frequente e outros achados comuns incluem vários sinais que podem ser associados a insuficiência cardíaca, tais como ascite, distúrbios na condução cardíaca, aumento das câmaras cardíacas, letargia e dificuldades respiratórias (idem). A Doença de Chagas sintomática está muito pouco descrita em gatos, havendo registo de febre, edema, perda de peso e sinais neurológicos, como paresia e convulsões (idem). Os ratos naturalmente infetados podem desenvolver arritmias e lesões cardíacas mais graves (idem).

3.3.4. Tratamento

O benznidazol e o nifurtimox são os dois fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas, tanto em humanos, como em cães, sendo mais efetivos quando aplicados em estádios precoces. Muitas vezes, no momento do diagnóstico, o tratamento já não é suficiente para prevenir a progressão da doença (Murillo-Godínez 2018). A terapêutica com glucocorticoides

pode aumentar a sobrevivência dos cães infetados. A terapêutica para insuficiência cardíaca e arritmias deve ser aplicada quando necessário (Neves et al. 2011).

3.4. Detecção e diagnóstico de infeção por *T. cruzi*

T. cruzi ou os seus ácidos nucleicos podem ser encontrados no sangue, miocárdio, linfonodos, fígado, baço, trato gastrointestinal, líquido cefalorraquidiano (Murillo-Godínez 2018) e, no caso particular dos gambás, também nas suas glândulas perianais (Deane et al. 1986).

Para a deteção de formas tripanossómicas podem ser usados esfregaços de sangue, esfregaços por aposição de órgãos e cortes histológicos, que depois serão observados ao microscópio ótico. Porém, estes métodos só por si não diagnosticam especificamente *T. cruzi*, uma vez que não distinguem este de qualquer outro tripanossoma, como, por exemplo, *T. rangeli*, que possui distribuição geográfica sobreposta à de *T. cruzi* (Grisard et al. 1999). Esfregaços de conteúdo das glândulas perianais (em *Didelphis* spp.), hemocultura, xenodiagnóstico, técnica serológica, e Reação em Cadeia da Polimerase convencional (RCPc) são métodos específicos para distinguir *T. cruzi* de outros tripanossomas.

3.4.1. Esfregaços de sangue

Os esfregaços de sangue são um método prático, mas com baixa sensibilidade, uma vez que é preciso o parasita estar em circulação para ser detetado (Modrý et al. 2012; Jansen et al. 2020). Por cada animal observa-se um determinado número de lâminas, normalmente duas ou três, com esfregaço de sangue periférico, por ser aqui que se concentram mais as formas tripomastigotas e, por isso, ser mais provável encontrar tripanossomas se existirem em circulação (Modrý et al. 2012). As amostras são depois fixadas com metanol e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa para serem observadas ao microscópio ótico (idem).

3.4.2. Esfregaço por aposição de órgãos

Para o esfregaço por aposição de órgãos podem ser utilizadas amostras obtidas durante a necrópsia, comprimindo-as contra uma lâmina (Modrý et al. 2012). Os órgãos que presumivelmente concentram formas tripanossómicas são o baço, fígado e linfonodos, pelo seu papel nas circulações sanguínea e linfática (Murillo-Godínez 2018), e glândulas perianais, nos gambás, pelo ciclo próprio passível de acontecer aqui (Deane et al. 1986). Os métodos de fixação e coloração são os mesmos utilizados para os esfregaços de sangue (Modrý et al. 2012; Jansen et al. 2020).

3.4.3. Esfregaço do conteúdo das glândulas perianais

O conteúdo glandular para esfregaço pode ser obtido ao esvaziar as glândulas perianais ou por punção das mesmas (Deane et al. 1986). As lâminas são posteriormente fixadas e coradas segundo o método de May-Grunwald-Giemsa. Espera-se encontrar as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*.

3.4.4. Hemocultura

A hemocultura é uma técnica sensível para isolar *T. cruzi* e pode ser importante principalmente para cultivo e amplificação das amostras. A cultura normalmente é feita em meio líquido, de LIT (Liver Infusion Tryptose) ou de Warren, com sementeira direta (Bronfen et al. 1989), podendo também ser utilizado um meio com células Vero (Freitas Santos 2008).

3.4.5. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico é um método indireto de diagnóstico de *T. cruzi*, muito sensível e amplamente aplicado na América do Sul, que utiliza triatomíneos criados e mantidos em laboratório sob condições controladas. Normalmente são utilizados estados ninfais de indivíduos da espécie *T. infestans*, mas pode utilizar-se a espécie reconhecida como mais importante da região em causa. No que concerne ao diagnóstico de infecção por *T. cruzi* em mamíferos silvestres, o xenodiagnóstico é utilizado para isolamento e amplificação das amostras de *T. cruzi* em animais naturalmente infetados (capturados em natureza) ou infetados experimentalmente em laboratório (Dias 1940).

3.4.6. Reação de Imunofluorescência Indireta

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é a técnica serológica de eleição para a pesquisa de anticorpos circulantes contra *T. cruzi*. Jansen et al. (1985) realizaram a técnica de RIFI para diagnóstico e acompanhamento clínico de indivíduos de *D. marsupialis* infetados natural e experimentalmente, concluindo haver concordância de 100% entre estes resultados com os obtidos por hemocultura e xenodiagnóstico, o que facilitaria a operacionalização de pesquisas que visassem estudar a prevalência desta infecção em gambás. Contudo, deve sempre considerar-se que em áreas onde ocorre leishmaniose pode ocorrer reação serológica cruzada com *T. cruzi*, uma vez que *Leishmania* spp. infeta *Didelphis* spp. (Lainson 2010). Outras técnicas serológicas descritas incluem fixação do complemento, hemaglutinação direta e indireta (Fernandes et al. 1990), ELISAs e radioimunoprecipitação (Murillo-Godínez 2018).

3.4.7. Histopatologia

A histopatologia serve para detetar formas amastigotas nos diferentes tecidos sob a forma de pseudoquistos. Nos gambás, as lesões apresentam um padrão linfomacrofágico com menor expressividade que em outros animais experimentalmente infetados. Está descrita a presença de pseudoquistos nas glândulas perianais, intestino delgado, intestino grosso, pulmões, células nervosas e em miofibrilhas dos músculos liso, esquelético e cardíaco (Jansen-Franken 2017).

3.4.8. Técnicas moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) é amplamente utilizada para a identificação de agentes patogénicos e é uma ferramenta importante em estudos moleculares e epidemiológicos. Nas tripanossomíases, a deteção do agente é particularmente útil em estudos realizados com vetores e animais vivos livres para identificar reservatórios de infeção (Lopes et al. 2016). Esta técnica serve-se da capacidade da enzima ADN Polimerase para sintetizar uma nova cadeia de ADN durante ciclos repetidos de alterações de temperatura, com desnaturação, anelamento e extensão. A sequência alvo é definida por iniciadores específicos que se ligam complementarmente por pareamento de bases às extremidades da região a ser copiada. A quantidade de ADN é duplicada em cada ciclo, gerando milhões de cópias da sequência original (idem). Os produtos amplificados da RCP são separados por tamanho por eletroforese, através de um gel num campo elétrico onde os fragmentos de ADN de menor tamanho se deslocam mais rapidamente e uma maior distância que os de maior tamanho. A amplificação de fragmentos do tamanho esperado é fortemente sugestiva da presença de ADN do protozoário na amostra (Santiago 2007).

O cinetoplasto, organelo derivado da mitocôndria e característico da família Trypanosomatidae, apresenta propriedades autorreplicativas e um genoma (kADN) amplamente conservado, constituído por estruturas circulares denominadas maxicírculos e minicírculos (Lopes et al. 2016). Para a deteção de genes de indivíduos de Trypanosomatidae podem ser utilizados iniciadores dirigidos a marcadores conservados nos maxicírculos (incluindo o citocromo B do cinetoplasto) e minicírculos de kADN, para além dos dirigidos ao núcleo celular (Marcili et al. 2009). A deteção e identificação de *Trypanosoma cruzi* pode efetuar-se por meio de RCP convencional (RCPc), utilizando-se iniciadores descritos para sequências conhecidas de kADN e sequências de ADN correspondente à subunidade menor do ARN ribossomal (SSU rADN) (Souto et al. 1996; Maia da Silva et al. 2008). Porém, pela grande variabilidade genética intraespecífica, hoje explicada pela reprodução sexuada dentro da espécie (Schwabl et al. 2019), não existem iniciadores

generalistas para *T. cruzi*, sendo utilizados, normalmente, iniciadores específicos para determinadas UDTs, mais prováveis de serem encontradas na região em causa (idem).

Apesar de não ser o foco deste trabalho, importa destacar que para a genotipagem de *T. cruzi* são realizadas RCPs baseadas na sequenciação de genes de mini-exões, conforme demonstrado por Fernandes et al. (2001) e da subunidade maior do ARN ribossomal (LSU 24SarrARN) (Souto et al. 1996), usando como controlo as principais UDTs que se pretendem pesquisar. Em *Didelphis* spp. a UDT mais frequentemente encontrada é a TCI, porém, no contexto do estado de São Paulo, também já foi encontrada TCIB em *D. aurita* (Marcili et al. 2009).

A técnica de RCP também se mostra de extrema importância para averiguar a relação filogenética entre *T. cruzi* detetado nos diferentes hospedeiros. Para o efeito, utiliza-se a amplificação de fragmentos de ADN correspondentes a uma sequência parcial dos genes da subunidade menor do ARN ribossomal (SSU rADN), do gene para o citocromo B e de genes para a histona H2B com iniciadores e reações de RCP já descritos e que são posteriormente relacionados no banco de dados GenBank® (Marcili et al. 2009).

3.5. Helminthes em *Didelphis* spp.

Os helminthes (subreino Metazoa) são vermes dos filos Annelida, Nematoda, Platyhelminthes e Acanthocephala. O primeiro é constituído somente por ectoparasitas, não tendo importância no contexto das endoparasitoses, ao contrário dos outros três que serão descritos à frente (Castro 1996).

Os habitats dos animais sinantrópicos, como são *D. aurita* e *D. albiventris*, estão a ser progressivamente destruídos, aproximando-os dos meios urbanos (White and Razgour 2020). Embora estes animais vivam próximos dos ambientes rurais e urbanos e tenham potencial epidemiológico para a transmissão de agentes enzoóticos e zoonóticos, a sua fauna parasitária ainda não é completamente compreendida. Apesar de haver estudos de helminthes em gambás, eles restringem-se sobretudo a *D. virginiana* e *D. marsupialis* (Silva & Costa 1999).

3.5.1. Filo Nematoda

O filo Nematoda é constituído por vermes com corpo cilíndricos divididos pelas classes Chromadorea e Enoplea (Schoch et al. 2020). Dos registos existentes de parasitismo por helminthes em *Didelphis* spp., os exemplares encontrados em maior quantidade e diversidade pertencem ao filo Nematoda. De acordo com Vicente et al. (1999) e Pinto et al. (2011), estão descritos pelo menos vinte e um géneros de nematodes que parasitam gambás (*D. aurita*, *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. imperfecta*) no Brasil (**Anexo 3** - Géneros de nematodes encontrados em

Didelphis spp. no Brasil). Quatro gêneros serão destacados neste trabalho: *Trichuris*, *Strongyloides*, *Cruzia* e *Turgida*.

3.5.1.1. *Cruzia* spp.

O gênero *Cruzia* (Travassos 1917), da família Kathlaniidae, infraordem Ascaridomorpha, ordem Rhabditida e classe Chromadorea (Schoch et al. 2020), ocorre em todo o continente americano, albergando treze espécies, das quais *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) (**Figura 13**) é a espécie tipo (Vicente et al. 1999).



Figura 13. Dois espécimes de *Cruzia tentaculata*. provenientes de um gambá. i) Extremidade bucal; ii) Faringe; iii) Esófago; iv) Bulbo; v) Ceco anterior; vi) Extremidade posterior do macho (forma cônica). Lâmina preparada com bálsamo sintético. Adaptado de Yale Peabody Museum of Natural History (2018a). Autor da imagem original: D. Drew.

Os indivíduos do gênero *Cruzia* têm comprimento entre 8 e 16 mm (sendo o macho ligeiramente menor que a fêmea) e largura entre 0,52 e 0,67 mm. A nível microscópico, é possível observar uma boca com três lábios subtriangulares, uma faringe com três fileiras de ganchos longitudinais e três estruturas truncadas em forma de dentes na sua base. A estrutura digestiva é constituída por um esófago cilíndrico, alargado posteriormente, seguido por um bulbo bem desenvolvido contendo válvulas, e um intestino com um ceco anterior. A nível do aparelho reprodutor, é possível ver, nos machos, uma cauda cônica, uma asa caudal muito pequena ou ausente, a presença de um gubernáculo com duas espículas subiguais aladas e cerca de nove pares de papilas, das quais três são pré-anais, três perianais e três pós-anais. Já as fêmeas têm uma cauda a terminar em ponta fina, uma vulva na região mediana e são didelfas ovíparas. Os ovos são relativamente grandes (0,120 mm de comprimento por 0,056 mm a 0,063 mm de largura),

de forma elipsoide, com casca espessa e rugosa, e embrionados aquando da postura (Travassos 1922; Vicente et al. 1999).

Os indivíduos de *Cruzia* spp. têm um ciclo de vida monoxeno, parasitando o íleo e intestino grosso, principalmente o ceco, de mamíferos, répteis e anfíbios (Vicente et al. 1999) quando os ovos embrionados são ingeridos com larvas no estágio L2 que vão eclodir no duodeno e íleo superior. Após a eclosão, as larvas são direcionadas pelos movimentos peristálticos até ao ceco, onde sofrem três mudas até atingirem o estágio adulto (L2-L3-L4-L5 e amadurecimento até adulto). Os adultos fixam-se à mucosa, ingerindo sangue e absorvendo nutrientes, no ceco, ou após migrarem até ao cólon, onde as fêmeas depositam ovos que serão eliminados nas fezes (Jones 2013).

Em relação aos mamíferos do Brasil, há registo de *C. tentaculata*, encontrada no intestino grosso das espécies marsupiais *D. albiventris*, *D. aurita*, *Caluromys philander*, *Philander opossum*, *Monodelphis domestica*, *Marmosa murina* e *Metachirus nudicaudatus* (Vicente et al. 1999; Pinto et al. 2011). Para além desta espécie, também há registo de *Cruzia brasiliensis* Costa, 1965 em *Sus scrofa domesticus* (Vicente et al. 1999).

O ciclo no interior de *Didelphis* spp., desde a ingestão de ovos até à sua eliminação, dura entre 46 e 48 dias (Jones 2013). A diarreia é o único sinal clínico conhecido de infeções por *C. tentaculata* em *Didelphis* spp. infetados. Contudo, como é comum o parasitismo concomitante com *Turgida turgida*, é possível que os sinais clínicos provocados por este se sobreponham aos daquele, mascarando-os (Nichelason et al. 2008).

3.5.1.2. Strongyloides spp.

A família Strongyloididae, ordem Rhabditida e classe Chromadorea, apresenta duas gerações alternadas: uma parasita, constituída por fêmeas partenogénicas, e outra de vida livre, a qual pode apresentar diferenciação, ou não, em machos e fêmeas (fase dioica). A espécie tipo do género *Strongyloides* é *Strongyloides stercoralis* (Vicente et al. 1999).

As fêmeas adultas do género *Strongyloides* têm cerca de 2 mm de comprimento e são normalmente encontradas no intestino dos seus hospedeiros. Possuem um esófago longo, sem bulbo posterior, uma vulva no terço posterior do corpo e são partenogénicas. Os seus ovos têm a forma elipsoide com 40 a 85 µm de comprimento, com uma parede fina, contendo uma larva L1. Existem mais de 60 espécies deste género, que parasitam principalmente o intestino delgado, especialmente a região do duodeno, de anfíbios, aves, répteis e mamíferos, incluindo a espécie humana, espécies domésticas, espécies selvagens e silvestres (Viney and Lok 2015).

Strongyloides stercoralis e *S. fullborni* constituem as duas espécies zoonóticas conhecidas do género (Vicente et al. 1999).

S. stercoralis é uma espécie cosmopolita, muito comum nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, e responsável pela estrogiloidíase. Esta doença que provoca sinais gastrointestinais (diarreia, dor abdominal, flatulência, entre outros), pode, quando há migração, afetar também a circulação e os pulmões, dando sinais de febre, vômitos, tosse e/ou falta de ar, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. As larvas L3, presentes no solo, infetam os hospedeiros por via cutânea e migram, via circulação sanguínea, até aos pulmões, sendo depois deglutidas juntamente com as secreções respiratórias, chegando assim ao intestino onde crescem e se reproduzem. A infeção também pode ocorrer através da ingestão de água e alimentos contaminados com as L3 (Viney e Lok 2015; CDC 2019b) (**Figura 14**).

No Brasil, conhecem-se 10 espécies diferentes de *Strongyloides* que afetam mamíferos (Vicente et al. 1999; Pinto et al. 2011).

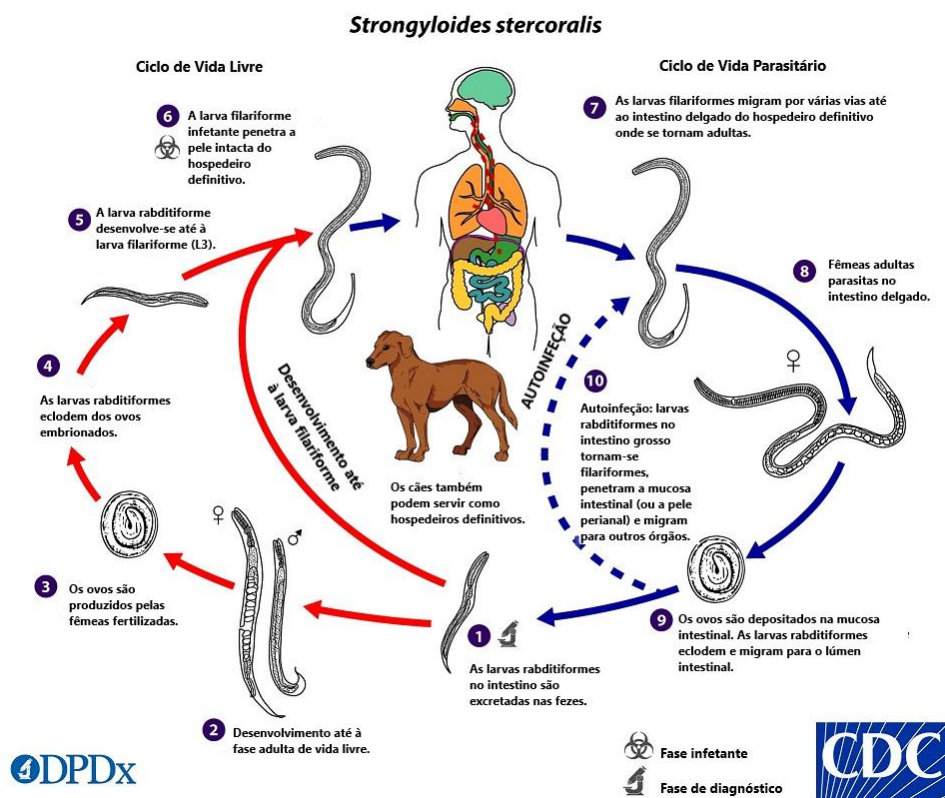


Figura 14. Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis*. Adaptado de CDC (2019b).

Em relação à fauna silvestre e selvagem, estão relatados casos de infeção por *Strongyloides* spp. em *D. aurita*, *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Kerodon rupestris*, *Macaca mulatta*, *Myocastor coypus*, (Vicente et al. 1999), *Leopardus geoffroyi*, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex*

gymnocercus e *Dasytus novemcinctus* (Pinto et al. 2011) e, mais recentemente, em *Lutreolina crassicaudata* (Cardia et al. 2016).

3.5.1.3. *Trichuris* spp.

Os membros da família Trichuridae, ordem Trichocephalida e classe Enoplea são nematodes parasitas de vertebrados com tamanho médio ou grande. A porção anterior do corpo pode ser mais longa ou mais curta que a posterior, a qual pode ser mais grossa que a anterior (Vicente et al. 1999). Os nematodes do género *Trichuris* Roederer, 1761 parasitam o intestino dos mamíferos e distinguem-se de outros géneros da sua família por apresentarem um corpo robusto, não filiforme. Apresentam boca simples, cutícula estriada transversalmente, com faixa bacilar longitudinal larga no lado ventral da região esofágica. Os machos apresentam a porção posterior do corpo espiralizada, com uma espícula numa bainha com a superfície externa lisa ou espinhosa. As fêmeas, ovíparas, têm a extremidade posterior ligeiramente curvada, não espiralizada. A sua vulva está próxima à junção da porção espessa com a porção fina do corpo. Os seus ovos têm aspeto de limão, com opérculos salientes nas suas extremidades (idem).

Trichuris trichiura é a espécie conhecida por provocar tricuriase, uma zoonose, cujos principais sinais clínicos são dor abdominal, diarreia e fadiga (**Figura 15**). Os ovos permanecem no

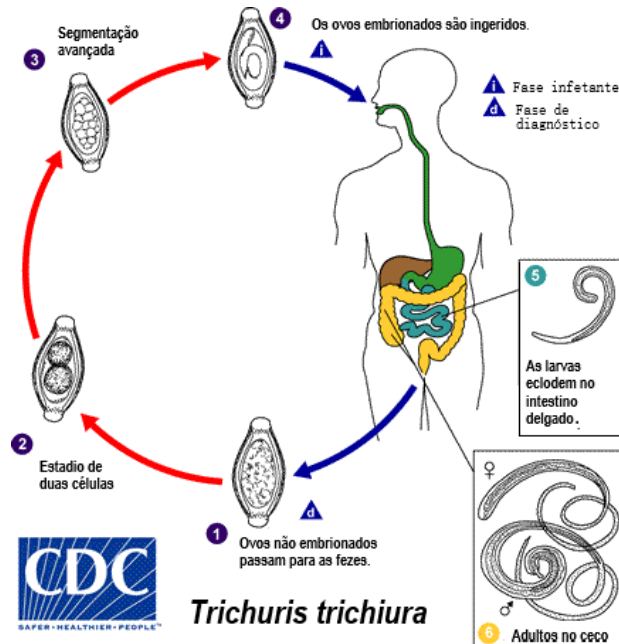


Figura 15. Ciclo de vida de *Trichuris trichiura*. Adaptado de CDC (2017b).

solo, ocorrendo aí o seu desenvolvimento embrionário. Quando ingeridos, as larvas eclodem dos ovos no lúmen intestinal, indo depois aderir à mucosa do ceco, onde se vão desenvolver e amadurecer até à sua forma adulta (que possui entre 30 e 50 mm de comprimento). Se tiver ocorrido

a ingestão de pelo menos um macho e uma fêmea, há acasalamento e a fêmea põe mais de 2000 ovos por dia (CDC 2017b). No Brasil, para além de haver registos deste nematode em humanos, também há em *Chrysocyon brachyurus* e em *Sus scrofa domesticus* (Vicente et al. 1999). Contudo, e por muitos estudos não apresentarem a deteção de *Trichuris* para além do género, não é de descurar a presença deste nematode em outros animais. A tricuriase é classificada como uma Doença Tropical Negligenciada sendo muitas vezes encontrada onde há falhas no saneamento básico (CDC 2017b).

Estão registadas 15 espécies de *Trichuris* que afetam mamíferos no Brasil. *Canis lupus familiaris*, *Felis silvestris catus*, *Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Ovis aries* e *Capra aegagrus hircus* são as espécies domésticas afetadas (Vicente et al. 1999; Pinto et al. 2011). As espécies selvagens do Brasil reportadas com parasitismo por *Trichuris* spp. incluem *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. marsupialis*, *Marmosa murina*, *Dasypus novemcinctus*, *Chaetomys subspinosus*, *Lycalopex gymnocercus*, *Cercocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus*, *Leopardus geoffroyi*, *Felis silvestris*, *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Akodon azarae*, *Dasyprocta* spp., *Thrichomys apereoides*, *Thrichomys pachyurus*, *Cuniculus paca*, *Arvicola sapidus*, *Myocastor coypus* e algumas não especificadas da família Muridae, denominadas vulgarmente por rato-do-campo (idem). Relativamente ao género *Didelphis*, para além dos achados de *Trichuris* spp. não especificados, já foram encontrados *Trichuris didelphis* (Silva & Costa 1999; Antunes 2005) e *Trichuris minuta* (Antunes 2005) em *D. albiventris*, *T. minuta* (Pinto et al. 2011; Costa-Neto et al. 2019) e *T. didelphis* (Costa-Neto et al. 2019) em *D. aurita* e *T. didelphis* em *D. marsupialis* (Pinto et al. 2011).

3.5.1.4. *Turgida* spp.

Estes nematodes pertencem à família Physalopteridae, infraordem Spiruromorpha, ordem Rhabditida e classe Chromadorea (Schoch et al. 2020) (**Figura 16**).



Figura 16. Indivíduos da espécie *Turgida turgida* no interior do estômago de um gambá (*Didelphis* sp.). Imagem adaptada de <https://www.dailymotion.com/video/x2n90z6>

O género *Turgida* Travassos, 1919 possui uma cutícula espessa, formando frequentemente pregas anelares, além de estrias transversais. Possui uma boca com dois lábios triangulares providos de cinco papilas na face externa, de três dentes no ápice e cercados por um anel cuticular que funciona como ventosa. O macho apresenta papilas pericloacais e espículas pouco quitinizadas e a sua extremidade posterior apresenta amplas asas sustentadas por quatro pares de papilas pedunculadas situadas lateralmente. A região pericloacal é revestida exteriormente por formações cuticulares salientes, em escamas ou em cristas. Na extremidade posterior do macho, são ainda visíveis três papilas sésseis pré-cloacais e dez pós-cloacais. A fêmea apresenta a vulva perto da extremidade anterior ao nível da parte média do esófago e o seu ovipositor é constituído por uma vagina claviforme de onde partem de nove a onze vestíbulos, que dão origem a igual número de úteros e ovários (Vicente et al. 1999; Humberg et al. 2011).

No Brasil, os registos de infeções por espécies do género *Turgida* incluem: *Turgida torresi* a parasitar *Cuniculus paca* (Vicente et al. 1999); e *Turgida turgida* somente em didelfídeos, incluindo *D. albiventris* (Silva & Costa 1999; Humberg et al. 2011), *D. aurita*, *D. marsupialis*, *Metachirus nudicaudatus*, *Caluromys lanatus* (Vicente et al. 1999), *Chironectes minimus* e *Philander opossum* (Pinto et al. 2011). O macho de *T. turgida* tem entre 18 e 40 mm e a fêmea entre 30 e 80 mm de comprimento, enquanto o macho de *T. torresi* tem entre 35 e 40 mm e a fêmea entre 70 e 90 mm (Vicente et al. 1999).

T. turgida é vulgarmente encontrado a parasitar o estômago de *Didelphis* spp. desde a América do Norte até à América do Sul (Gray and Anderson 1982; Vicente et al. 1999; Humberg et al. 2011; Pinto et al. 2011) e tem como hospedeiros definitivos espécies de mamíferos, alojando-se nos seus estômagos, onde se alimentam a partir do seu conteúdo. Os hospedeiros intermediários de *T. turgida* são insetos coprófagos pertencentes à ordem Orthoptera e Coleoptera, em que as larvas enquistam na parede externa do intestino (Humberg et al. 2011). Os didelfídeos são parasitados ao ingerirem os insetos com L3 infetantes. Nichelason et al. (2008) apontam *T. turgida* como uma das espécies de nematodes com potencial para causar morbidade e mortalidade significativas em gambás. As formas adultas, quando não se estão a alimentar, fixam-se à mucosa gástrica ao longo da grande curvatura do estômago e as formas larvares permanecem espalhadas pela restante mucosa. Os indivíduos adultos de *T. turgida* podem viver no estômago dos gambás por 360 dias (Jones 2013). As úlceras gástricas decorrentes da fixação dos adultos na mucosa podem resultar em perda crónica de sangue e anemia. Outros sinais clínicos da infeção por *T. turgida* em *Didelphis* spp. incluem perda de peso, diarreia profusa, melena, oclusão do piloro e, em casos mais graves, perfuração da parede gástrica e morte. A

ulceração permite ainda que bactérias entéricas oportunistas entrem no sistema circulatório do hospedeiro (Humberg et al. 2011; Jones 2013).

3.5.2. Filo Acanthocephala

O filo Acanthocephala (*acanthias*, “espinhosa” + *cephalo*, “cabeça”) é composto estritamente por endoparasitas de forma cilíndrica e cabeça munida de espinhos, divididos pelas classes Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala, Polyacanthocephala e Eoacanthocephala (Schoch et al. 2020). Os acantocéfalos têm distribuição global e podem ser encontrados em hospedeiros marinhos, de água doce ou terrestres, em todos os biomas, conhecendo-se cerca de 1300 espécies endoparasitas obrigatórias (Amin 2013). São parasitas heteroxenos: os hospedeiros definitivos podem ser peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos; já os hospedeiros intermediários podem ser insetos ou miriápodes, no caso de os acantocéfalos parasitarem animais terrestres, e crustáceos (incluindo copépodes e ostracodes) ou moluscos, no caso de parasitarem animais aquáticos. Para completar o seu desenvolvimento, é necessário que o hospedeiro intermediário, contendo o estágio larvar infetante (cistacanto), seja ingerido pelo hospedeiro definitivo (Kennedy 2006; Gomes 2019). Dos helmintes estudados em mamíferos brasileiros, o filo Acanthocephala destaca-se por apresentar mais lacunas no que se refere às informações taxonômicas, filogenéticas e ecológicas (Gomes 2019; SIBBr 2020). Atualmente, são conhecidas 46 espécies de acantocéfalos que parasitam mamíferos de diferentes ordens no Brasil (Gomes 2019).

Os acantocéfalos não possuem aparelho digestivo e apresentam, regra geral, dimorfismo sexual. O seu corpo, de forma aproximadamente cilíndrica, é constituído por uma probóscide retrátil, com uma bainha para a alojar, um pescoço liso, um tronco, quase sempre com pregas transversais, e, na extremidade posterior, a abertura genital. Os seus ganchos aderem à mucosa do intestino delgado do hospedeiro definitivo. Consoante a espécie, o comprimento dos indivíduos deste filo varia entre alguns milímetros e alguns decímetros. Os ovos de Acanthocephala têm três invólucros: o externo, visivelmente rugoso ao microscópio; o médio, por vezes, provido de estrangulamento nos polos; o interno, composto por uma fina membrana que reveste diretamente o embrião. O embrião, em estádios mais avançados, apresenta um gancho rudimentar. A forma varia do elipsoide mais ou menos curto ao quase fusiforme (Travassos 1950).

3.5.2.1. *Oligacanthorhynchus* spp.

O género *Oligacanthorhynchus* pertence à família Oligacanthorhynchidae, ordem Oligacanthorhynchida e classe Archiacanthocephala. O conhecimento da ligação entre *Oligacanthorhynchus* e didelfídeos já remonta ao século XIX. Com efeito, *Oligacanthorhynchus*

microcephalus (Rudolphi, 1819) foi descrito originalmente como parasita de *Caluromys philander*, no Brasil, e *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) foi originalmente descrito em *D. virginiana* na América do Norte. Richardson et al. (2014), num estudo comparativo da morfologia de vários espécimes destas duas espécies, preservados por fixação e vivos, provenientes de várias partes do continente americano, sugerem que *O. microcephalus* e *O. tortuosa*, na verdade, são conspecíficas. Richardson (2006) descreveu pela primeira vez o ciclo de vida de *O. microcephalus*. Para o efeito, infetou experimentalmente dois indivíduos de *D. virginiana* com cistacantos de *O. microcephalus* encontrados a infetar naturalmente *Narceus americanus* (classe Diplópoda; superclasse Myriapoda). Passado o período pré-patente de 9 semanas, os diplópodes mantidos em laboratório foram alimentados com fezes dos gambás experimentalmente infetados contendo ovos de *O. microcephalus*. Oitenta e dois dias após a infeção, foram encontrados cistacantos com probóscides invaginados de *O. microcephalus* nos diplópodes. Embora este tenha sido um importante passo na elucidação sobre o ciclo de vida de *O. microcephalus*, a verdade é que a área de distribuição deste transcende em muito a área de *N. americanus*, que se restringe ao leste dos EUA, sendo necessária uma maior pesquisa em diplópodes ao longo da área de distribuição de *O. microcephalus*, incluindo o Brasil, para identificar outros hospedeiros intermediários (Richardson et al. 2014). No Brasil, o registo de *O. microcephalus* em *Didelphis* spp. é frequente (Antunes 2005; Souza et al. 2017; Zabott et al. 2017; Costa-Neto et al. 2019). Os indivíduos desta espécie apresentam corpos brancos com cerca de 10 a 15 centímetros de comprimento, plissados, em forma de espiral, com rugas transversais marcadas, um probóscide armado com seis fileiras dispostas longitudinalmente com seis ganchos cada uma, perfazendo um total de 36 ganchos (Richardson et al. 2014; Souza et al. 2017). A caracterização do género *Oligacanthorhynchus* é somente morfológica (Gomes et al. 2019) (**Figura 17**).

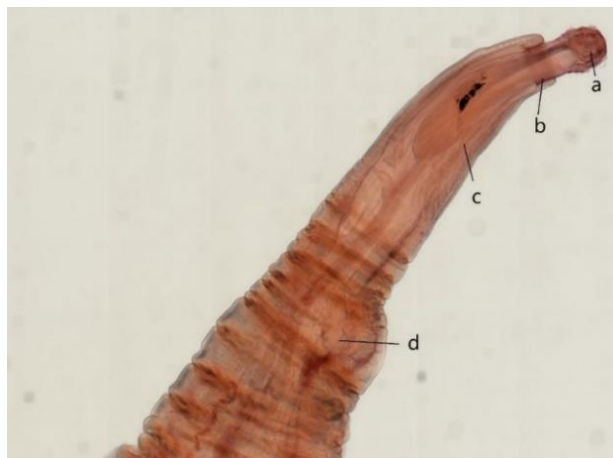


Figura 17. Porção anterior de *Oligacanthorhynchus microcephalus*. (a) Probóscide; (b) bainha; (c) pescoço; (d) tronco com pregas transversais marcadas. Lâmina preparada com bálsamo sintético. Adaptado de Yale Peabody Museum of Natural History (2018). Autor da imagem original: A. Gomez-Colunga.

3.5.3. Platelminetes

O filo dos platelmintes representa os helmintes achatados dorsoventralmente, simétricos e geralmente hermafroditas, onde se incluem as classes Cestoda e Trematoda (Schoch et al. 2020).

3.5.3.1. Trematodes Digenea em *Didelphis* spp. no Brasil

Os trematodes Digenea são helmintes monoicos que parasitam todas as classes de vertebrados e utilizam moluscos como hospedeiros intermediários. Possuem um sistema digestivo incompleto, tendo como único orifício a boca. Por apresentarem fases aquáticas, estes parasitas encontram-se sobretudo em habitats com presença de água doce. Rondon (2010) consolidou os vários relatos de achados de trematodes em gambás no continente americano. Relativamente ao Brasil, os achados incluem *Brachylaema migrans* (intestino delgado), *Rhopalias coronatus* (intestino grosso), *Schistosoma mansoni* (sistema porta, intestino e exames coprológicos), em *D. albiventris*, e indivíduos de Dicrocoeliidae não especificados em *D. aurita*. A juntar a estes trematodes, há ainda o registo feito por Antunes (2005) de *Echinostoma revolutum*, *Plagiorchis didelphidis*, *Rhopalias baculifer* e *Didelphodiplostomum variabile* no intestino delgado de indivíduos de *D. albiventris*.

3.5.3.2. Cestodes em *Didelphis* spp. no Brasil

Os indivíduos da classe Cestoda possuem o corpo dividido em três regiões: escólex, pescoço e estróbilo/cadeia de proglotes. Normalmente têm ciclo heteroxeno e não possuem sistema digestivo, nutrindo-se diretamente por via tegumentar. A descrição de cestodes em *Didelphis* spp. no Brasil é escassa. Rodrigues et al. (2017) relataram a presença de exemplares de *Rodentolepis nana* (ordem Cyclophyllidea) em *D. albiventris*, com recurso a sedimentação espontânea de amostras fecais, e Brum (2018) registou exemplares da família Diphyllobotriidae (ordem Diphyllobothriidea), por meio de necrópsias, também em indivíduos de *D. albiventris*.

A ordem Cyclophyllidea caracteriza-se por ter um escólex com quatro ventosas e contempla os cestodes mais importantes que parasitam humanos e animais domésticos, variando grandemente os seus hospedeiros intermediários (dependendo da espécie, podem ser artrópodes, aves, mamíferos, entre outros). Os membros da família Hymenolepididae possuem um pequeno número de testículos (um a quatro) e poros genitais unilaterais. A maioria das espécies é pequena e transparente, com espécies que têm como hospedeiros definitivos aves (cerca de 700 espécies) e mamíferos (cerca de 250) (Rodrigues et al. 2017). A maioria das espécies com ciclo de vida conhecido tem artrópodes como hospedeiros intermediários (idem).

As espécies *Rodentolepis nana* (15 a 40 mm de comprimento), principalmente, e *Hymenolepis diminuta* (200 a 600 mm de comprimento), de forma menos preponderante, são agentes da himenolepíase, uma helmintose que afeta a espécie humana. Pelo caráter cosmopolita dos seus agentes, a himenolepíase ocorre em todo o mundo. Contudo, é um problema maior em regiões de clima temperado menos salubres, sendo considerada uma Doença Tropical Negligenciada. Os humanos podem ser infetados por ingestão direta de águas ou alimentos contaminados por ovos, por ingestão do hospedeiro intermediário, por autoinfecção endógena quando os ovos permanecem no intestino e autoinfecção exógena quando ingerem os ovos que eliminaram nas suas fezes. Quando o hospedeiro definitivo se alimenta dos hospedeiros intermediários, as larvas cisticercoides desenvolvem-se até à sua fase adulta no ambiente intestinal. Já quando as oncosferas são ingeridas, ou quando proglotes grávidos se desintegram no intestino e as oncosferas passam para o lúmen, vão penetrar nas vilosidades intestinais, transformando-se em larvas cisticercoides. Após a rotura das vilosidades, os cisticercoides vão até ao lúmen intestinal onde evaginam o seu escólex, aderem à mucosa intestinal do íleo e evoluem para adulto, produzindo proglotes grávidos que serão depois excretados nas fezes do mamífero (CDC 2017a) (**Figura 18**). *Hymenolepis diminuta* afeta principalmente roedores e o género *Tribolium* é comum como seu hospedeiro intermediário. *R. nana* é conhecida por afetar a espécie humana e roedores e, apesar de não precisar de hospedeiros intermediários para completar o seu ciclo, besouros e pulgas podem servir como tal (idem). Rodrigues et al. (2017) apontam a descoberta de *R. nana*

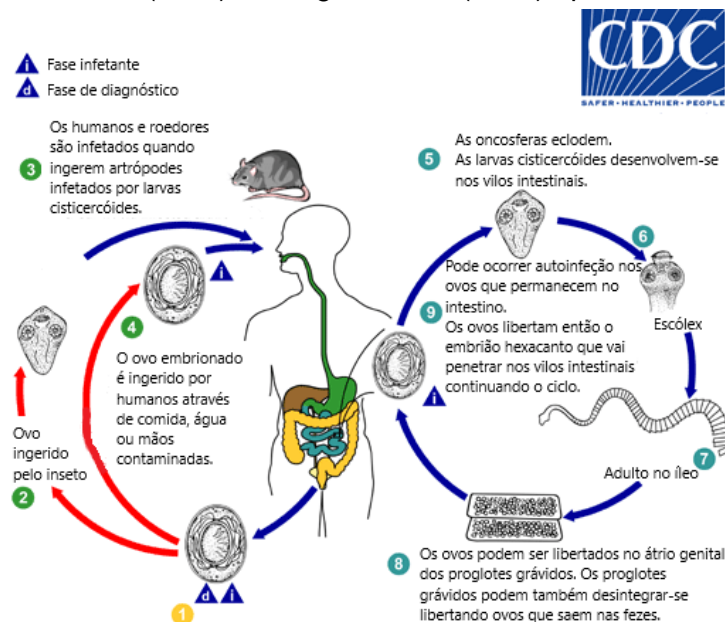


Figura 18. Ciclo de vida de *Rodentolepis nana*. Adaptado de CDC (2017a).

no intestino de indivíduos de *D. albiventris* como consequência da fragmentação florestal que facilita aos parasitas a exploração de um maior número de hospedeiros. No que se refere às

espécies de Diphyllbothriidea, menos estudadas, estas apresentam o escólex com apenas uma ventosa e podem ter como hospedeiros definitivos mamíferos (incluindo a espécie humana) e aves, servindo-se de crustáceos copépodes como hospedeiros intermediários, peixes pequenos como hospedeiros intermediários secundários e peixes maiores como hospedeiros paratênicos. Ao alimentarem-se de peixes infetados, que podem ser tanto marinhos como de água doce, os hospedeiros definitivos estão a ingerir a larva pleocercóide, a qual vai completar o seu desenvolvimento no intestino delgado (CDC 2020b) (**Figura 19**).

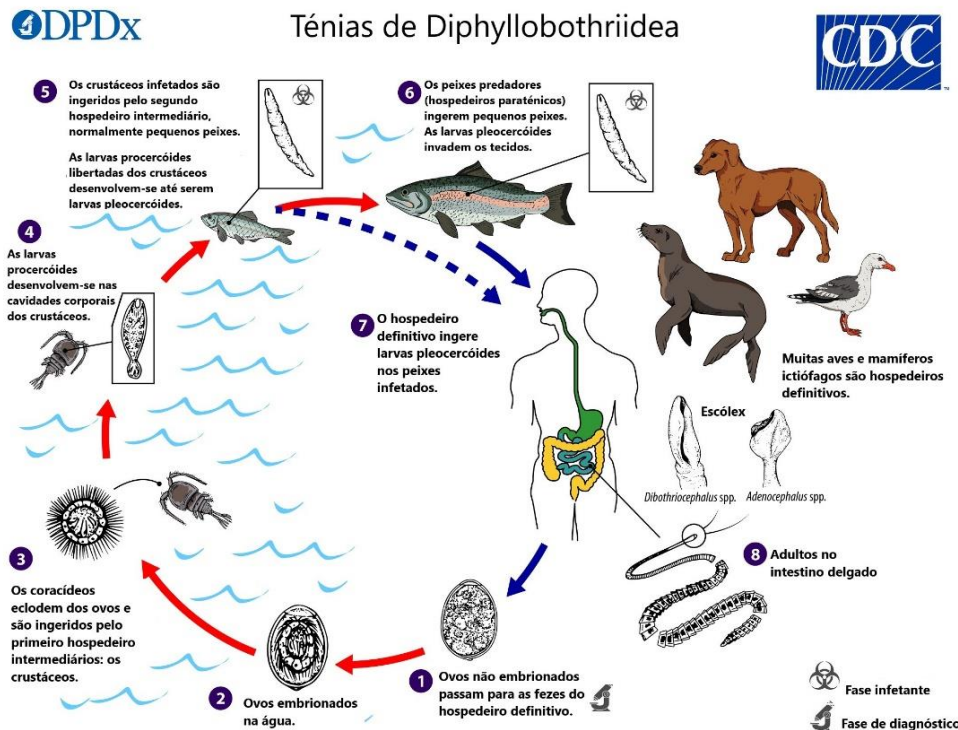


Figura 19. Ciclo de vida das espécies da ordem Diphyllbothriidea. Adaptado de CDC (2020b).

3.6. Meios de diagnóstico das helmintoses gastrointestinais

3.6.1. Exame das fezes

As amostras fecais devem ser examinadas a olho nu para a pesquisa de proglotes e de helmintos adultos, bem como para determinar a consistência, a presença de sangue, de muco e de restos alimentares. A utilização simultânea de métodos com diferentes sensibilidades para o diagnóstico de parasitas gastrointestinais, ao microscópio, é vantajosa na medida em que aumenta a eficiência do diagnóstico e, como consequente, diminui os resultados falsos-negativos (Modrý et al. 2012). Uma colheita de fezes realizada em dias consecutivos (convencionalmente 3 dias) também aumenta a probabilidade de se detetarem ovos, proglotes ou larvas nas fezes (idem).

Porém, pode dar-se o caso de estar a ocorrer uma fase do ciclo biológico do helminte em que não há libertação de ovos, larvas ou proglotes, pelo que a ausência destes nas fezes não significa, necessariamente, ausência de infeção (Zajac and Conboy 2012). Para a coloração das preparações a serem observadas ao microscópio ótico, podem ser utilizados, por exemplo: lugol forte, que impregna os ovos, larvas e helmintes adultos, facilitando a visualização das estruturas e consequente identificação (idem); e carmim álcool-clorídrico para corar os helmintes achatados (cestodes e trematodes) (Modrý et al. 2012). No que concerne ao diagnóstico de helmintes gastrointestinais ao microscópio, existem várias técnicas, disponíveis pormenorizadamente em fontes bibliográficas acessíveis (idem), entre as quais:

- Método direto – Permite visualizar os estádios de helmintes (ovos, larvas e adultos de espécies de menor dimensão). Para a identificação de larvas de helmintes é necessária a coloração por lugol (Zajac and Conboy 2012);
- Método de sedimentação espontânea – Para a pesquisa de ovos e larvas, sendo indicada para a recuperação de ovos considerados pesados, como os de trematodes (Modrý et al. 2012) e acantocéfalos (Zajac and Conboy 2012);
- Técnicas de flutuação – De maneira geral, os ovos de nematodes e cestodes flutuam num líquido com densidade entre 1,10 e 1,20 g/mL e os ovos de trematodes, mais pesados, requerem uma densidade de 1,30-1,35 g/mL. Derivações desta técnica incluem, por exemplo, o método de Faust, que consiste na centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (densidade de 1,18g/mL para fezes frescas e de 1,20g/mL para fezes conservadas) de ovos leves e larvas (Souza-Dantas et al. 2007);
- Método de Baermann-Moraes – Permite a deteção de larvas vivas de nematodes, através de hidrotropismo e termotropismo positivos. A temperatura da água deve estar entre 40 e 45°C. Utiliza-se no isolamento de larvas no terceiro estágio (L3) do ambiente e no diagnóstico de helmintoses gastrointestinais através da deteção de L3 isoladas por coprocultura (Zajac and Conboy 2012; Modrý et al. 2012);
- Coprocultura - Permite um diagnóstico diferencial do género e da espécie através da observação de L3 com origem nos ovos eliminados nas fezes, sempre que tal não seja possível por observação dos ovos dos nematodes das superfamílias Strongyloidea e Trichostrongyloidea (idem);
- Método de McMaster – É um método quantitativo que consiste na contagem de ovos por grama (OPG) de helmintes para deduzir, de forma aproximada, o número de indivíduos adultos dentro do hospedeiro. Apesar de a leitura dos resultados ter de ser crítica, por serem necessários mais fatores a ter em consideração (por exemplo, a contagem de ovos

de *Strongyloides* spp., representará um maior número de fêmeas adultas que a mesma contagem de ovos de *Trichuris* spp.), de maneira geral este método permite orientar um diagnóstico, decidir uma terapêutica, controlar a eficácia de um anti-helmíntico e estudar o ciclo de vida de um parasita (idem).

No **Anexo 4**, é possível observar alguns dos ovos de parasitas gastrointestinais frequentemente encontrados no género *Didelphis*.

3.6.3. Exame *post-mortem*

O exame *post-mortem* será descrito pormenorizadamente mais à frente, por ser parte integrante dos métodos utilizados neste trabalho.

3.7. Tratamento

A *Opossum Society of the United States* (2018) descreve a possibilidade de utilização de febendazol, na concentração de 50mg/kg, PO, SID, por 3 dias, com repetição passados 14 dias para a desparasitação interna de didelfídeos. A mesma fonte alerta para o registo de morte súbita e outros efeitos adversos graves após a administração de levamisol, não aconselhando este fármaco como primeira escolha. Jones (2013), aponta a utilização de uma combinação de ivermectina (PO ou SC; 0,1 a 0,2 mg/kg) e febendazol (PO; 25 a 50 mg/kg) como uma opção eficaz no tratamento de nematodoses em *Didelphis virginiana*, devido ao seu efeito sinérgico. O febendazol interrompe as vias metabólicas dos nematodes gastrointestinais, tendo efeito terapêutico local, com baixa absorção sistémica, aparentando ter uma utilização muito segura. A sua biodisponibilidade aumenta quando administrado com alimentos. Já a ivermectina atua a nível sistémico, inibindo os recetores GABAérgicos, provocando a paralisia e morte dos nematodes, podendo atingir larvas migrantes. Este tratamento combinado deve ser administrado SID, durante pelo menos 2 semanas, ou até que os exames coprológicos sejam negativos, ou haja demonstração da melhoria da condição clínica (ausência de melena, resolução da diarreia, resolução da anemia, aumento da condição corporal, entre outros sinais). Nos casos de animais gravemente parasitados, aconselha-se a administração dos fármacos no limite inferior da dosagem, uma vez que a morte maciça dos nematodes, poderá levar a obstrução intestinal. Outras opções de tratamento de helmintoses, bem como de outras parasitoses, em gambás, podem ser consultadas no **Anexo 5** - Fármacos utilizados na desparasitação interna e externa de Didelphidae.

4. Objetivos

O presente trabalho propõe-se a:

- a) Pesquisar *Trypanosoma cruzi* nos indivíduos de *D. albiventris* e *D. aurita* da AMC;
- b) Registrar a fauna helmintológica existente nos indivíduos de *D. albiventris* e *D. aurita* da AMC;
- c) Contribuir para o conhecimento sobre o parasitismo em *D. albiventris* e *D. aurita* no município de Jundiaí e municípios circundantes.

5. Material e métodos

Os gambás estudados (**Anexo 6**) deram entrada na AMC por variados motivos incluindo atropelamento, ataques de animais domésticos e eletrocussão, tendo proveniência urbana e periurbana de vários municípios da Macrometrópole Paulista, São Paulo, Brasil.

Os gambás aos quais foi efetuada colheita de sangue e do conteúdo das glândulas perianais para pesquisa de *T. cruzi*, já se encontravam nos recintos de reabilitação da AMC, sendo impossível identificar a sua proveniência exata. Já os sujeitos a necrópsia tiveram proveniência dos municípios de Bragança Paulista, Campinas, Itatiba, Itu, Jundiaí, Louveira, Valinhos e Vinhedo. Os animais foram trazidos à AMC por munícipes, Polícia Ambiental, Corpo de Bombeiros, Guarda Municipal e Defesa Civil de Jundiaí e municípios circundantes.

Na contenção para colheita de amostras nos gambás vivos, um ajudante utilizava luvas de couro para, com uma mão, controlar a cabeça e, com a outra, os membros anteriores do animal. Depois de realizar a assepsia das áreas com algodão e álcool etílico a 70%, o operador, com recurso a seringas de 1 mL e agulhas 27G, colhia sangue da veia caudal marginal e conteúdo de uma das glândulas perianais.

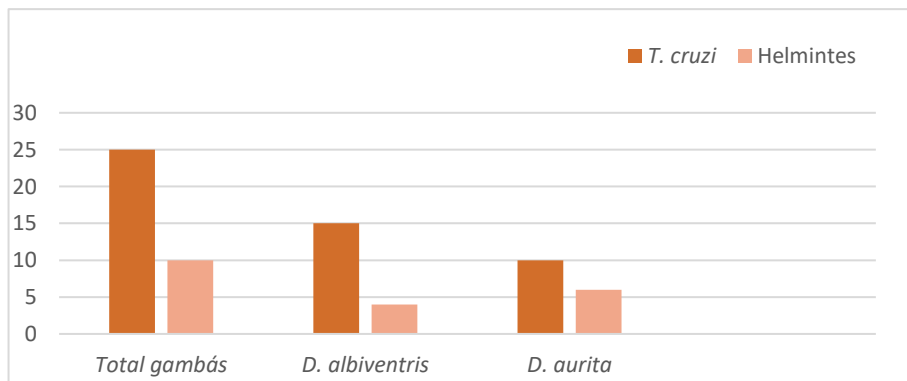


Gráfico 2. N.º total e n.º por espécie de indivíduos utilizados nas diferentes pesquisas.

5.1. Para a pesquisa de *T. cruzi*

No recinto de reabilitação de gambás da AMC, com recurso a redes de captura do tipo puçá (**Figura 20**), foram capturados indivíduos de *D. albiventris* (n=11; G11, G13 a G22) e *D. aurita* (n=10; G8, G12, G23 a G30), tendo sido posteriormente deslocados, por meio de caixas transportadoras, para uma sala de preparação do animal (onde normalmente se preparam os animais antes da cirurgia).



Figura 20. Rede de captura do tipo puçá utilizada na contenção dos gambás (fonte: Rafael Oliveira).

Aqui, procedeu-se à contenção destes gambás, individualmente. No total, foram realizados esfregaços de sangue em duplicado (n=17; G11 a G15, G17, G18, G20 a G29), colheita de sangue para tubos com EDTA (n=15; G11 a G15, G17, G18, G20, G22, G23 a G27 e G29), esfregaços em duplicado de conteúdo glandular perianal (n=15; G8, G11, G12, G14 a G18, G20, G21, G23, G24, G26, G29 e G30) e colheita em quantidade de conteúdo glandular perianal para tubos de centrifugação pequenos com solução salina a 0,9% (n=15; G8, G11, G12, G14 a G18, G20, G21, G23, G24, G26, G29 e G30). Não foi possível obter amostras de G19, tendo sido utilizados, no total, 20 gambás vivos nesta pesquisa.

Para além disto, foram efetuadas necrópsias a indivíduos de *D. albiventris* (n=4; G1, G3, G9 e G10) e de *D. aurita* (n=1; G2), numa divisão destinada para o efeito, das quais se colheram fragmentos de baço (n=5; G1 a G3, G9 e G10), glândulas perianais (n=5; G1 a G3, G9 e G10), fígado (n=5; G1 a G3, G9 e G10), miocárdio (n=5; G1 a G3, G9 e G10) e linfonodos submandibulares (n=5; G1 a G3, G9 e G10) para tubos de 15mL com álcool etílico a 70%, na proporção mínima de 1 de total de fragmentos no tubo para 10 de álcool, para posterior processamento por RCP. Das necrópsias efetuadas a animais recém-mortos, aproveitou-se para realizar esfregaços

de sangue (n=1; G9) e por aposição de baço (n=3; G3, G9 e G10), fígado (n=3; G3, G9 e G10), glândulas perianais (n=2; G9 e G10) e miocárdio (n=3; G3, G9 e G10).

Todos os fragmentos de órgãos, conteúdo de glândulas perianais e sangue foram conservados a -70°C e posteriormente transportados numa mala térmica com gelo reciclável até à FCAV – UNESP (~6h de viagem). Os esfregaços foram mantidos à temperatura ambiente, resguardados dentro de caixas até à sua fixação e coloração.

A coloração dos esfregaços foi efetuada segundo o método de May-Grunwald-Giemsa, contemplando os seguintes passos:

- 1.º - Fixação - As lâminas foram colocadas num recipiente com álcool metílico durante 20 segundos;
- 2.º - Coloração por Giemsa - Depois de secas, aplicou-se o corante Giemsa sobre cada lâmina invertida e deixou-se corar por cerca de 15 minutos;
- 3.º - Enxaguou-se com água corrente, sem jato forte;
- 4.º - As lâminas foram deixadas a secar ao ar.

As lâminas foram depois observadas ao microscópio ótico com uma ampliação de 1000 vezes (lente objetiva de 100 vezes e lentes oculares de 10 vezes), com uma gota de óleo de imersão.

5.1.1. Processamento por RCP convencional

Foram extraídas 15 amostras sanguíneas (G11 a G15, G17, G18, G20, G22 a G27 e G29) e 5 amostras de baço (G1 a G3, G9 e G10) de gambás (*Didelphis* spp.) (**Tabela 1**) para realização do diagnóstico de Trypanosomatidae, realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV – UNESP, Campus Jaboticabal - SP. As amostras foram submetidas a RCP com os oligonucleotídeos CytB F1/R2 (5' GAA CTT CKA CAA TAH ACA AAT CAT AAT A 3' / 3'ATG CAT TTR TTT TGT TTA CAT TAT TTT A 5'), a 94°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos à temperatura de 52°C (Marcili et al. 2009; Lopes et al. 2016) para a amplificação de uma banda de 377 pb da região mitocondrial do citocromo B.

5.2. Para a pesquisa de helmintes

Foram realizadas necrópsias a seis indivíduos de *D. aurita* (n=6; G2, G4 a G7 e G32) e quatro de *D. albiventris* (n=4; G3, G9, G10, G31) que morreram após chegar à AMC. Os seus corpos permaneceram conservados a -5°C até que fosse oportuna a realização das necrópsias (**Anexo 6**).

O local de proveniência dos diferentes animais está assinalado na **Figura 21**. Durante a necrópsia, os órgãos foram retirados “em bloco” desde a língua até ao intestino grosso e colocados em sacos de plástico devidamente identificados e mantidos a -70°C até serem transportados numa mala térmica com gelo reciclável até à FCAV – UNESP (~6h). Aqui, descongelaram-se os blocos e, com recurso a uma tesoura, separaram-se os órgãos por: esófago + estômago; traqueia + pulmões; intestino delgado + intestino grosso; fígado. Posteriormente, os órgãos parenquimatosos foram cortados em pequenos fragmentos e macerados e os órgãos ocos foram abertos longitudinalmente, dispondo-se o material por cima de uma peneira com água corrente. O filtrado obtido do material peneirado foi colocado em copos de colheita de urina ou copos de Becker (neste caso, tapando com papel de alumínio), aos quais foi acrescentado álcool a 70%. Com recurso a ampolas de vidro, o material foi sendo colocado em placas de Petri para ser visualizado à lupa estereoscópica para separação do restante conteúdo, e disposto em lâminas para melhor observação ao microscópio ótico (ampliação de 100x) e contagem do número total de parasitas. A identificação taxonómica de nematodes foi efetuada com base em “Nematóides do Brasil: Parte V – Nematóides de Mamíferos” (Vicente et al. 1999).

O cálculo da prevalência (%), intensidade, intensidade média e abundância foi realizado segundo *Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al revisited* (Bush et al. 1997):

Prevalência =

$$= \frac{\text{N.º de indivíduos de uma espécie hospedeira}^1 \text{ com uma espécie}^1 \text{ particular de parasitas}}{\text{N.º de hospedeiros examinados}}$$

Intensidade =

$$= \text{N.º de indivíduos}^2 \text{ de uma espécie}^1 \text{ particular de parasita em cada hospedeiro infetado}$$

Intensidade média =

$$= \frac{\text{N.º total de indivíduos de uma espécie}^1 \text{ particular de parasita numa amostra de uma espécie hospedeira}^1}{\text{N.º de indivíduos infetados da espécie hospedeira}^1 \text{ na amostra}}$$

Densidade relativa (Abundância)=

$$= \frac{\text{N.º total de indivíduos de uma espécie}^1 \text{ particular de parasita numa amostra de hospedeiros}}{\text{N.º total de indivíduos da espécie hospedeira}^1 \text{ (infetados + não infetados) na amostra}}$$

¹ Para os cálculos deste trabalho, considerou-se o género e não as espécies individualizadas. Exceção feita para os cestodes, em que neste caso se considerou a classe Cestoda.

² Determinado direta ou indiretamente.

6. Resultados

A caracterização dos indivíduos que participaram no total do estudo (pesquisa de *T. cruzi* e de helmintes) (**Gráfico 3**) foi realizada por observação direta. A distinção entre adultos e jovens foi efetuada de forma empírica, tendo em consideração o tamanho do animal, a densidade da pelagem, o desenvolvimento dos órgãos reprodutores externos (nos machos) e marsúpio (nas fêmeas), a proporção das orelhas em relação ao corpo (**Anexo 1**) e o estado da dentição.

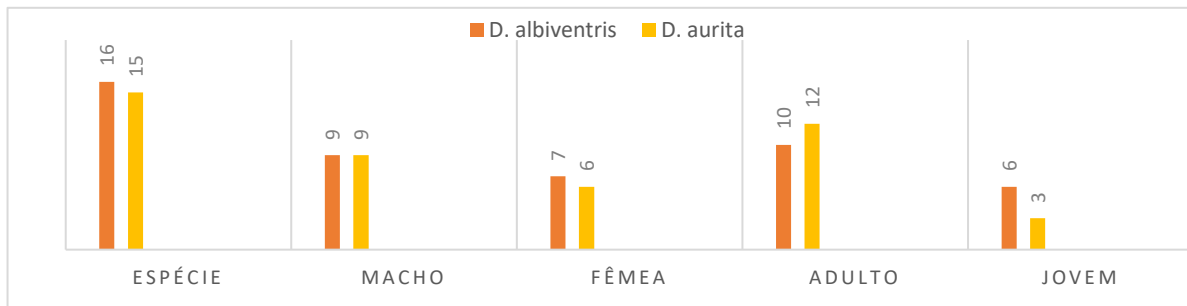


Gráfico 3. Caracterização dos indivíduos que participaram no total do estudo (pesquisa de *T. cruzi* e de helmintes) pelo método de observação direta.

6.1. Pesquisa de *T. cruzi*

Quando existe infeção por *Trypanosoma cruzi*, é expectável encontrar nos esfregaços de sangue a forma tripomastigota e/ou nos esfregaços de conteúdo glandular perianal as formas tripomastigota e epimastigota. Nenhum dos esfregaços apresentou qualquer forma de *Trypanosoma*. Os esfregaços por aposição de baço, fígado, miocárdio, linfonodos submandibulares e glândulas perianais também não revelaram formas tripanossómicas, nem outros achados. Da análise feita por RCP às amostras de baço e sangue, os resultados também foram negativos. Do total de amostras analisadas, foram obtidos resultados negativos para 25 animais analisados, 15 da espécie *D. albiventris* e 10 da espécie *D. aurita* (**Tabela 1**).

Tabela 1. Resultados da pesquisa de *Trypanosoma cruzi* nos 25 animais analisados. Id. = Identificação do animal; Sp. = Espécie; M= Macho; F= Fêmea; A= Adulto; J= Jovem; CC = Condição Corporal; Ins=linfonodos (submandibulares); gl. = glândulas; RCP = Reação em Cadeia da Polimerase; - Não foi efetuado.

Id.	Sp.	Sexo	Idade	CC	Esfregaços por aposição de baço, fígado, miocárdio, Ins, gl. perianais	Esfregaço sanguíneo	Esfregaço das glândulas perianais	Amostra p/ RCP	Resultado RCP
G1	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	-	-	-	Baço	Negativo
G2	<i>D. aurita</i>	F	A	Boa	-	-	-	Baço	Negativo
G3	<i>D. albiventris</i>	M	J	Boa	Negativo*	-	-	Baço	Negativo
G8	<i>D. albiventris</i>	F	A	Boa	-	-	Negativo	-	-
G9	<i>D. albiventris</i>	F	J	Boa	Negativo	Negativo	-	Baço	Negativo
G10	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	Negativo	-	-	Baço	Negativo
G11	<i>D. albiventris</i>	F	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G12	<i>D. aurita</i>	M	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G13	<i>D. aurita</i>	M	A	Boa	-	Negativo	-	Sangue	Negativo
G14	<i>D. albiventris</i>	F	J	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G15	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G16	<i>D. albiventris</i>	M	J	Boa	-	-	Negativo	-	-
G17	<i>D. albiventris</i>	F	J	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G18	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G20	<i>D. albiventris</i>	F	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G21	<i>D. albiventris</i>	F	A	Boa	-	Negativo	Negativo	-	-
G22	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	-	Negativo	-	Sangue	Negativo
G23	<i>D. albiventris</i>	M	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G24	<i>D. aurita</i>	F	A	Má	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G25	<i>D. aurita</i>	F	A	Má	-	Negativo	-	Sangue	Negativo
G26	<i>D. aurita</i>	M	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G27	<i>D. aurita</i>	M	A	Boa	-	Negativo	-	Sangue	Negativo
G28	<i>D. aurita</i>	F	A	Boa	-	Negativo	-	-	-
G29	<i>D. aurita</i>	F	A	Boa	-	Negativo	Negativo	Sangue	Negativo
G30	<i>D. aurita</i>	M	A	Boa	-	-	Negativo	-	-

*Não se realizou esfregaço por aposição das gl. perianais.

6.2. Pesquisa de helmintes

Dos indivíduos sujeitos a necrópsia para pesquisa de helmintes (n=10; G2, G3, G4, G5, G6, G7, G9, G10, G31 e G32), 50% apresentavam-se parasitados (n=5; G2, G3, G5, G7, G31) (**Figura 21**) (**Tabela 2**). A prevalência também foi de 50% para cada uma das espécies analisadas de gambás.

O indivíduo G2, uma fêmea, adulta, de *D. aurita*, no exame *post-mortem* apresentava caquexia com descoloração generalizada da musculatura. Após processamento na FCAV-UNESP, pôde observar-se um espécime de *Turgida* sp. no seu estômago (**Figura 22**) e, nos intestinos,

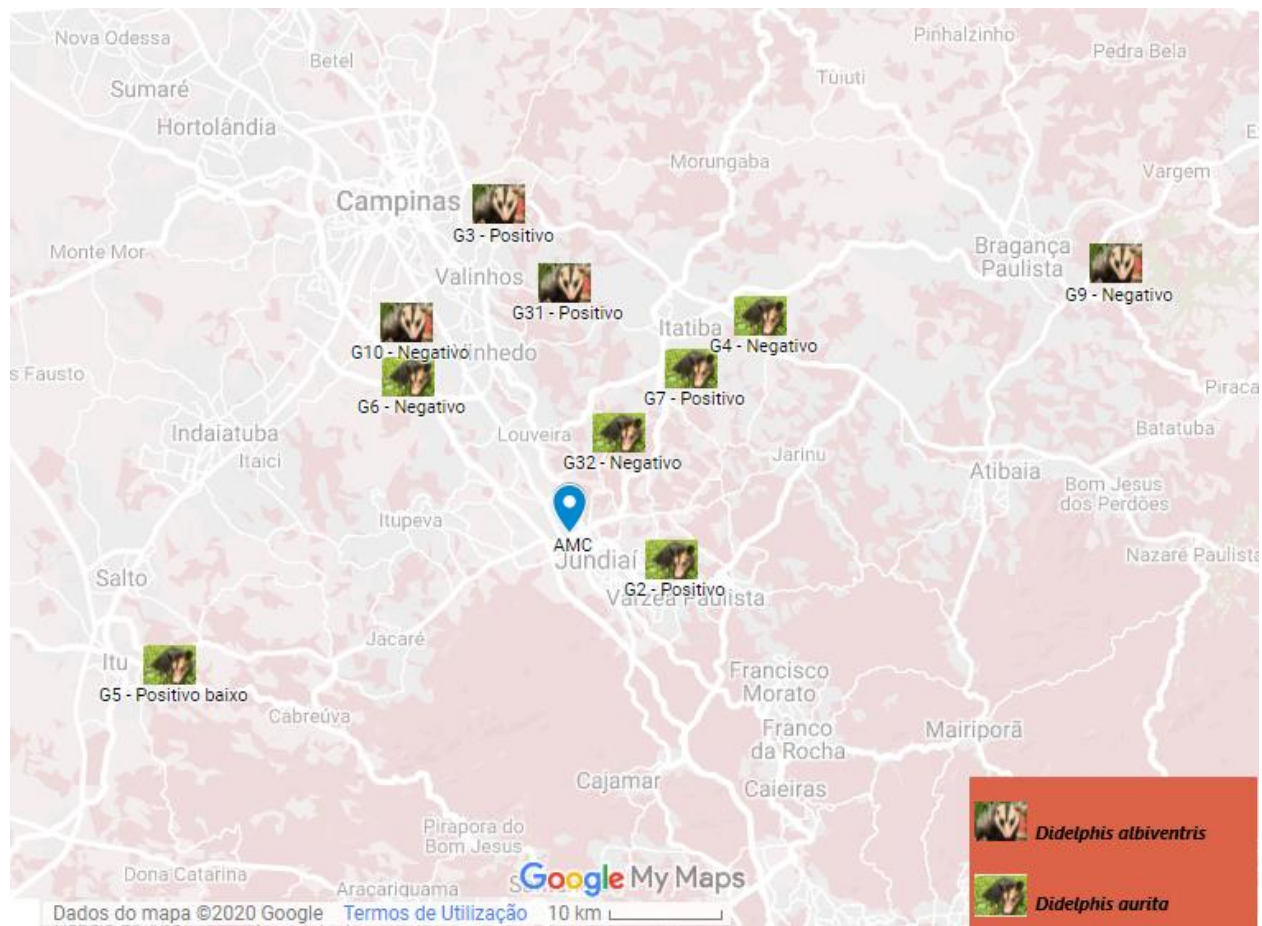


Figura 21. Mapa de distribuição dos indivíduos de *Didelphis* spp. submetidos a necrópsia para pesquisa de helmintes e respectivo resultado. Adaptado de Google My Maps (2020).

um indivíduo da classe Cestoda, 802 *Strongyloides* sp., 193 *Cruzia* sp. (**Figura 24**), três *Trichuris* sp. e um espécime de *Oligacanthorhynchus* sp. (**Figura 25**). G2 apresentava, ainda, resquícios de plástico no seu estômago (**Figura 26**).

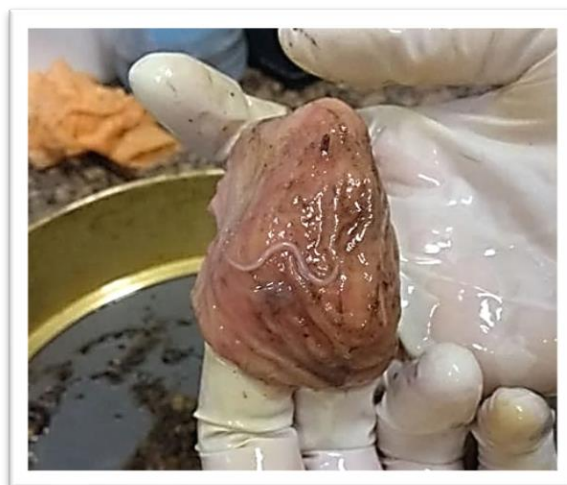


Figura 22. Achado de necrópsia do animal G2 de um único indivíduo de *Turgida* sp. na mucosa do estômago (*Didelphis aurita*, fêmea, adulta, proveniente de Jundiaí).

Tabela 2. Identificação e resultados dos indivíduos de *Didelphis* spp. submetidos a necrópsia para pesquisa de helmintes. Id.=Identificação; Sp.=Espécie; F=fêmea; M=Macho; A=Adulto; J=Jovem; S.A.D.R. = Sem alterações dignas de registo.

Id.	Sp.	Sexo	Idade	Município	Registo clínico	Necrópsia	Estômago	Intestinos
G2	<i>D. aurita</i>	F	A	Jundiaí	Resgate urbano (próximo de uma escola). Apresentava prostração, fraca condição corporal e mucosas pálidas.	Caquexia, com descoloração da musculatura.	1 <i>Turgida</i> sp. Resquícios de plástico.	1 <i>Oligacanthorhynchus</i> sp. 802 <i>Strongyloides</i> sp. 193 <i>Cruzia</i> sp. 3 <i>Trichuris</i> sp. 1 Cestoda
G3	<i>D. albiventris</i>	M	J	Campinas	Atacado por um cão e trazido por um município. Fratura no fêmur direito; choque. Óbito no dia seguinte à sua entrada.	Exame externo: escoriação na virilha direita com miíase. Exame interno: hemorragia subcutânea ao longo das regiões torácica e abdominal direita e congestão dos lobos caudais de ambos os pulmões.	-	50 <i>Trichuris</i> sp. 102 <i>Cruzia</i> sp. 3 <i>Strongyloides</i> sp. 2 Cestoda
G4	<i>D. aurita</i>	F	J	Itatiba	Órfão	S.A.D.R.	-	Negativo
G5	<i>D. aurita</i>	M	J	Itu	Órfão	S.A.D.R.	-	3 <i>Strongyloides</i> sp.
G6	<i>D. aurita</i>	M	J	Vinhedo	Ataque de cão. Cortes na boca.	Cortes na boca.	-	Negativo
G7	<i>D. aurita</i>	M	A	Itatiba	Desconhecido.	Caquexia.	-	140 <i>Strongyloides</i> sp. 99 <i>Cruzia</i> sp. 4 Cestoda
G9	<i>D. albiventris</i>	M	A	Bragança Paulista	Órfão. Sem alterações evidentes	Congestão pulmonar no lobo cranial esquerdo.	-	Negativo
G10	<i>D. albiventris</i>	F	J	Vinhedo	Pequenas erosões e úlceras de formato circular na região torácica e focinho, presumivelmente atacada por um animal doméstico.	Exame externo: Lesões descritas em vida; registou uma úlcera de formato circular na região cranioventral da cauda.	-	Negativo
G31	<i>D. albiventris</i>	M	J	Valinhos	Atropelamento. Prostração e erosões na cauda.	Hemorragia subcutânea de grande extensão	-	48 <i>Cruzia</i> sp. 3 <i>Trichuris</i> sp. 1 Cestoda
G32	<i>D. aurita</i>	M	A	Louveira	Órfão (mãe predada por cão).	S.A.D.R.	-	Negativo

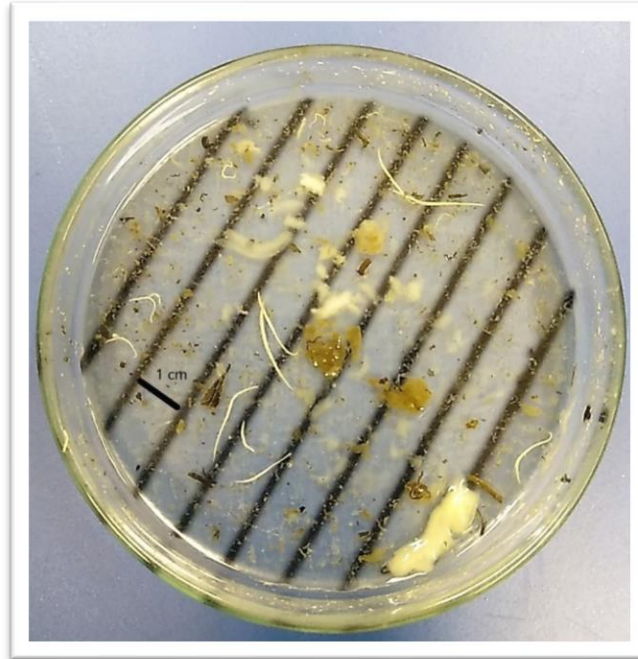


Figura 23. Conteúdo intestinal de G2 (*Didelphis aurita*, fêmea, adulta) numa placa de Petri (diâmetro de 90mm) para visualização e contagem à lupa estereoscópica. A barra (—) corresponde a 1cm.

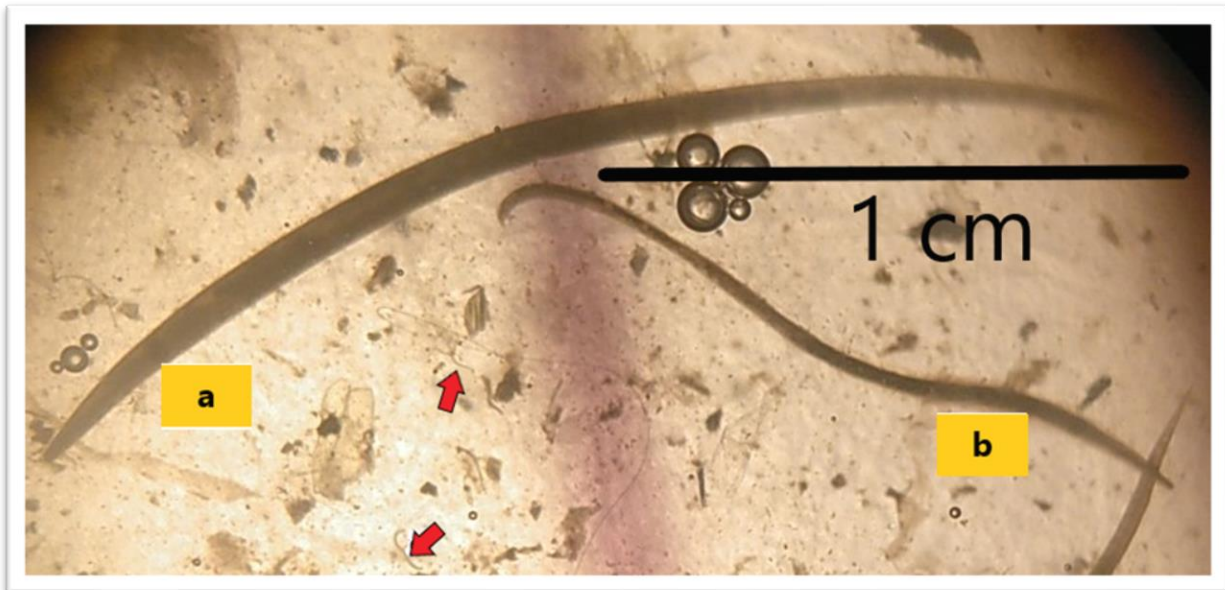


Figura 24. Conteúdo intestinal de G2 (*Didelphis aurita*, fêmea, adulta) visualizado à lupa estereoscópica. (a) Fêmea de *Cruzia* sp. – é visível a cauda a terminar de forma afilada; (b) Macho de *Cruzia* sp. em que é visível a curvatura na extremidade posterior. As setas vermelhas apontam para indivíduos de *Strongyloides* sp.. A barra (—) corresponde a 1cm.

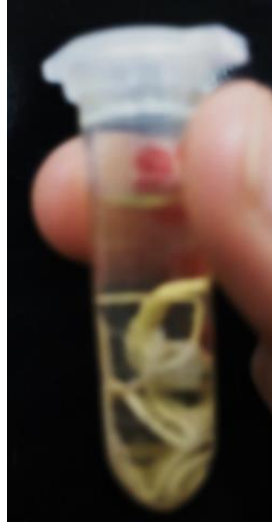


Figura 25. Tubo de Eppendorf com um indivíduo de *Oligacanthorhynchus* sp., conservado em álcool absoluto no seu interior, isolado a partir do intestino delgado de G2 (*Didelphis aurita*, fêmea, adulta). Apesar de desfocada, consegue notar-se na imagem a forma espiral e em paliçada do acantocéfalo.

Quanto a G3, um macho, jovem, de *D. albiventris*, foi observado, à necrópsia (Figura 27), hemorragia subcutânea ao longo das regiões torácica e abdominal direitas e congestão dos lobos caudais de ambos os pulmões. Após processamento, na FCAV-UNESP, foram detetados, nos intestinos, 50 *Trichuris* sp., 102 *Cruzia* sp., 3 *Strongyloides* sp. e 2 indivíduos da classe Cestoda (Figura 28).

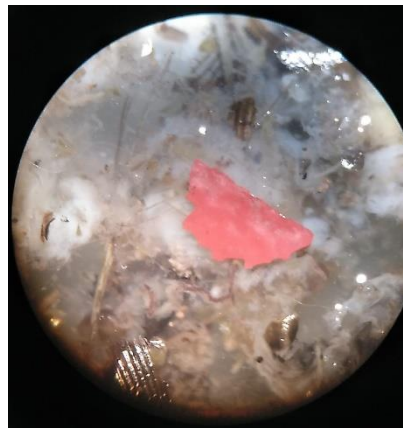


Figura 26. Resquício de plástico no interior do estômago de G2 (*Didelphis aurita*, fêmea, adulta) observado à lupa estereoscópica.



Figura 27. Bloco de órgãos de G3 (*Didelphis albiventris*, macho, jovem) obtido após necrópsia. É possível ver, à transparência, nematodes no interior do intestino grosso (setas vermelhas).

O animal G5, indivíduo de *D. aurita*, macho, jovem, não apresentou, à necrópsia, alterações dignas de registo. Ao exame helmintológico, apresentou três nematodes do género *Strongyloides* sp. nos intestinos.



Figura 28. Cestodes presentes no intestino delgado de G3 (*Didelphis albiventris*, macho, jovem) obtidos após necrópsia.

O indivíduo G7, macho, adulto, *D. aurita*, à necrópsia, apresentava caquexia. O exame helmintológico revelou 140 *Strongyloides* sp., 99 *Cruzia* sp. e quatro indivíduos de Cestoda nos intestinos (**Figura 29**).



Figura 29. Grânulos provocados pela fixação de cestodes na mucosa do intestino delgado do indivíduo de estudo G7 (*Didelphis aurita*, macho, adulto).

O indivíduo G31, macho, jovem, da espécie *D. albiventris*, à necrópsia, para além de erosões na cauda, foi possível observar uma hemorragia subcutânea de grande extensão. O exame helmintológico revelou 48 *Cruzia* sp., três *Trichuris* sp. (na **Figura 30**, são observáveis nematodes na mucosa intestinal de G31) e um indivíduo da classe Cestoda.



Figura 30. Na imagem são visíveis dois nematodes fixados na mucosa do intestino grosso de G31 (*Didelphis aurita* macho, adulto), causando reação inflamatória.

Os helmintes mais abundantes foram *Strongyloides* sp. e *Cruzia* sp. e os com intensidade média mais elevada foram *Strongyloides* sp. (=237,0), *Cruzia* sp. (=110,5) e *Trichuris* sp. (=18,6(6)), conforme é visível na **Tabela 3**.

. Dos indivíduos de *D. aurita* parasitados, a única fêmea apresentava a combinação *Strongyloides* sp. + *Cruzia* sp. + *Trichuris* sp. + *Turgida* sp. + *Oligacanthorhynchus* sp.+ Cestoda,

o macho jovem apresentava somente *Strongyloides* sp. e o macho adulto a combinação *Strongyloides* sp. + *Cruzia* sp. + Cestoda.

Quanto a *D. albiventris*, os dois indivíduos, machos, parasitados apresentavam as combinações *Cruzia* sp. + *Trichuris* sp. + *Strongyloides* sp. e *Cruzia* sp. + *Trichuris* sp..

Ao todo, foram encontrados representantes do filo Nematoda em 5 amostras (50%), dos Platelminthes, pertencentes à classe Cestoda, em 4 amostras (40%) e Acanthocephala numa amostra (10%). Os nematodes, cestodes e acantocéfalo foram conservados em álcool absoluto em tubos de Eppendorf, após a identificação taxonômica e contagem.

Tabela 3. Identificação taxonômica, prevalência (%), intensidade média, intensidade máxima e abundância dos achados helmintológicos.

Identificação Taxonômica	Prevalência (%)	Intensidade média	Intensidade máxima	Abundância
<i>Strongyloides</i> sp.	40	237,0	802	94,8
<i>Cruzia</i> sp.	40	110,5	193	44,2
<i>Turgida</i> sp.	10	1,0	1	0,1
<i>Trichuris</i> sp.	30	18,6(6)	50	5,6
<i>Oligacanthorhynchus</i> sp.	10	1,0	1	0,1
Cestoda	40	2,0	4	0,8

7. Discussão

Os centros de recuperação de animais silvestres procuram dar uma resposta aos desequilíbrios ecológicos consequentes da ação antrópica sobre a fauna do local em que se situam. No Brasil, por ano, são admitidas dezenas de milhares de animais silvestres nestes centros (Bomon 2018). A Associação Mata Ciliar tem o único CRAS de Jundiá e recebe muitos animais dos municípios circundantes. Atualmente, apesar de só 7 municípios possuírem autorização para enviar animais para o CRAS, a AMC recebe animais de mais de 140 municípios do estado de São Paulo (Utida 2020 Set 9). Entre 1 de Janeiro e 30 de Setembro de 2019, a média de entrada de animais na AMC foi de 10,5 por dia (Knupp 2019 Out 6), tendo a situação piorado em 2020, havendo, só no mês de Setembro, uma média de entrada de 45 animais por dia, um aumento de 350% quando comparado com o mesmo período do ano de 2019 (Euronews 2020 Out 28). Esta situação, para além de expor de forma evidente as alterações ambientais crescentes e o seu

impacto na fauna, resulta num CRAS sobrelotado para uma equipa reduzida de veterinários, biólogos e tratadores. Não é, por isso, de estranhar que a implementação de medidas de deteção de parasitas não seja uma prioridade na abordagem aos animais que chegam todos os dias à AMC e que, conseqüentemente, esta não disponha de meios materiais e humanos para realizar diagnósticos de forma conveniente.

Pela elevada casuística e variedade de espécies de animais selvagens que chegam à AMC, este lugar poderia ser promissor para várias pesquisas sobre a fauna neotropical, que ainda carece de muito conhecimento. A pesquisa de parasitas em gambás é um pequeno exemplo disso. A AMC tem o seu foco na prestação de primeiros socorros, reabilitação e conservação de animais selvagens, mais do que na investigação, tendo como posição ética intervir o mínimo possível na vida dos animais que alberga. Isto, a par da falta de meios no local para processar as amostras, dependendo muitas vezes de terceiros para o fazer, leva a que, apesar de a casuística ser grande, a pesquisa científica na área de doenças infecciosas e parasitárias não ocorra tanto como seria desejável e até necessário, se pensarmos que estes animais podem funcionar como hospedeiros-sentinelas para agentes importantes em Saúde Pública, Animal e dos Ecossistemas.

7.1. Pesquisa de *T. cruzi*

O controlo epidemiológico relativo aos ciclos selvagem e peridomiciliar da Doença de Chagas foi sempre maioritariamente direcionado para a pesquisa de triatomíneos infetados (Forattini et al. 1971; Bronfen et al. 1989; Wanderley et al. 2007; SVS 2019) e menos para as espécies reservatório (Barretto 1967; Fernandes et al. 1991; Roque & Jansen 2014). Isto, naturalmente, tem que ver com a maior facilidade e menos objeções éticas em obter insetos relativamente a mamíferos e por serem a picada do triatomíneo e a ingestão acidental de triatomíneos em alimentos as vias mais associadas ao cruzamento desses ciclos com o domiciliar (OMS 2020).

Pese embora o facto de a Doença de Chagas estar controlada no estado de São Paulo, uma vez que não há, atualmente, registos da transmissão de *T. cruzi* à espécie humana por via vetorial, há registos, ainda que poucos, de indivíduos de *P. megistus* - o principal vetor de *T. cruzi* no Brasil (SVS 2019) - infetados por *T. cruzi* neste estado (Silva 2019). No estado de São Paulo, este triatomíneo está associado aos didelfídeos e roedores presentes no bioma Mata Atlântica e, apesar de pouco registado, tem expressão próximo do município de Jundiaí (Silva 2019). Atualmente, a procura por triatomíneos suspeitos não é ativa, dependendo da notificação pela população, pelo que a distribuição de *P. megistus* pode estar subestimada (idem). Apesar de haver

grandes esforços para que a notificação seja sustentada, a verdade é que tem havido uma diminuição da participação da população, sendo o êxodo rural apontado como uma das causas para tal (idem). Neste cenário, é consensual que a vigilância de *T. cruzi* possa começar a ser efetuada através da monitorização de mamíferos silvestres como os gambás e roedores, encontrados perto das habitações (SVS 2019; Silva 2019).

Considerando estas informações e a capacidade dos gambás para possuírem um ciclo de vida próprio de *T. cruzi* nas suas glândulas perianais (Deane et al. 1986; Fernandes et al. 1989; Urdaneta-Morales and Nironi 1996) - onde o protozoário evolui por todas as formas parasitárias do ciclo biológico (Urdaneta-Morales and Nironi 1996) -, os seus índices de infeção relativamente altos (Schweigmann et al. 1995), o facto de possuírem um elevado período patente de parasitemia por *T. cruzi* (Fernandes et al. 1991; Jansen-Franken 2017) e de, entre os mamíferos que chegavam à clínica da AMC e os que permaneciam no CRAS, ter sido grande a afluência de *D. albiventris* e *D. aurita*, pensou-se que seria interessante averiguar sobre a existência de *T. cruzi* nestes animais.

Como é sabido, muitas vezes é difícil uma amostra de tamanho suficiente para haver relevância estatística quando se fazem pesquisas em espécies de animais selvagens e silvestres. Neste estudo, a pesquisa das formas tripanossómicas realizada em amostras de 25 animais, por meio de esfregaços de sangue, de conteúdo glandular perianal e por aposição de órgãos, foi negativa. Estes métodos são menos sensíveis do que a pesquisa de ADN por RCPc (Souto et al. 1996; Lopes et al. 2016). Os gambás são animais de manejo relativamente fácil, não havendo problemas de maior, quando devidamente contidos, em obter amostras de sangue e de conteúdo das glândulas perianais. As glândulas são facilmente palpáveis na região perianal e as veias caudais laterais facilmente observáveis. Porém, em G21 e G28, o volume sanguíneo obtido foi baixo, só tendo sido realizados esfregaços sanguíneos, sem se efetuar colheita para processamento por RCP. O conteúdo das glândulas perianais foi obtido somente de uma glândula em cada gambá, para evitar o stress destes animais.

Em relação ao processamento do sangue no local, só foram realizados esfregaços sanguíneos finos. A realização de esfregaços sanguíneos por gota espessa é frequentemente utilizada em medicina humana por aumentar a sensibilidade de deteção de formas tripanossómicas em indivíduos com parasitemia mais baixa (Ministério da Saúde 2009). A sua realização, a par de esfregaços sanguíneos finos, poderia ter sido considerada, bem como o exame do sangue a fresco, cuja sensibilidade também é maior por serem observadas as formas tripomastigotas em movimento (Dias et al. 2016). No entanto, no contexto em que se obtiveram as amostras – isto é, num período limitado (uma manhã), para interferir o mínimo com a dinâmica de trabalho normal

da AMC, com um grupo de quatro pessoas para conter os gambás, colher as amostras, acondicioná-las e realizar esfregaços -, não seria possível a observação atempada de todos os esfregaços de sangue a fresco. Outra possível forma de aumentar a sensibilidade do estudo, seria repetir a colheita de amostras nos mesmos gambás em dias diferentes. Contudo, neste caso, seria inviável por uma questão de bem-estar animal.

Das amostras obtidas *in vivo*, 2 indivíduos (G24 e G25) apresentaram alterações ao exame físico, com baixa condição corporal, sendo essa uma pista para a existência de alguma enfermidade. No contexto da medicina humana, idealmente, o paciente com sinais clínicos suspeitos deve estar febril no ato da colheita de sangue para pesquisa de *T. cruzi* (Dias et al. 2016). Os animais selvagens portadores de *T. cruzi*, por seu lado, não apresentam sinais clínicos evidentes, não sendo este um critério viável para a seleção de uma amostra (Roque & Jansen 2014; Murillo-Godínez 2018).

Em 5 animais (G8, G16, G21, G28 e G30) a pesquisa de *T. cruzi* foi exclusivamente efetuada por meio de esfregaços, tendo, nos outros 20, sido efetuada também por RCP.

Por motivos de diminuição de orçamento para o ensino superior decorrentes do atual governo brasileiro, sentidas diretamente na FCAV – UNESP, Jaboticabal - SP, as amostras colhidas para pesquisa de *T. cruzi* não puderam ser todas processadas por RCP, tendo-se dado prioridade às amostras de sangue e de baço, por ser expectável que, havendo infecção ativa, fosse possível detetar o ADN do protozoário na corrente sanguínea e filtrado de baço dos animais. De fora ficaram as amostras de fígado, glândulas perianais, linfonodos submandibulares, miocárdio e conteúdo das glândulas perianais. A autora, por motivos a si alheios, não pôde participar neste processamento que foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular, no período posterior ao seu estágio no Brasil. Pela impossibilidade de transportar material biológico de avião, bem como a fragilidade na manutenção das amostras para processamento por RCP, trazê-las para a FMV-ULisboa não era viável.

Por dificuldade na obtenção de iniciadores específicos para *T. cruzi* e por não terem sido observadas formas tripanossómicas nos esfregaços realizados, optou-se por aplicar iniciadores direcionados a uma banda de ADN conhecida por ser comum a toda a família Trypanosomatidae (Lopes et al. 2016). Deste modo, seria também possível procurar ADN de *Leishmania* e de outras espécies de *Trypanosoma* - os dois géneros que parasitam *Didelphis* spp. desta família (Santiago 2007) -, caso existissem nas amostras. Não sendo os resultados positivos para a família Trypanosomatidae, seria pouco provável que fossem positivos se os iniciadores fossem direcionados para a espécie *T. cruzi*.

Os resultados negativos em 20 amostras processadas por RCP, correspondendo a 20 indivíduos, são pouco reveladores do que será a prevalência de *T. cruzi* nos gambás do município de Jundiaí e municípios circundantes. Destes resultados, 5 correspondem a amostras de baço obtidas por necrópsia de animais que deram entrada na clínica. As restantes 15, correspondem a amostras de sangue de animais já no recinto de reabilitação, dos quais é impossível saber a proveniência e data de chegada à AMC. Fernandes et al. (1994) observaram que um gambá (*D. albiventris*) naturalmente infetado, apresentando xenodiagnóstico e hemocultura positivos e RIFI de 1:160 para *T. cruzi*, passados cerca de 13 meses encontrou-se negativo a todos os exames. Os mesmos métodos foram aplicados 6 vezes, com pelo menos 1 mês de intervalo, e os resultados negativos mantiveram-se. Os autores, com isto, levantaram a possibilidade, ainda que desconhecidas sejam as razões, de ter acontecido aquilo a que chamaram de “autocura em gambás”. Em relação aos gambás do recinto de reabilitação da AMC, não é de descartar a possibilidade de ter ocorrido infecção antes da entrada na AMC, entretanto resolvida, uma vez que não foi possível saber o período em que os diferentes animais aí permaneceram até à data da colheita de sangue.

Este trabalho teria sido enriquecido se todas as amostras colhidas tivessem sido processadas por RCP, principalmente o conteúdo das glândulas perianais (obtido *in vivo*) e as glândulas perianais (obtidas *post-mortem*), considerando que o ciclo de vida de *T. cruzi*, passível de existir aí, é independente da parasitemia - a não detecção de ADN do protozoário no sangue e baço não significa que ele não esteja presente nas glândulas perianais e seu conteúdo (Deane et al. 1984). Para além disso, e como ponto a considerar para uma próxima pesquisa, teria sido interessante fazer cortes histológicos cardíacos, uma vez que há registo de pseudoquistos no miocárdio de gambás responsáveis por miocardite ligeira, histologicamente evidente, sem sinais clínicos (Murillo-Godínez 2018).

Os avanços das técnicas moleculares para a caracterização de *T. cruzi* e os mais diversos alvos propostos têm revelado uma heterogeneidade muito maior do que os estudos bioquímicos poderiam revelar e tornaram possível estudar o protozoário com um maior detalhe (Jansen et al. 2020). Esta diversidade relacionada com as diferentes UDTs, que podem coexistir dentro do mesmo hospedeiro e vetor (*idem*), torna difícil escolher um *pool* de iniciadores para a detecção de *T. cruzi*. Em medicina humana, por exemplo, a RCP no diagnóstico de *T. cruzi* é limitada, uma vez que não existem protocolos padronizados e todas as UDTs são passíveis de infetar e provocar sinais clínicos (Marcili et al. 2009). Neste caso, dá-se primazia ao diagnóstico por esfregaço de sangue (exame de sangue a fresco, esfregaço corado e gota espessa) e testes serológicos (principalmente RIFI, ELISA e HAI), reservando-se o processamento por RCP a resultados

indeterminados e ao controlo após tratamento (Dias et al. 2016). As UDTs TCI, principalmente, e TCII, secundariamente, são comumente associadas aos gambás e restantes animais selvagens no Brasil (Marcili et al. 2009; Jansen et al. 2020), sendo um bom ponto de partida utilizar iniciadores conhecidos para estas UDTs nestes animais.

Ainda não é possível compreender completamente a complexidade da ecologia e do genótipo de *T. cruzi* (Marcili et al. 2009; Jansen et al. 2020), contudo, recentemente, Schwabl et al. (2019) provaram que *T. cruzi* consegue reproduzir-se por meiose em algumas subpopulações, sendo este um importante marco para a compreensão da grande diversidade e adaptabilidade do protozoário a espécies e tecidos dos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Para este trabalho, a proveniência dos gambás testados só foi conhecida nos animais sujeitos a necrópsia e não naqueles capturados no recinto de reabilitação, não podendo, por isso, confirmar-se se os gambás testados provêm de locais onde há registo de *P. megistus*, sendo certo, contudo, que a proveniência destes animais era variada. Importa destacar que apesar de o estado de São Paulo estar virtualmente livre da Doença de Chagas, não se pode descurar a hipótese de haver espécies reservatório e triatomíneos infetados, já que as primeiras são de difícil acesso e os segundos dependem grandemente da participação ativa da população para que sejam notificados (Silva 2019). De facto, há que ter em consideração que o conteúdo das glândulas perianais dos gambás ejetado para marcar território ou quando se sentem ameaçados, pode facilmente contaminar a pele, mucosa e alimentos com formas metacíclicas infetantes, possibilitando a infeção humana em áreas onde não existam triatomíneos peridomiciliares e selvagens (Deane et al. 1986).

A vigilância de *T. cruzi* pode e deve começar a ser efetuada através da monitorização de mamíferos silvestres como os gambás que dão entrada nos CRAS, de forma a detetar e mapear as localizações de proveniência destes animais. No caso concreto da AMC, implementar medidas de rastreio de formas tripanossómicas, nem que seja através de uma punção venosa única nos animais das espécies reservatório que chegam ao CRAS - gambás, tatus, tamanduás, quatis, preguiças, capivaras, cachorros-do-mato, pequenos roedores, entre outros mamíferos (Barretto 1967; Roque & Jansen 2014) - para obter sangue de modo a realizar exame a fresco, esfregaço fino e com gota espessa, no momento, com fixação e coloração pelo método de Giemsa, poderia constituir um importante ponto de partida para um estudo: caso fossem encontradas, e havendo instituições com meios de processamento que se interessassem em colaborar, far-se-ia uma colheita de sangue em maior quantidade, para o processamento por RCP. Outra sugestão é aquando da realização de necrópsias, prática já implementada na AMC, efetuar colheita e acondicionamento de amostras como descrito em **5. Material e métodos** para posterior

processamento e considerar a obtenção de amostras de miocárdio para efetuar cortes histológicos para pesquisa de pseudoquistos (Murillo-Godínez 2018). Isto permitiria, a médio-longo prazo, um conhecimento dos ciclos peridomiciliar e selvagem na região e um mapeamento dos locais onde o protozoário existe.

Como forma de prevenir a infecção por *T. cruzi* no contacto com mamíferos possivelmente infetados na AMC, é importante a utilização de repelentes de modo a evitar a aproximação de triatomíneos. Também se deve ter especial atenção no manuseio dos gambás, por forma a evitar o contacto das suas secreções perianais (nos próprios animais, mas também em superfícies dos recintos, jaulas, bebedouros, comedouros, utensílios utilizados na limpeza, entre outros) com as mucosas e pele.

7.2. Pesquisa de helmintes

A pesquisa de helmintes não era o foco inicial deste estudo. Todavia, e apesar dos poucos meios e dificuldade na obtenção de registos fotográficos, os resultados revelaram-se do maior interesse. Os registos de helmintes em gambás no Brasil são esporádicos e dispersos e também muito variáveis, pois as dinâmicas ecológicas nas diferentes regiões e biomas também são mutáveis (Silva & Costa 1999; Ribeiro et al. 2009; Antunes 2005; Silva et al. 2017; Rodrigues et al. 2017; Zabott et al. 2017, Costa-Neto et al. 2019). É, por isso, de extrema importância que se façam trabalhos como este para um maior conhecimento da ecologia local.

Em três estudos semelhantes para aferir sobre a helmintofauna de *D. albiventris* nos municípios de Pampulha (Belo Horizonte) (n=22) (Silva & Costa 1999), Pelotas e municípios circundantes (Rio Grande do Sul) (n=30) (Antunes 2005) e Palotina (Paraná) (n=9) (Zabott et al. 2017), por meio de necrópsia, a prevalência de animais parasitados foi de 100%. Noutro estudo, desta feita para avaliar a estrutura metacomunitária dos helmintes em *D. aurita* em três ambientes (periurbano, selvagem e rural) no estado do Rio de Janeiro (n=73), a prevalência de gambás parasitados foi superior a 95% (Costa-Neto et al. 2019). Em comum, estes quatro estudos têm o facto de terem sido realizados em indivíduos adultos. Na presente pesquisa, a prevalência de gambás parasitados foi de 50%, porém só um dos gambás adultos avaliados (G9) não estava parasitado, sendo importante notar que este deu entrada na AMC ainda recém-nascido. Por terem sido utilizados métodos semelhantes, nomeadamente por os helmintes terem sido obtidos por meio de necrópsia, para efeitos de discussão comparar-se-ão os resultados da presente pesquisa com os das quatro pesquisas referidas.

Todos os estudos referidos tiveram *C. tentaculata* como o helminte com maior prevalência (Silva & Costa 1999; Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019), excetuando o relativo ao município

de Palotina em que foi o terceiro helminte com maior prevalência, sendo o segundo *O. microcephalus* e o primeiro *T. turgida* (Zabott et al. 2017). A espécie com intensidade média mais alta relatada nos quatro estudos foi *C. tentaculata* (Silva & Costa 1999; Antunes 2005; Zabott et al. 2017; Costa-Neto et al. 2019). Na presente pesquisa, *Cruzia* sp. e *Strongyloides* sp. foram os nematodes com a prevalência mais elevada, correspondendo a 40% cada, sendo a intensidade média superior em *Strongyloides* sp., seguida de *Cruzia* sp. Apesar de haver registos de *Strongyloides* spp. em *Didelphis aurita* no Brasil (Fróes 1976; Bezerra-Santos et al. 2020), estes são raros. Em nenhum dos quatro estudos foi detetado *Strongyloides* sp. (Silva & Costa 1999; Antunes 2005; Zabott et al. 2017; Costa-Neto et al. 2019). A elevada prevalência (40%), intensidade média (237,0) e intensidade máxima (correspondendo a 802 no indivíduo G2) no presente estudo são, por isso, resultados extremamente interessantes. Fróes (1976), primeiro autor a registar *Strongyloides* sp. em *D. aurita* no Brasil, refere que, provavelmente, a deteção destes nematodes durante a necrópsia falha pelas suas pequenas dimensões e baixa intensidade. Apesar de a estrogiloidíase ser pouco frequente na clínica de pequenos animais, é comumente detetada em animais domésticos errantes, principalmente cães, nas cidades brasileiras (Mello et al. 1968; Fróes 1976; Labruna et al. 2006; Campos Filho et al. 2008; Ferreira et al. 2013; Vieira et al. 2014), o que se explica facilmente se se tiver em conta que as pesquisas nestes animais, que estão mais associados à transmissão direta de zoonoses, têm mais recursos para serem efetuadas do que nos animais selvagens. Posto isto, não é de estranhar a deteção de *Strongyloides* spp. nos gambás quando capturados no centro das cidades, como foi o caso de G2, fêmea adulta encontrada próxima de uma escola no centro da cidade de Jundiaí.

O terceiro nematode com maior prevalência no presente estudo foi *Trichuris* sp. Excetuando o estudo realizado em Palotina (Zabott et al. 2017), os estudos aqui comparados conseguiram diferenciar as espécies *T. minuta*, no intestino delgado (Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019), e *T. didelphis*, no intestino grosso (Silva & Costa 1999; Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019), não sendo, por isso, de estranhar que a prevalência relativa a estas espécies seja mais baixa que a relativa ao género na presente pesquisa. Nos estudos que detetaram *T. minuta* e *T. didelphis*, a prevalência e intensidade média foram mais elevadas para *T. minuta* (Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019). No presente estudo, não se efetuou a separação do intestino delgado do intestino grosso, método que poderia ter facilitado a diferenciação do género *Trichuris* em espécies.

T. turgida foi o helminte com maior prevalência no estudo referente a Palotina (89%) (Zabott et al. 2017), o segundo nos estudos referentes a Pampulha (73%) (Silva & Costa 1999) e Rio de Janeiro (75,34%) (Costa-Neto et al. 2019) e o terceiro no estudo relativo a Pelotas (70%)

(Antunes 2005), contrastando significativamente com o presente estudo em que foi o nematode com prevalência mais baixa (10%). A sua intensidade média foi relativamente baixa quando comparada com outros nematodes, tendo sido mais baixa (5,87) em Palotina (Zabott et al. 2017) e mais elevada (21,7) em Pampulha (Silva & Costa 1999). No entanto, há que considerar que se trata de um helminte de dimensão considerável (comprimento em adulto varia de 1,8 a 8 cm). No estudo referente a Pelotas (Antunes 2005), em que os achados nos diferentes gambás se encontram discriminados, é possível observar que foi comum encontrar-se um único indivíduo de *T. turgida* dentro do estômago, algo que também aconteceu no presente estudo.

Oligacanthorhynchus microcephalus foi detetado em três dos estudos (Antunes 2005; Zabott et al. 2017; Costa-Neto et al. 2019), só não sendo detetado no referente aos gambás de Pampulha (Silva & Costa 1999). A intensidade média é relativamente baixa, entre 2,71 em Palotina (Zabott et al. 2017) e 17 em Pelotas (Antunes 2005), mas deve ter-se em conta que dada a sua dimensão considerável (10 a 15 cm de comprimento em adulto), uma intensidade baixa já é significativa. Na presente pesquisa, a prevalência de *Oligacanthorhynchus* sp. foi de 10%, tendo sido detetado um único indivíduo, em G2. A sua forma típica visível a olho nu, bem como a descrição corrente deste parasita em *Didelphis* spp., não deixou margem para dúvidas, sendo difícil chegar com elevada certeza à espécie, apesar de, até à data, só serem conhecidos registos de *Oligacanthorhynchus microcephalus* em didelídeos. Nos estudos realizados em Palotina (Zabott et al. 2017) e Pelotas (Antunes 2005), a denominação deste acantocéfaló foi de *Hama-niella microcephala*. Até há pouco tempo, esta era a designação das formas larvares de *O. microcephalus*, por se acreditar que estas e as formas adultas pertenciam a espécies diferentes (Richardson et al. 2014). De facto, *O. microcephalus* ainda carece de conhecimento, sendo a sua caracterização unicamente morfológica, ao contrário de outros acantocéfalos como *Gigan-torhynchus* spp., que também já estão caracterizados geneticamente (Gomes et al. 2019).

Indivíduos da classe Cestoda foram detetados no estudo realizado em Pelotas (Antunes 2005) e no Rio de Janeiro (Costa-Neto et al. 2019), só tendo sido distinguida a família Diphyllbothriidae no estudo relativo a Pelotas (Antunes 2005), com prevalência de 13,33% e intensidade média de 6,25 (Antunes 2005). No estudo no Rio de Janeiro, a prevalência de Cestoda foi de 1,36% e a intensidade média igual a 4 (Costa-Neto et al. 2019). No presente estudo, a identificação dos cestodes não foi possível pela deformação de estruturas importantes para a identificação taxonómica, nomeadamente o escólex. Os espécimes de Cestoda tiveram uma prevalência de 40%, o que contrasta significativamente com os estudos referidos, e intensidade média de 2,0.

Apesar de não ter sido detetado neste estudo, foi comum aos quatro estudos comparativos encontrar-se o trematode *Rhopalias coronatus* no intestino delgado (Silva & Costa 1999;

Antunes 2005; Zabott et al. 2017; Costa-Neto et al. 2019) e os nematodes *Aspidodera* sp. (Zabott et al. 2017) e *Aspidodera raillieti* no intestino grosso (Silva & Costa 1999; Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019).

Como animais sinantrópicos e adaptáveis ao meio em que vivem, os gambás revelam-se sentinelas do que se passa nos ecossistemas em que habitam e na relação entre a natureza e a cidade (Rodrigues et al. 2017). Crê-se ser a primeira vez que há registo de um estudo com pesquisa de helmintes em gambás no município de Jundiá e municípios circundantes.

Os gambás sujeitos à pesquisa helmintológica foram capturados fragilizados em área urbana e periurbana, tendo vindo a morrer na AMC. A técnica para pesquisa de helmintes por meio de necrópsia, supradescrita em **5. Material e métodos**, ao ser realizada na própria AMC evitaria as alterações morfológicas decorrentes das múltiplas congelações e descongelações, até ao seu processamento, tornando-se uma mais valia para o conhecimento dos parasitas que afetam as diferentes espécies animais que a AMC alberga e para o conhecimento da dinâmica ecológica da região.

Esta pesquisa teria ganho, também, com uma correta aplicação de técnicas de sedimentação e flutuação qualitativas e técnicas quantitativas de McMaster nas fezes dos gambás dos recintos de reabilitação, não só para aumentar o conhecimento sobre a helmintofauna na área da AMC, como também para detetar protozoários gastrointestinais (como coccídias) (Modrý et al. 2012; Zajac and Conboy 2012).

A AMC possui meios para realizar coprologias aos animais do CRAS, no entanto a carga diária despendida no tratamento dos animais e manutenção dos recintos, dificulta tornar estas coprologias rotineiras. A título de exemplo, no período em que a autora realizou o seu estágio curricular, só viu serem realizadas coprologias para deteção de parasitismo gastrointestinal nos recintos dos jaguares e só participou na desparasitação interna uma vez, num recinto de passeriformes, após muitas aves aparecerem mortas com suspeita de parasitismo gastrointestinal.

Dos gambás encontrados parasitados, G2, fêmea adulta proveniente da cidade de Jundiá, apresentava uma carga parasitária bastante elevada, podendo esta ter sido uma das causas da sua caquexia e estado geral fragilizado que a levou à morte.

Embora não se tenha conseguido identificar a maioria dos helmintes até ao nível de espécie, a verdade é que, dos géneros encontrados, dois possuem espécies zoonóticas com relevância no Brasil: *Strongyloides stercoralis*, agente da estrogiloidíase (CDC 2019b) e *Trichuris trichiura*, agente da tricuriase (CDC 2017b). A acrescentar a isto, não é de descurar a possibilidade de algum(ns) dos cestodes de que não foi possível uma maior identificação taxonómica, pertencerem a alguma espécie zoonótica, como é o caso de *Rodentolepis nana*, agente da

himenolepíase (CDC 2017a) que já foi documentada em *D. albiventris* numa área de fragmentação florestal no noroeste do Paraná (Rodrigues et al. 2017).

Deve ainda ter-se em consideração a possibilidade de aparecimento de zoonoses emergentes, incluindo helmintoses, já que a propagação de agentes patogénicos e o seu risco de transmissão têm acelerado com as recentes mudanças antropogénicas da utilização das terras (LUC), tais como desflorestação, urbanização e intensificação agrícola, que, entre outras consequências, aproxima os animais selvagens da espécie humana (White and Razgour 2020). Esta ideia reforça a necessidade de manter uma vigilância das espécies reservatório, utilizando métodos de deteção de agentes patogénicos. Para o efeito, é comum a colocação de armadilhas para captura destes animais nos seus habitats para obtenção de amostras no local, transporte para laboratório e, por vezes, eutanásia para colheita de amostras durante a necrópsia (Antunes 2005; Costa-Neto et al. 2019). A colheita de amostras em animais encontrados mortos (Rodrigues et al. 2017; Zabott et al. 2017) e nos que chegam fragilizados aos CETAS e CRAS diminuem a interferência na vida dos animais quando estão livres e saudáveis, sendo, por isso, métodos preferíveis para a obtenção destas amostras.

Aquando da realização das necrópsias na AMC, efetuar a técnica descrita para pesquisa de helmintes em **5. Material e métodos**, seria uma mais valia para dar continuidade ao presente estudo e para poder conhecer melhor os helmintes presentes na região, tanto em gambás como noutros animais. No entanto, deve ter-se em consideração que, contrariamente ao que foi realizado neste estudo, se deve separar o intestino grosso do intestino delgado.

Os tratadores estão expostos ao material fecal dos animais e, pelo potencial zoonótico de alguns parasitas, o reforço em Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) é aconselhável. Para além disso, o transporte de fómites (ancinho, carrinho de mão, balde, calçado, entre outros) de um recinto para outro, aquando da sua limpeza, potencia a dispersão parasitária pelos animais dos diferentes recintos da AMC.

A desparasitação interna de todos os animais do CRAS não é praticável no contexto da AMC, nem desejável em animais pouco parasitados, numa perspetiva de promoção do equilíbrio ecológico entre o parasita e o hospedeiro. Contudo, nos casos clínicos com sinais de diarreia, anemia ou mau-estado geral evidente, a desparasitação poderá ser vantajosa na recuperação destes animais. Outra situação em que deve ser considerada, é nos animais em cativeiro sem perspetiva de libertação (Bomon 2018).

A desparasitação interna aquando da libertação dos animais é controversa. Por um lado, do ponto de vista biológico é muito provável que o animal se volte a parasitar na natureza, podendo a libertação do animal com baixas cargas parasitárias, que conferem certos níveis de

imunidade, beneficiar o animal (Bomon 2018). Por outro lado, quando a libertação dos animais é efetuada longe do local de captura, a translocação de parasitas para uma área onde estes não existem pode ser um problema, constituindo esta uma razão para se recomendar a desparasitação interna destes animais (Miller 2012). Deve ainda ter-se em conta que o ato da libertação é por si só stressante para o animal, pelo que a eliminação de parasitas pré-existentes pode beneficiá-lo (Bomon 2018). Idealmente, todos os animais seriam submetidos a testes de diagnóstico parasitológico antes do tratamento (Miller 2012). Posto isto, no caso da AMC, onde é impossível saber a proveniência dos gambás presentes nos recintos, e considerando que recebe animais de mais de 140 municípios, a desparasitação interna é fortemente aconselhada antes da libertação dos animais, sendo a administração juntamente com a comida a mais indicada para evitar o stress dos animais neste contexto. Contudo, quando a administração é realizada por esta via não é possível saber se os animais consumiram a quantidade exata do fármaco. Desta forma, para garantir que os animais estão devidamente desparasitados e para se evitarem resistências, os animais devem ser testados por métodos coprológicos para verificar a eficácia da desparasitação antes da libertação (Bomon 2018).

Por não ser rotina aplicar técnicas coprológicas de deteção de parasitas na clínica, aconselha-se, no caso de darem entrada gambás com os sinais clínicos indicativos de debilidade acima descritos, a desparasitação conforme descrito na **página 37** nas doses mais baixas, uma vez que no caso de o animal estar intensamente parasitado, pode ocorrer obstrução intestinal de difícil reversão (Jones 2013). Contrariamente ao que acontece com os animais alojados nos recintos de reabilitação, no contexto clínico, a administração parenteral é praticável em gambás, pelo que, respeitando devidamente o período de administração e as dosagens dos fármacos, a desparasitação, neste caso, será provavelmente mais efetiva e menos propensa à criação de resistências.

8. Conclusão

Os objetivos propostos para esta dissertação foram cumpridos parcialmente, uma vez que nem todas as amostras colhidas para a realização de RCP puderam ser processadas. Os resultados negativos na pesquisa de *T. cruzi* não são significativos do que poderá ser a prevalência deste protozoário em gambás nos municípios de Jundiá e circundantes.

Quanto à pesquisa de helmintos, dos 10 gambás analisados, 5 foram positivos, reforçando a importância de procurar os parasitas gastrointestinais nos animais que dão entrada na AMC e/ou administrar desparasitantes com eficácia comprovada na espécie/gênero àqueles animais que possuem sinais clínicos de debilidade evidentes como mucosas pálidas, caquexia, prostração, diarreia, melena, entre outros.

As principais causas de entrada dos gambás nos centros de recuperação são os atropelamentos e os ataques por animais domésticos. Porém, também são comumente mortos por serem considerados invasores das cidades e, muitas vezes, confundidos com ratas e ratos. Como referido neste trabalho, os gambás são importantes agentes dispersores de sementes, controladores de pragas (alimentam-se de pequenos mamíferos e artrópodes, mantendo, por exemplo, pequenos roedores, baratas e carraças afastados), controladores de animais peçonhentos (ao alimentarem-se de cobras venenosas e escorpiões) e são animais de comportamento inofensivo. São também uma importante fonte alimentar para *Leopardus spp.* por toda a América Latina. É, por isso, fulcral a consciencialização da população para a importância ecológica dos gambás de modo a reduzir-se o preconceito existente, respeitar a sua presença e ajudar a prevenir os ataques por animais domésticos.

Para além da relevância dos gambás como agentes ecológicos, este trabalho também pretendeu reforçar a importância de, no contexto *One Health*, não descuidar o potencial dos centros de recuperação e conservação em obter informação que, devidamente cruzada entre as várias entidades que estudam e garantem o controlo da sanidade no contexto da medicina humana e veterinária, poderá favorecer o conhecimento que permitirá minimizar e/ou prevenir a propagação de doenças zoonóticas.

Este trabalho reforça, ainda, e tomando como exemplo a Associação Mata Ciliar, a importância da medicina da conservação, dos CRAS e da educação ambiental, não só na preservação da fauna selvagem e silvestre, como também na tomada de consciência de que a gradual destruição e fragmentação dos habitats destes animais resulta num desequilíbrio ecológico que, de forma direta ou indireta, afeta a espécie humana. Afinal, preservar a natureza também é sobre preservar a nossa própria espécie.

9. Bibliografia

- Amin OM. 2013. Classification of the acanthocephala. *Folia Parasitol (Praha)*. 60(4):273–305. doi:10.14411/fp.2013.031.
- Antunes GM. 2005. Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia:Didelphidae). *Acta Sci Vet*. 33(3):335. doi:10.22456/1679-9216.15012.
- Austad SN. 1988. The Adaptable Opossum. *Sci Am*. 258(2):98–104.
- Barretto MP. 1967. Estudos sôbre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*: XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da tripanossomose americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1(2):23–36. doi:10.1590/s0037-86821967000200002.
- Bezerra-Santos MA, Fontes CS, Nogueira BCF, Yamatogi RS, Ramos RAN, Galhardo JA, Furtado LFV, Rabelo ÉML, de Araújo JV, Campos AK. 2020. Gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis aurita*: Are they a potential threat to human health? *J Parasit Dis*. 44(2):355–363. doi:10.1007/s12639-020-01205-9.
- Bomon M. 2018. Management of gastrointestinal parasites in wildlife rehabilitation centers in Brazil [dissertação de mestrado]. Univ Lisboa.
- Bronfen E, Rocha FS de A, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. 1989. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 84(2):237–240. doi:10.1590/s0074-02761989000200012.
- Cáceres N. 2002. Food Habits and Seed Dispersal by the White-Eared Opossum, *Didelphis albiventris*, in Southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ*. 37(2):97–104.
- Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA. 2001. Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ*. 36(2):85–92. doi:10.1076/snfe.36.2.85.2138.
- Campos Filho PC, Barros LM, Campos JO, Braga VB, Cazorla IM, Albuquerque GR, Carvalho SMS. 2008. Parasitas zoonóticos em fezes de cães em praças públicas do município de Itabuna, Bahia, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 17(4):206–209. doi:10.1590/s1984-29612008000400007.
- Cardia DFF, Camossi LG, Fornazari F, Babboni SD, Teixeira CR, Bresciani KDS. 2016. First report of *Strongyloides* sp. (Nematoda, Strongyloididae) in *Lutreolina crassicaudata* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Brazilian J Biol*. 76. https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842016000400884.
- Carvalho TU, Barrias E. 2017. Mecanismo de Interação: Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão [internet]. Programa Biofísica, Inst Biofísica Carlos Chagas Filho, Univ Fed do Rio Janeiro. [acedido 2020 Set 1]. <http://chagas.fiocruz.br/interacao/>.
- Castro GA. 1996. Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. Em: S. B,

- editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2017a. Hymenolepiasis [internet]. [acedido 2020 Mai 5]. <https://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2017b. Parasites - Trichuriasis (also known as Whipworm Infection) [internet]. [acedido 2020 Jul 7]. <https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019a. American Trypanosomiasis [internet]. [acedido 2020 Jul 15]. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019b. Strongyloidiasis [internet]. [acedido 2020 Jun 14]. <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2020a. Parasites - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness) [internet]. [acedido 2020 Set 20]. <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/index.html>.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2020b. Parasites - Diphyllbothrium Infection [internet]. [acedido 2020 Mai 10]. <https://www.cdc.gov/parasites/diphyllbothrium/biology.html>.
- Chagas C. 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1(2):159–218. doi:10.1590/s0074-02761909000200008.
- Chagas C. 1912. Sobre um Trypanosoma do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* Latr (1811). Possibilidade de ser o tatu um depósito de *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota prévia. Brazil-Médico. 26:305–306.
- Costa-Neto SF, Cardoso TS, Boullosa RG, Jr AM, Gentile R. 2019. Metacommunity structure of the helminths of the black-eared opossum *Didelphis aurita* in peri-urban, sylvatic and rural environments in south-eastern Brazil. J Helminthol. 93:720–731.
- Costa LP, Moraes DA, Brito D, Soriano D. 2015. *Didelphis albiventris*, White-eared Opossum. IUCN Red List Threat Species. 8235.
- Coura JR, Dias JCP. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(SUPPL. 1):31–40. doi:10.1590/S0074-02762009000900006.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen-Franken AM. 1986. Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. Parasitol Today. 2(5):146–147. doi:10.1016/0169-4758(86)90181-X.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 79(4):513–515. doi:10.1590/S0074-02761984000400021.

- Dias E. 1940. Técnica do Xenodiagnóstico na Moléstia de Chagas.pdf. Mem Inst Oswaldo Cruz. 35(2):335–342.
- Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, Torres RM, Melo JR da C, Almeida EA de, Oliveira W de, et al. 2016. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras. 25:7–86. doi:10.5123/S1679-49742016000500002.
- Dicio [internet]. 2020. [acedido 2020 Ago 10]. <https://www.dicio.com.br/gamba/>.
- Euronews. 2020 Out 28. Aumento de animais selvagens salvos em São Paulo. <https://pt.euronews.com/2020/10/28/aumento-de-animais-selvagens-salvos-em-sao-paulo>.
- Fernandas O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret T V., et al. 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 95(1):97–99. doi:10.1016/S0035-9203(01)90350-5.
- Fernandes A, Chiari E, Chiari C. 1990. Diagnóstico da infecção por *Trypanosoma cruzi* em gambás, naturalmente infetados, pela Reação de Imunofluorescência Indireta. 23(3):157–161.
- Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JCP, Romanha ÁJ. 1991. The Importance of the Opossum (*Didelphis albiventris*) as a Reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais. Mem Inst Oswaldo Cruz. 86(1):81–85.
- Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JC, Romanha AJ, Chiari E. 1989. Infecção natural das glândulas anais de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí-MG. Mem Inst Oswaldo Cruz. 84(1):87–93. doi:10.1590/s0074-02761989000100016.
- Ferreira FP, Ferreira Dias RC, Martins TA, Constantino C, Pasquali AKS, Vidotto O, Freire RL, Navarro IT. 2013. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. Semin Agrar. 34(6 SUPPL. 2):3851–3858. doi:10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3851.
- Ferreira IDLM, Silva TPTE. 2006. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: An historical fact. Rev Soc Bras Med Trop. 39(5):507–509. doi:10.1590/S0037-86822006000500018.
- Forattini OP. 2006. [Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. Revista de Saúde Pública, 14(3):265-99, 1980]. Rev Saude Publica. 40(6):964–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173153>.
- Forattini OP, Rocha e Silva EO, Ferreira OA, Rabello EX, Pattoli DG. 1971. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. 3. Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. Rev Saude Publica. 5(2):193–205. doi:10.1590/S0034-89101971000200002.
- Freitas Santos R. 2008. Caracterização e Avaliação da Atividade Ectonucleotidásica do

- Trypanosoma cruzi e sua Relação com a Infectividade in vitro. Universidade Federal de Ouro Preto.
- Fróes OM. 1976. Novos registros para a fauna parasitária do Rio Grande do Sul. An Fac Med Porto Alegre. 2:23–26.
- Gomes APN. 2019. MORPHOLOGICAL , MOLECULAR AND ECOLOGICAL INTEGRATIVE TAXONOMY OF ACANTHOCEPHALA (ARCHIACANTHOCEPHALA) PARASITE OF BRAZILIAN WILDLIFE MAMMALS ANA PAULA NASCIMENTO GOMES Rio de Janeiro Maio de 2019 INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Instituição Oswaldo Cruz.
- Gomes APN, Cesário CS, Olifiers N, de Cassia Bianchi R, Maldonado A, Vilela R do V. 2019. New morphological and genetic data of Gigantorhynchus echinodiscus (Diesing, 1851) (Acanthocephala: Archiacanthocephala) in the giant anteater Myrmecophaga tridactyla Linnaeus, 1758 (Pilosa: Myrmecophagidae). Int J Parasitol Parasites Wildl. 10(September):281–288. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.09.008.
- Gonçalves NN, Maçaneres CAF, Miglino MA, Samoto VY, Martins D dos S, Ambrósio CE, Ferraz RH dos S, de Carvalho AF. 2009. Aspectos morfológicos dos órgãos genitais femininos do gambá (Didelphis sp.). Brazilian J Vet Res Anim Sci. 46(4):332–338. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26782.
- Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. 1988. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation. Exp Parasitol. 66(2):205–212.
- Gray JB, Anderson RC. 1982. Observations on Turgida turgida (Rudolphi, 1819) (Nematoda: Physalopteroidea) in the American opossum (Didelphis virginiana). J Wildl Dis. 18(3):279–285.
- Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, Romanha AJ. 1999. Characterization of Trypanosoma rangeli Strains Isolated in Central and South America: An Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(2):203–209. doi:10.1590/S0074-02761999000200015.
- Humberg RMP, Tavares LER, Paiva F, Oshiro ET, Bonamigo RA, T. Júnior N, Oliveira AG. 2011. Turgida turgida (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in white-bellied opossum, Didelphis albiventris (Marsupialia: Didelphidae), state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Pesqui Veterinária Bras. 31(1):78–80. doi:10.1590/s0100-736x2011000100012.
- Jansen-Franken AM. 2017. Trypanosoma cruzi em gambás: infecções experimentais [internet]. Laboratório Biol Tripanossomatídeos, Inst Oswaldo Cruz/ Fiocruz. [accedido 2020 Mai 15]. <http://chagas.fiocruz.br/reservatorios-cativeiro/>.
- Jansen AM, Books S, Livros S, Scielo /, Andrade L. 2002. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas A FAMÍLIA DIDELPHIDAE: O GAMBÁ DIDELPHIS MARSUPIALIS. Ed Fiocruz.:388.
- Jansen AM, Cristina S, Roque ALR. 2020. Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. 10(February):1–15. doi:10.3389/fcimb.2020.00010.
- Jansen AM, Moriearty LP, Galvão CB, Deane MP. 1985. Trypanosoma cruzi in the opossum

- didelphis marsupialis: An indirect fluorescent antibody test for the diagnosis and follow up of natural and experimental infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79(4):474–477. doi:10.1016/0035-9203(85)90069-0.
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. 2018. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors.* 11(1):1–25. doi:10.1186/s13071-018-3067-2.
- Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. 2015. Wildlife parasites in a One Health world. *Trends Parasitol.* 31(5):174–180. doi:10.1016/j.pt.2015.01.002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.01.002>.
- Jones KD. 2013. Opossum Nematodiasis: Diagnosis and Treatment of Stomach, Intestine, and Lung Nematodes in the Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*). *J Exot Pet Med.* 22(4):375–382.
- Keesing F, Brunner J, Duerr S, Killilea M, LoGiudice K, Schmidt K, Vuong H, Ostfeld RS. 2009. Hosts as ecological traps for the vector of Lyme disease. *Proc R Soc B Biol Sci.* 276:3911–3919. <https://www.caryinstitute.org/news-insights/hosts-ecological-traps-vector-lyme-disease-journal-article>.
- Kennedy CR. 2006. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kierszenbaum AF, Gottlieb CA, Budzko DB. 2015. ANTIBODY-INDEPENDENT, NATURAL RESISTANCE OF BIRDS TO TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION. 67(5):656–660.
- Knupp L. 2019 Out 6. Associação Mata Ciliar resgata e reabilita animais silvestres da região. Trib Jundiaí. <https://tribunadejundiai.com.br/mais/meio-ambiente/associacao-mata-ciliar-resgata-e-reabilita-animais-silvestres-da-regiao/>.
- Labruna MB, Pinter A, Gennari SM. 2006. PARASITAS ZOONÓTICOS EM FEZES DE CÃES EM PRAÇAS PÚBLICAS DO MUNICÍPIO DE ITABUNA, BAHIA, BRASIL. :183–193.
- Lainson R. 2010. Espécies neotropicais de Leishmania : uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. 1(2):13–32. doi:10.5123/S2176-62232010000200002.
- Lopes EG, Geraldo Junior CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, Oliveira TMF da S, Soares RM. 2016. Performance of conventional pcrs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of leishmania spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 58(1). doi:10.1590/S1678-9946201658041.
- Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D’Affonseca Neto JA, Naiff MF, Franco AMR, Campaner M, Valente V, Valente SA, et al. 2008. Infection rates and genotypes of Trypanosoma rangeli and T. cruzi infecting free-ranging Saguinus bicolor (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop.* 107(2):168–173. doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.015.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VLB, Teixeira MMG. 2009. A new genotype of Trypanosoma cruzi associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 136(6):641–

655. doi:10.1017/S0031182009005861.
- Margolis L, Esch GW, Holmes JC. 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American society of parasitologists). *J Parasitol.* 68(1):131–133. doi:10.2307/3281335.
- Mello EDBF de, Campos MS de, Maugê GDC. 1968. Incidência da estrogiloidiase em cães da cidade de São Paulo. *Rev da Fac Med Veterinária, Univ São Paulo.* 7(4):851. doi:10.11606/issn.2318-5066.v7i4p851-856.
- Miller EA. 2012. MINIMUM STANDARDS FOR WILDLIFE REHABILITATION. 4.^a. NWRA, IWRC, editores.
- Ministério da Saúde. 2009. Cadernos de Atenção Básica - Vigilância em Saúde: Zoonoses. 1.^a. Ministério da Saúde, editor. Brasília.
- Ministério da Saúde. 2020. Situação epidemiológica - Doença de Chagas [internet]. [acedido 2020 Abr 7]. <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>.
- Modrý D, Hofmannová L, Mihalca AD, Juránková J, Neumayerová H, D'Amico G. 2012. FIELD AND LABORATORY DIAGNOSTICS OF DISEASES OF PARASITIC ANIMALS : FROM SAMPLING TO DIAGNOSIS. Brno: Universidade de Ciências Veterinárias e Farmacêuticas de Brno.
- Monteiro SRD. 2010. Participação dos gambás na epidemiologia da Leishmaniose da Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. 2011. O controle da transmissão transfusional. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(SUPPL. 2):64–67. doi:10.1590/S0037-86822011000800010.
- Moraes DA de, de la Sancha N, Costa L. 2015. *Didelphis aurita* , Brazilian Common Opossum. 8235.
- Murillo-Godínez G. 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Med Interna Mex.* 34(6):959–970. doi:10.24245/mim.v34i6.2217.
- Nascimento CC, Horta MC. 2014. Capítulo 32. Em: Roca, editor. *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária.* 2.^a. São Paulo.
- National Center for Biotechnology Information. 2020. Taxonomy Browser [internet]. [acedido 2020 Set 30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
- Neves MF, Bignard JMP, Sant'ana TM, Monteiro MEZ, Bottari F. 2011. Doença de Chagas em cães. *Rev científica eletrônica Med veterinária.* 6:11–15.
- Nichelason A, Rejmanek D, Dabritz H. 2008. Evaluation of *Cruzia americana*, *Turgida turgida* and *Didelphostrongylus hayesi* infection in the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) and risk factors along the California coast. *Parasitology.* 94(5):1166–1168.
- Opossum Society of the United States. 2018. Basic Opossum Care. Opossum Society of the

- United States. <https://www.opossumsocietyus.org>.
- Organização Mundial de Saúde. 2020. Chagas disease (American trypanosomiasis) [internet]. [accedido 2020 Abr 6]. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>.
- Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, et al. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. (2ª Edição/2nd Edition). http://www.conservation.org/global/brasil/publicacoes/Documents/annotated_checklist_of_brazilian_mammals_2nd_edition.pdf.
- Paraguassu R, Rodrigues DS, Sanches MP, Lorrayne L, Angélica M, Barbosa S, Araújo JR, Pessoa GT. 2016. Análise epidemiológica , clínica e patológica da tripanossomíase “ Mal das Cadeiras ” Epidemiological , clinical and pathological trypanosomiasis “ Mal das Cadeiras ” analysis of. Publicações em Med Veterinária e Zootec. 10(2):118–124. doi:10.22256. <http://www.pubvet.com.br/uploads/bf9470a450139ff4a0d26971b85efbe2.pdf>.
- Pech RAA, Ruiz-Piña H, Vivas RIR, Cuxim-Koyoc AD, Reyes-Novelo E. 2018. Prevalence, Abundance and Intensity of Eggs and Oocysts of Gastrointestinal Parasites in the Opossum *Didelphis Virginiana* Kerr, 1792 in Yucatan, Mexico. *Helminthologia*. 55(2).
- Perales J, Amorim CZ, Rocha SLG, Domont GB, Moussatché H. 1992. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops Jararaca* venom on the mouse paw by an antithrotopropic fraction isolated from Opossum (*Didelphis Marsupialis*) serum. *Agents Actions*. 37(3–4):250–259. doi:10.1007/BF02028117.
- Perales J, Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Domont GB. 2005. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon*. 45:1013–1020.
- Pinto RM, Knoff M, Gomes DC, Noronha D. 2011. NEMATODOS DE MAMÍFEROS DE BRASIL: UNA ACTUALIZACIÓN. 5(2).
- Rabelo LP, Veira MJC. 2017. Gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) como predador natural do caracol-africano (*Achatina fulica*). Instituto Federal de Barbacena.
- Ribeiro VDO, Siqueira DB, Aléssio FM, Fernanda M, Marvulo V, Mauffrey J, Alves LC, Karolina M, Galindo F, Sercundes MK. 2009. PESQUISA DE ENDOPARASITAS EM FEZES DE GAMBÁS DO GÊNERO DIDELPHIS NA MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO. :10–12.
- Richardson DJ. 2006. . Life cycle of *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Oligacanthorhynchidae), an acanthocephalan of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Comp Parasitol*. 73:1–6.
- Richardson DJ, Gardner SL, Allen JW. 2014. Redescription of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt 1972 (syn. *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) Schmidt 1972) (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae). *Comp Parasitol*. 81(1):53–60. doi:10.1654/4673.1.
- Rocha SLG, Lomonte B, Neves-Ferreira AGC, Trugilho M, Junqueira-de-Azevedo I de LM, Ho PL, Domont GB, Gutiérrez JM, Perales and J. 2002. Functional analysis of DM64, an

- antimytotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur J Biochem.* 269:6052–6062.
- Rodrigues AFC, Lizama MLAP, Emanuelli, Isabele Picada Yamaguchi NU, Paccola EASP. 2017. Endoparasitas intestinais em mamíferos silvestres nos fragmentos de floresta urbana. :530–543. doi:10.18677/EnciBio.
- Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW. 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol.* 134:349–362.
- Rondon MVSS. 2010. Biodiversity of intestinal parasites in wild mammals from two locations of São Paulo States.
- Roque ALR., Jansen AM. 2014. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: *Zoologia: guias e manuais de identificação.* :75–87.
- Santiago ME. 2007. Investigação de *Leishmania* sp. em *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo [dissertação de mestrado]. Araçatuba: UNESP.
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, et al. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford).*(2):1–21. doi:10.1093/database/baaa062.
- Schwabl P, Imamura H, Van den Broeck F, Costales JA, Maignashca-Sánchez J, Miles MA, Andersson B, Grijalva MJ, Llewellyn MS. 2019. Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nat Commun.* 10(1). doi:10.1038/s41467-019-11771-z. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11771-z>.
- Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Wisnivesky-Colli C. 1995. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to *Trypanosoma cruzi* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90(6):679–682. doi:10.1590/S0074-02761995000600003.
- [SVS] Secretaria de Vigilância em Saúde M da S. 2019. Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 50.
- SIBBr. 2020. Sistema de Informação sobre a Fauna Brasileira [internet]. [acesso 2020 Mai 15]. <https://sibbr.gov.br/>.
- Silva MDE, Lima SSV, Borges GCJ, Porto NJW. 2017. Ocorrência de parasitas gastrointestinais zoonóticos em uma população de *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) de uma área urbana no nordeste do Brasil. *Rev Electron Vet.* 18(9).
- Silva MDGQ, Costa HMA. 1999. Helminths of White-bellied Opossum from Brazil. *J Wildl Dis.* 35(2):371–374. doi:10.7589/0090-3558-35.2.371.
- Silva RA. 2019. Estado atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no estado de São Paulo / Current state of the entomological surveillance of Chagas' disease in the state of São Paulo. *Brazilian J Heal Rev.* 2(2):742–755.

- <http://brjd.com.br/index.php/BJHR/article/view/1210/1071>.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 83(2):141–152. doi:10.1016/S0166-6851(96)02755-7.
- Souza-Dantas LM, Bastos OPM, Brener B, Salomão M, Guerrero J, Labarthe NV. 2007. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintos gastrintestinais de gatos domésticos. *Ciência Rural.* 37(3):904–906. doi:10.1590/s0103-84782007000300051.
- Souza AC, Álvares EF, Reis SS, Neves AS, Barino GTM, Silva ME, Rocha VN, Junior JLR, Magno da Silva S, Ribeiro RR. 2017. First Report of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) in *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) (Marsupialia: Didelphidae) in Southeastern Brazil. *J Dairy, Vet Anim Res.* 5(3):3–6. doi:10.15406/jdvar.2017.05.00143.
- Souza W, Vidal J. 2017. Taxonomia Morfológica - Métodos Morfológicos [internet]. Portal da Doença Chagas. [acesso 2020 Mai 10]. <http://chagas.fiocruz.br/taxonomia/>.
- Travassos L. 1922. Contribuição para o estudo da fauna helmintológica brasileira -XVI. *Cruzia tentaculata*.
- Travassos L. 1950. Capítulo 11 - ACANTHOCEPHALA. Em: Instituto Internacional de Ecologia, editor. *Introdução ao Estudo da Helminologia*. p. 150–156.
- Tyler KM, Engman DM. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31(5–6):472–481. doi:10.1016/S0020-7519(01)00153-9.
- Urdaneta-Morales S, Nironi I. 1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. Isolation and experimental infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 91(4):399–403. doi:10.1590/S0074-02761996000400002.
- Utida M. 2020 Set 9. Em uma semana, Mata Ciliar recebe 153 animais silvestres debilitados. *Trib Jundiaí*. <https://tribunadejundiai.com.br/cidades/jundiai/em-uma-semana-mata-ciliar-recebe-153-animais-silvestres-debilitados/>.
- Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM. 1999. NEMATÓIDES DO BRASIL.
- Vieira JF, Pinto CF, Ferreira N, Krause PPC, Chaves RN. 2014. Estrongiloidíase em um cão - relato de caso. *Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zotec do CRMV-SP.* 12(2):53.
- Viney ME, Lok JB. 2015. The biology of *Strongyloides* spp. *WormBook*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19795/>.
- Wanderley DMV, Silva RA, Carvalho ME, Barbosa GL. 2007. Doença de Chagas: a vigilância entomológica no Estado de São Paulo. *Bol Epidemiológico Paul.* 4:8–12.
- White RJ, Razgour O. 2020. Emerging zoonotic diseases originating in mammals: a systematic review of effects of anthropogenic land-use change. *Mamm Rev.* 50(4):336–352. doi:10.1111/mam.12201.

- Yale Peabody Museum of Natural History. 2018a. *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) [internet]. [acedido 2020 Mai 16]. <https://collections.peabody.yale.edu/search/Record/YPM-IZ-095270>.
- Yale Peabody Museum of Natural History. 2018b. *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) [internet]. [acedido 2020 Jun 30]. <https://collections.peabody.yale.edu/search/Record/YPM-IZ-068146>.
- Zabott MV, Pinto SB, Viott A de M, Gruchouskei L, Bittencourt LHF de B. 2017. HELMINTOFAUNA DE *Didelphis albiventris* (LUND, 1841) NO MUNICÍPIO DE PALOTINA, PARANÁ, BRASIL. :19–22.
- Zajac A, Conboy G. 2012. Fecal Examination for the Diagnosis of Parasitism. Em: American Association of Veterinary Parasitologists, editor. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8.^a ed. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo A, Machado C, et al. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(7):1051–1054.

Anexos

Anexo 1 – Exemplos de gambás e das suas características anatómicas distintas

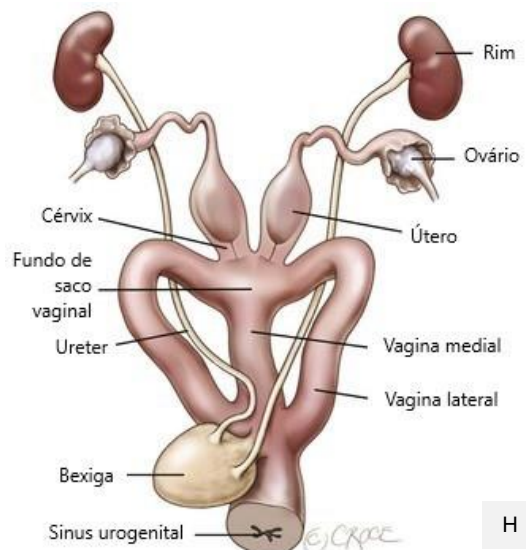


Os gambás possuem uma cauda longa e preênsil, que lhes confere uma maior agilidade quando se deslocam entre os ramos das árvores, e uma caixa craniana pequena, abrigando um cérebro pequeno e simples se comparado com o dos mamíferos placentários de tamanho semelhante (Nascimento & Horta 2014). (A) Indivíduo jovem de *Didelphis aurita*; (B) Indivíduos jovens de

Didelphis albiventris; (C) Indivíduo adulto de *D. albiventris* (fonte: Rafael Oliveira, AMC); (D) Fêmea de *Didelphis virginiana* com crias no seu marsúpio (fonte: Wild at Heart Rescue).



Os indivíduos pertencentes à família Didelphidae apresentam ossos epipúbicos, que os distinguem de outros mamíferos. Estes ossos projetam-se anteriormente aos ossos pélvicos e à musculatura ventral abdominal. Os músculos oblíquos internos e externos encontram-se aderentes a eles. Acredita-se que uma das suas funções seja a proteção do marsúpio contra pressões externas (Nascimento & Horta 2014). Nas imagens acima, é possível observar os ossos epipúbicos de *D. aurita* (E) num plano ventrodorsal e (F) num plano laterolateral (idem) (autora das imagens: Adriana Joppert). Em (G) é possível observar o pênis bifurcado de *D. aurita*, caudalmente à bolsa escrotal (idem) (autora da imagem: Cláudia Nascimento) e em (H) pode ser observado o aparelho reprodutor feminino marsupial (adaptado da ilustração de Beth Croce, disponível em <https://veteriankey.com/marsupialia-marsupials/> [acesso a 10 Mai, 2020]).



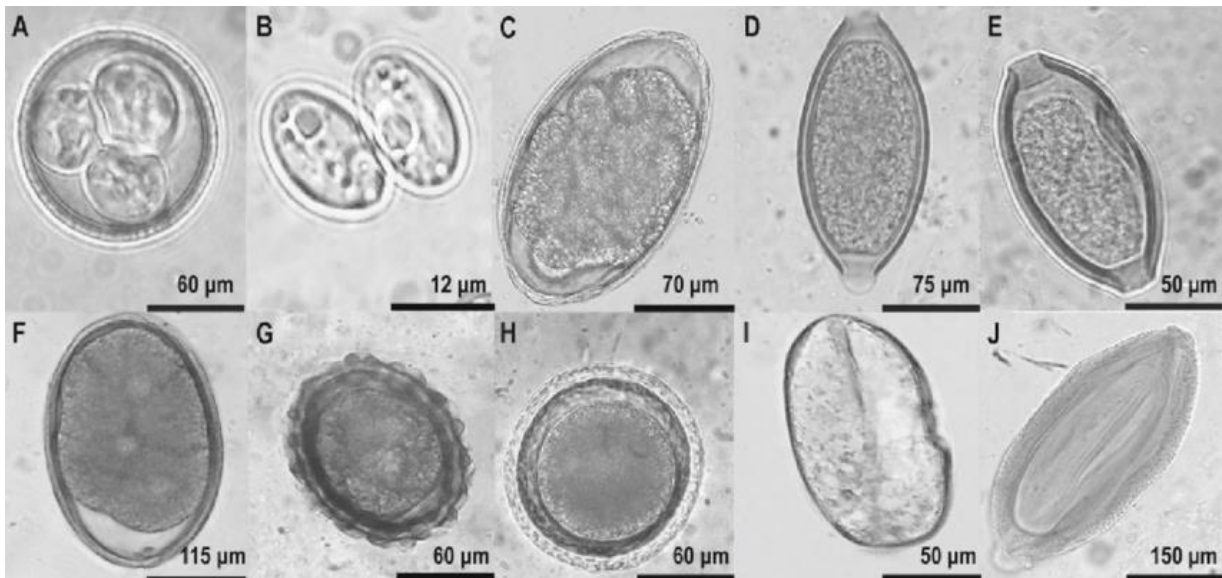
Anexo 3 - Gêneros de nematodes encontrados em *Didelphis* spp. no Brasil

A tabela seguinte agrupa os gêneros de nematodes encontrados em *Didelphis* spp., no Brasil, segundo Vicente et al. (1999) e Pinto et al. (2011). A classificação taxonômica foi realizada segundo *Taxonomy Browser* (Schoch et al. 2020) .

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Nematoda	Chromadorea	Strongylida	Angiostrongylidae	<i>Heterostrongylus</i>
			Heligmosomidae	<i>Longistriata</i>
			Metastrongylidae	<i>Metastrongylus</i>
			Syngamidae	<i>Mammomonogamus</i>
			Trichostrongylidae	<i>Nematodirus</i>
			Viannaiidae	<i>Travassostrongylus</i>
		<i>Viannaia</i>		
		Rhabditida	Ascarididae	<i>Lagochilascaris</i>
			Aspidoderidae	<i>Aspidodera</i>
			Dracunculidae	<i>Dracunculus</i>
			Gnathostomatidae	<i>Gnathostoma</i>
			Gongylonematidae	<i>Gongylonema</i>
			Kathlaniidae	<i>Cruzia</i>
			Onchocercidae	<i>Acanthocheilonema</i>
	Physalopteridae		<i>Turgida</i>	
	Strongyloididae		<i>Strongyloides</i>	
	Subuluridae		<i>Subulura</i>	
	Enoplea	Tricocephalida	Capillariidae	<i>Capillaria</i>
				<i>Echinocoleus</i>
				<i>Eucoleus</i>
Trichuridae		<i>Trichuris</i>		

Anexo 4 – Exemplos de ovos de helmintes em *Didelphis* spp.

Num estudo realizado no norte de Yucatán, México, sobre a prevalência, abundância e intensidade de ovos e oocistos gastrointestinais em *Didelphis virginiana* (Pech et al. 2018), foram detetados diferentes ovos de parasitas nos quais se incluem *Trichuris* sp. (D), *Cruzia* sp. (F), *Turgida* sp. (I) e *Oligacanthorhynchus* sp. (J) tratados com mais pormenor neste trabalho.



- 1- Ovos de parasitas gastrointestinais encontrados em *Didelphis virginiana* de seis localidades rurais do norte de Yucatán, Mexico. A - Oocisto esporulado de *Eimeria* sp. (100x); B- oocisto de *Sarcocystis* sp. (100x); C- ovo de *Ancylostoma* sp. (40x); D- ovo de *Trichuris* sp. (40x); E- ovo de *Capillaria* sp. (40x); F- ovo de *Cruzia* sp. (40x); G- ovo de *Ascaris* sp. (40x); H- ovo de *Toxocara* sp. (40x); I- ovo de *Turgida* sp. (40x); J- ovo de *Oligacanthorhynchus* sp. (40x). A barra preta representa a escala para cada imagem. Imagem de Rosendo A. Aragón Pech, disponível em https://www.researchgate.net/figure/Helminth-eggs-found-in-Didelphis-virginiana-from-six-rural-localities-in-northern_fig1_324656449 [acesso a 14 Out, 2020].

Anexo 5 - Fármacos utilizados na desparasitação interna e externa de Didelphi- dae

No capítulo dedicado aos didelfídeos do *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária* (Nascimento & Horta 2014), estão descritos diferentes fármacos para a desparasitação interna e externa de didelfídeos, que são agora agrupados na seguinte tabela:

Fármaco	Via	Dose	Frequência	Ação contra
Praziquantel	PO, SC	5 a 7 mg/kg	Dose única, repetir em 14 dias	Cestodes e trema- todes
Piperazina	PO	100 mg/kg	Dose única	Helmintes
Pamoato de pi- rantel	PO	5 a 10 mg/kg	Dose única, repetir em 14 dias	Helmintes
Metronidazol	PO	20 a 25 mg/kg	q12h, durante 3 a 5 dias	Protozoários
Levamisol	PO e SC	6 a 10 mg/kg	SID, q3-4semanas, durante 2 a 3 meses.	Helmintes
Ivermectina	PO e SC	0,2 mg/kg	SID. Repetir em 14 dias.	Ecto e endoparasitas
Imidacloprida	Tópico	Dose de felinos	-	Pulgas
Fipronil	Tópico	-	-	Carraças e pulgas. Uso seguro em crias.

Anexo 6 – Dados brutos dos gambás analisados para pesquisa de *T. cruzi* e helmintes gastrointestinais

ID	GOB	GOP	Sexo	Idade	Sangue		Lâmina c/ secr.	Imprinting	Glândula em álcool a	Secr. gl. em	Imprinting
					EDTA	Esfregaço sanguíneo	gl.	gl.	70%	NaCl	miocárdio
G1	X	—	M	A	—	—	—	—	X	—	—
G2	—	X	F	A	X	—	—	—	X	—	—
G3	X	—	M	J	—	—	—	—	X	—	X
G4	—	X	F	J	—	—	—	—	—	—	—
G5	—	X	M	J	—	—	—	—	—	—	—
G6	—	X	M	J	—	—	—	—	—	—	—
G7	—	X	M	A	—	—	—	—	—	—	—
G8	X	—	F	A	—	—	X	—	—	X	—
G9	X	—	F	J	—	X	—	X	X	—	X
G10	X	—	M	A	—	-	—	X	X	—	X
G11	X	—	F	A	X	X	X	—	—	X	—
G12	—	X	M	A	X	X	X	—	—	X	—
G13	X	—	M	A	X	X	—	—	—	—	—
G14	X	—	F	J	X	X	X	—	—	X	—
G15	X	—	M	A	X	X	X	—	—	X	—
G16	X	—	M	J	—	—	X	—	—	X	—
G17	X	—	F	J	X	X	X	—	—	X	—
G18	X	—	M	A	X	X	X	—	—	X	—
G19	X	—	F	A	—	—	—	—	—	—	—
G20	X	—	F	A	X	X	X	—	—	X	—
G21	X	—	F	A	—	X	X	—	—	X	—
G22	X	—	M	A	X	X	—	—	—	—	—
G23	—	X	M	A	X	X	X	—	—	X	—
G24	—	X	F	A	X	X	X	—	—	X	—
G25	—	X	F	A	X	X	—	—	—	—	—
G26	—	X	M	A	X	X	X	—	—	X	—
G27	—	X	M	A	X	X	—	—	—	—	—
G28	—	X	F	A	—	—	—	—	—	—	—
G29	—	X	F	A	X	X	X	—	—	X	—
G30	—	X	M	A	—	—	X	—	—	X	—
G31	X	—	M	J	—	—	—	—	—	—	—
G32	—	X	M	A	—	—	—	—	—	—	—

ID – Identificação do indivíduo; **F** - Fêmea; **M** – Macho; **A** – Adulto; **J** – Jovem; **secr.** – secreção; **gl.** – glândula; **Travessão (—)** - Não se aplica; **X** – Efetuado.

Nota: O indivíduo G19 foi capturado, mas não se obteve qualquer amostra.

(continuação)

ID	Miocardio em álcool a 70%	Imprinting fígado	Fígado em álcool a 70%	Imprinting baço	Baço em álcool a 70%	Ln SM em álcool a 70%	Órgãos em bloco	Data colheita	Data óbito	RG	Proveniência
G1	X	—	X	—	X	X	—	10/05/2019	10/05/2019	23524	Valinhos
G2	X	—	X	—	X	X	X	11/05/2019	11/05/2019	23525	Jundiaí
G3	X	X	X	X	X	X	X	12/05/2019	12/05/2019	23532	Campinas
G4	—	—	—	—	—	—	X	13/05/2019	03/05/2019	22975	Itatiba
G5	—	—	—	—	—	—	X	13/05/2019	28/04/2019	22686	Itu
G6	—	—	—	—	—	—	X	13/05/2019	07/05/2019	23423	Vinhedo
G7	—	—	—	—	—	—	X	13/05/2019	02/05/2019	20927	Itatiba
G8	—	—	—	—	—	—	—	13/05/2019	—	—	?
G9	X	X	X	X	X	X	X	14/05/2019	14/05/2019	23041	Bragança Paulista
G10	X	X	X	X	X	X	X	14/05/2019	14/05/2019	23538	Vinhedo
G11	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G12	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G13	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G14	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G15	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G16	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G17	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G18	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G19	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G20	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G21	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G22	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G23	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G24	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G25	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G26	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G27	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G28	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G29	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G30	—	—	—	—	—	—	—	15/05/2019	—	—	?
G31	—	—	—	—	—	—	X	18/05/2019	15/05/2019	23539	Valinhos
G32	—	—	—	—	—	—	X	19/05/2019	18/05/2019	22547	Louveira

ID – Identificação do indivíduo; **Ln SM**– Linfonodos submandibulares; **RG** – N.º de registo na AMC; **Travessão (—)** - Não se aplica; **X** – Efetuado; **?** – Desconhecida.

Nota: O indivíduo G19 foi capturado, mas não se obteve qualquer amostra.