



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Silvia Bahadian Moreira

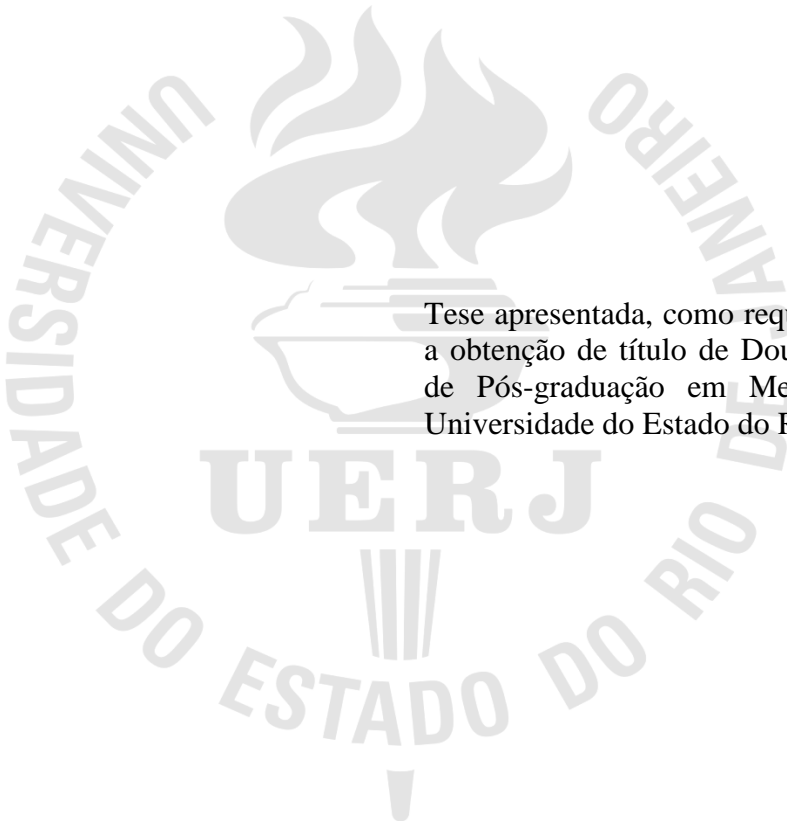
**Avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em  
população de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia:  
Didelphidae) da Serra dos Órgãos, RJ**

Rio de Janeiro

2013

Silvia Bahadian Moreira

**Avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) da Serra dos Órgãos, RJ**



Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lena Geise

Rio de Janeiro

2013

Silvia Bahadian Moreira

**Avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de  
*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) da Serra dos  
Órgãos, RJ**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de  
Pós-Graduação em Meio Ambiente, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de março de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Lena Geise (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Reiko Matushima

Universidade de São Paulo

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Vollmer Labarthe

Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maja Kajin

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Bergallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

M838      Moreira, Silvia Bahadian.  
Aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de  
*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) da Serra  
dos Órgãos, RJ / Silvia Bahadian Moreira. - 2013.  
132f. : il.

Orientadora: Lena Geise.  
Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro.

1. Gamba - Orgãos, Serra dos (RJ) - Teses. 2. Hematologia veterinária -  
Teses. 3. Bioquímica veterinária - Teses. 4. Parasitologia veterinária - Teses.  
I. Geise, Lena. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de  
Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 599.23(815.3)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte

---

Assinatura

Data

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Lourdes (in memoriam), com saudades, ao meu avô Argus, com carinho, e aos meus pais Teresa e Sergio, com todo o amor do mundo.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais teria sido realizado sem o auxílio e a colaboração de inúmeras pessoas, às quais tenho muito a agradecer.

Aos meus pais, Teresa e Sérgio, minha irmã Paula e minha sobrinha Irina, por suportarem minhas ausências, falta de humor e cansaço excessivo, e por me ajudarem no dia a dia a seguir trabalhando. Acima de tudo, amo vocês!

Ao Emmanuel por encarar toda a distância, ausência e cansaço que este trabalho nos trouxe, por torcer por mim mesmo de longe. Sempre serei grata a você.

À minha orientadora e eterna chefe, Dra. Lena Geise, por tudo! Por acreditar em mim e no meu trabalho mesmo sem me conhecer bem, por estar presente sempre que precisei, lendo, corrigindo, sugerindo mudanças, me apoiando e me ajudando a não surtar. Tornou-se para mim um exemplo de profissional, que trabalha com seriedade, alegria e camaradagem, com quem aprendi muito nesses quatro anos de convívio. Muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Mastozoologia da UERJ, Raul Fonseca, Vera de Ferran, Márcia Aguiéiras, Luana Azamor, Bruna Almeida, Paulo Asfora e Rebeca Mascarenhas por me ajudarem com revisões, críticas, sugestões e apoio direto, tornando esta tarefa menos solitária e mais prazerosa. Pela companhia, amizade, conversas, discussões e parceria, obrigado!

Aos alunos e estagiários do Laboratório de Vertebrados (LabVert) da UFRJ, que me ajudaram imensamente nas campanhas de campo, capturas e obtenção de amostras, geralmente em condições difíceis e desconfortáveis de trabalho. Aos professores do LabVert, especialmente ao Dr. Marcus Vinicius Vieira, por abrir as portas para mim, permitir o trabalho em parceria e sugerir áreas de coleta. Ao Dr. Diogo Loretto por ajudar no contato inicial entre laboratórios.

Ao biólogo Matheus Fernandez Dalloz, pelo auxílio nas campanhas de campo, logística e coleta de dados, por formar comigo uma equipe sintonizada e eficiente, pela parceria. Foram muitos momentos de desespero, cansaço e desânimo, mas sua ajuda, amizade e bom humor tornaram tudo mais fácil. Ao estudante de biologia Lucas Possi, a outra ponta da equipe, pela grande ajuda nas campanhas de campo, convívio divertido e até mesmo pelas brigas. Obrigado, equipe, vamos desfrutar!

Ao Sr. Nílson, pequeno produtor rural, que de forma generosa permitiu o acesso à sua propriedade, sempre auxiliando e apoiando nosso trabalho de campo, com muita simpatia e carinho.

Ao Prof. Igor Mansur da Faculdade de Veterinária da Fundação Educacional Serra dos Órgãos (FESO) que colocou seu Laboratório de Análises Clínicas à minha disposição, e à funcionária Alessandra pelo auxílio da realização dos hemogramas.

À equipe do Instituto Veterinário de Diagnóstico (IVD) pela boa vontade e auxílio na realização dos hemogramas.

À Dra. Renata Fernandes Ferreira pelo inestimável apoio na realização das dosagens bioquímicas, pelas discussões e pela amizade. À Clínica Veterinária Vet Care por permitir a realização das dosagens bioquímicas nas suas instalações.

Ao Dr. Sérgio Bastos Moreira pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos professores do PPGMA pelos ensinamentos e troca de idéias durante as disciplinas cursadas. Às Dr<sup>as</sup>. Ana Jansen e Fátima Branquinho pelas sugestões realizadas durante o exame de qualificação. Às funcionárias da secretaria do PPGMA, que sempre me atenderam com dedicação e profissionalismo.

À Capes, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

Aos amigos da Universidade Federal Fluminense, que mesmo distantes continuam perto de mim. Anderson Monteiro, Luiz Cavalcanti, Daniel Green, Daniel Gomes, Wellington Bandeira, Daphne Wrobel, Patrícia Maciel e Isabel Freire.

Aos amigos Marcela Chaves e Rodrigo Valle, pelo apoio e amizade, e à minha afilhada Nina por me proporcionar alegria e relaxamento em momentos de estresse profundo.

À amiga Fernanda Couto pela amizade, por me ouvir e ajudar a aliviar minhas tensões com oportunas sessões de acupuntura, cinema e eventuais festas.

## RESUMO

MOREIRA, Silvia Bahadian. Avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em população de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A Floresta Tropical Atlântica apresenta uma enorme biodiversidade, e está atualmente sujeita a inúmeras pressões como a perda de área pela intensa ocupação humana, agricultura, pecuária, urbanização e industrialização. Esses impactos têm provocado desmatamento e fragmentação florestal, processos que interferem na manutenção das populações animais, inclusive afetando os ciclos silvestres de parasitas e microorganismos. *Didelphis aurita* é um marsupial da Mata Atlântica com alta capacidade adaptativa a ambientes perturbados. Esta espécie onívora é tolerante à fragmentação florestal, podendo sobreviver em ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos, tendo importância na conexão dos ciclos silvestres e urbanos de diversos agentes. Este trabalho teve por objetivo descrever aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em *Didelphis aurita* de duas áreas da Serra dos Órgãos/ RJ, uma área fragmentada e outra de mata contínua. Entre julho de 2011 e fevereiro de 2012 foram capturados 61 animais que tiveram amostras de sangue avaliadas. Os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão foram: Volume Globular 38,66 % ( $\pm$  4,97); Hemácias  $5,40 (\pm 0,75) \times 10^6/\text{mm}^3$ ; Hemoglobina 12,78 ( $\pm$  1,68) g/dL; VGM 71,69 ( $\pm$  3,56) fl; CHGM 33,01 ( $\pm$  0,63) %; Plaquetas  $514,70 (\pm 323,10) \times 10^3/\text{mm}^3$ ; Leucócitos  $19.678,52 (\pm 10.152,26)/\text{mm}^3$ ; Basófilos 0,59 ( $\pm$  0,72) %; Eosinófilos 13,79 ( $\pm$  6,94)%; Bastonetes 0,77 ( $\pm$  2,04) %; Segmentados 41,12 ( $\pm$  13,95) %; Linfócitos 41,97 ( $\pm$  12,97) %; Monócitos 1,75 ( $\pm$  1,51)%. Para parâmetros bioquímicos encontramos os seguintes resultados: Proteínas totais 8,50 ( $\pm$  1,68); albumina 3,03 ( $\pm$  0,69); globulina 5,44 ( $\pm$  1,66); uréia 83,57 ( $\pm$  20,11); creatinina 0,44 ( $\pm$  0,13); ALT 85,01 ( $\pm$  65,65); AST 314,55 ( $\pm$  130,58); FA 420,38 ( $\pm$  371,89); GGT 19,40 ( $\pm$  8,51). Os parâmetros hematócrito, hemoglobina, hematimetria, ALT, AST e FA foram maiores nos machos do que nas fêmeas. Adultos apresentaram valores de proteína plasmática total, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, hematimetria, albumina, proteínas totais, creatinina e GGT maiores do que jovens, e o inverso ocorreu para plaquetas, globulina e FA. Animais do Fragmento apresentaram valores de massa corporal e albumina menores do que os do Garrafão, e o inverso ocorreu para GGT e globulina. *Babesi* sp. ocorreu em 26,6% da população, sendo mais frequente em adultos. Estes resultados são os primeiros parâmetros de referência para *Didelphis aurita* na Serra dos Órgãos, contribuindo para o estudo desta espécie.

Palavras-chave: *Didelphis*. Hematologia. Bioquímica. *Babesia*. Hemoparasitas



## ABSTRACT

MOREIRA, Silvia Bahadian. Hematology, serum chemistry and hemoparasites in *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) at Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The Atlantic Forest is characterized by a high species diversity and endemism. This ecosystem is under human-induced threats for decades, losing area to agriculture, pastures and urban areas. These threats have led to habitat destruction and fragmentation, disturbing ecological processes and affecting the enzootic cycle of diseases. *Didelphis aurita* is an Atlantic Forest marsupial with synanthropic habit, capable of surviving in disturbed and fragmented environments, including urban areas. The aim of this study was to describe haemoparasites, hematologic and serum chemistry aspects of *D. aurita* in Serra dos Órgãos/RJ, comparing two areas, a conserved forest and a fragmented landscape. Between July 2011 and February 2012 61 specimens were studied. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation, as follows: Packed cell volume 38,66 % ( $\pm$  4,97); erythrocytes 5,40 ( $\pm$  0,75) $\times 10^6/\text{mm}^3$ ; hemoglobin 12,78 ( $\pm$  1,68) g/dL; MCV 71,69 ( $\pm$  3,56) fl; MCHC 33,01 ( $\pm$  0,63) %; Platelets 514,70 ( $\pm$  323,10)  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ; Leukocytes 19.678,52 ( $\pm$  10.152,26)/ $\text{mm}^3$ ; basophils 0,59 ( $\pm$  0,72) %; eosinophils 13,79 ( $\pm$  6,94)%; band neutrophils 0,77 ( $\pm$  2,04) %; neutrophils 41,12 ( $\pm$  13,95) %; lymphocytes 41,97 ( $\pm$  12,97) %; monocytes 1,75 ( $\pm$  1,51)%. The serum chemistry values were: total protein 8,50 ( $\pm$  1,68); albumin 3,03 ( $\pm$  0,69); globulin 5,44 ( $\pm$  1,66); BUN 83,57 ( $\pm$  20,11); creatinine 0,44 ( $\pm$  0,13); ALT 85,01 ( $\pm$  65,65); AST 314,55 ( $\pm$  130,58); AP 420,38 ( $\pm$  371,89); GGT 19,40 ( $\pm$  8,51). Packed cell volume, hemoglobin, erythrocytes, ALT, AST and AP were higher in males than in females. Adults have higher values of total plasma protein, leukocytes, packed cell volume, hemoglobin, erythrocytes, albumin, total protein and GGT than young animals. The Young have higher platelets, globulin and AP. Animals from the fragmented area present lower body mass and lower levels of albumin than those from the conserved Forest. The opposite occurred for GGT and globulin. *Babesia* sp. were found in 26.6% of specimens, more frequently in adults. These results are the very first report of hematologic and serum chemistry values for *D. aurita* in Serra dos Órgãos.

Keywords: *Didelphis*. Hematology. Serum chemistry. *Babesia*. Hemoparasites.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Exemplar de <i>Didelphis aurita</i> capturado na Serra dos Órgãos, RJ.....	22
Figura 2-	Exemplar de <i>Didelphis aurita</i> na Serra dos Órgãos, RJ.....	23
Figura 3-	Filhote imaturo de <i>Didelphis aurita</i> dentro do marsúpio preso à teta da mãe.....	28
Figura 4-	Filhotes de <i>Didelphis aurita</i> próximos à idade de desmame.....	29
Figura 5-	Mapa das duas localidades de estudo.....	73
Figura 6-	Região do vale do rio Iconha, localidade do Garrafão, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ.....	74
Figura 7-	Localização relativa das grades de amostragem.....	75
Figura 8-	Localização dos fragmentos e da área de mata contínua, amostrados na bacia do rio Guapiaçu (quadrado vermelho), mostrando também os demais remanescentes florestais da bacia (em verde).....	76
Figura 9-	Visão aérea da área de estudo com os pontos de armadilhagem de cada área georeferenciados (pontos pretos).....	77
Figura 10-	Vista da localidade dos Fragmentos, Serra dos Órgãos, RJ.....	77
Figura 11-	Armadilha Tomahawk montada no solo da mata.....	78
Figura 12-	<i>Didelphis aurita</i> capturado em armadilha.....	79
Figura 13-	Transferência de <i>Didelphis aurita</i> da armadilha para saco de contenção.....	79
Figura 14-	Pesagem com dinamômetro de indivíduo de <i>Didelphis aurita</i> em saco de contenção.....	80
Figura 15-	Contenção física de indivíduo de <i>Didelphis aurita</i> .....	80
Figura 16-	Medição do comprimento do corpo- cabeça ao ânus.....	81
Figura 17-	Medição do comprimento da cauda.....	81
Figura 18-	Avaliação da dentição de indivíduo de <i>Didelphis aurita</i> .....	81
Figura 19-	Brinco de marcação individual colocado na orelha de <i>Didelphis aurita</i> .....	81
Figura 20-	Filhotes de <i>Didelphis aurita</i> dentro do marsúpio.....	82

Figura 21-	Medição de comprimento de cauda de filhote de <i>Didelphis aurita</i> .....	82
Figura 22-	Corte de falange para marcação de filhote de <i>Didelphis aurita</i> .....	82
Figura 23-	Veia lateral caudal de <i>Didelphis aurita</i> .....	83
Figura 24-	Colheita de sangue de <i>Didelphis aurita</i> .....	84
Figura 25-	Colheita de sangue de <i>Didelphis aurita</i> pela veia lateral caudal.....	84
Figura 26-	Basófilo de <i>Didelphis aurita</i> .....	87
Figura 27-	Neutrófilo Bastão de <i>Didelphis aurita</i> .....	87
Figura 28-	Eosinófilo de <i>Didelphis aurita</i> .....	88
Figura 29-	Eosinófilo de <i>Didelphis aurita</i> .....	88
Figura 30-	Neutrófilo segmentado de <i>Didelphis aurita</i> .....	88
Figura 31-	Linfócito de <i>Didelphis aurita</i> .....	88
Figura 32-	Hemácias e metarrubricito em <i>Didelphis aurita</i> .....	89
Figura 33-	<i>Babesia</i> spp. em eritrócito de <i>Didelphis aurita</i> .....	109
Figura 34-	Diversos eritrócitos parasitados por <i>Babesia</i> spp. em <i>Didelphis aurita</i> .....	109
Gráfico1 -	Distribuição de resultados positivos e negativos de <i>Babesi</i> sp. ao longo dos meses.....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Campanhas de campo, localidades, período e número de <i>Didelphis aurita</i> capturados.....	78
Tabela 2-	Estatística descritiva de massa corporal (em gramas) para animais do Fragmento e Garrafão.....	87
Tabela 3-	Valores de hemograma de <i>Didelphis aurita</i> de vida livre da Serra dos Órgãos/ RJ com estatística descritiva.....	90
Tabela 4-	Média e desvio padrão dos valores hematológicos de <i>Didelphis aurita</i> da Serra dos Órgãos segundo o sexo.....	93
Tabela 5-	Média e desvio padrão dos valores hematológicos de <i>Didelphis aurita</i> da Serra dos Órgãos segundo a classe etária.....	94
Tabela 6-	Estatística descritiva de bioquímica sérica de <i>Didelphis aurita</i> de vida livre da Serra dos Órgãos, RJ.....	96
Tabela 7-	Valores com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Fragmento e Garrafão.....	97
Tabela 8-	Estatística descritiva dos valores de bioquímica sérica segundo o sexo (machos e fêmeas).....	98
Tabela 9-	Estatística descritiva dos valores de bioquímica sérica segundo a classe etária (jovens e adultos).....	100
Tabela 10-	Animais positivos para <i>Babesia</i> sp. com resultados diferentes ao longo do tempo.....	110
Tabela 11-	Resultados de peso, hematócrito, metarrubricitos, anisocitose e policromasia dos animais positivos.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CMR	Captura-remarcação-recaptura
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
FA	Fosfatase alcalina
FESO	Fundação Educacional Serra dos Órgãos
GGT	Gama glutamil transferase
IVD	Instituto Veterinário de Diagnóstico
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MAT	Teste de aglutinação modificado
NCSS	<i>Statistical Analysis &amp; Graphics Software</i>
PASS	<i>Power Analysis &amp; Sample Size Software</i>
PPT	Proteína plasmática total
PT	Proteína total
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VGM	Volume globular médio
UI	Unidade internacional

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO

1	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
1.1	<b>Gênero <i>Didelphis</i></b> .....	20
1.1.1	<u>Classificação taxonômica</u> .....	21
1.1.2	<u>Características biológicas</u> .....	24
1.1.3	<u>Alimentação</u> .....	26
1.1.4	<u>Reprodução</u> .....	27
1.1.5	<u>Anatomia</u> .....	30
1.1.6	<u>Ecologia</u> .....	31
1.1.7	<u>Captura, manejo e coleta de amostras</u> .....	31
1.2	<b>Enfermidades</b> .....	33
1.2.1	<b><u>Importância epidemiológica</u></b> .....	33
1.2.2	<b><u>Utilização como modelo experimental</u></b> .....	34
1.2.3	<u>Vírus</u> .....	35
1.2.4	<u>Fungos</u> .....	35
1.2.5	<u>Bactérias</u> .....	36
1.2.5.1	Borreliose.....	38
1.2.5.2	Leptospirose.....	39
1.2.6	<u>Parasitas</u> .....	41
1.2.6.1	Endoparasitos.....	41
1.2.6.2	Ectoparasitos.....	42
1.2.6.3	Protozoários.....	43
1.2.6.4	Sarcocistose.....	44
1.2.6.5	Leishmaniose.....	45
1.2.6.6	Doença de Chagas.....	46
1.2.6.7	Toxoplasmose.....	48
1.3	<b>Gênero <i>Babesia</i></b> .....	51
1.3.1	<u>Introdução</u> .....	51
1.3.2	<u>Histórico</u> .....	51

1.3.3	<u>Classificação</u> .....	52
1.3.4	<u>Ciclo de vida</u> .....	54
1.3.5	<u>Patogenicidade e imunidade</u> .....	55
1.3.6	<u>Adaptação entre <i>Babesia</i> spp. e seus hospedeiros</u> .....	57
1.3.7	<u>Resistência</u> .....	60
1.3.8	<u><i>Babesia</i> spp. No hospedeiro invertebrado</u> .....	62
1.3.9	<u>Diagnóstico</u> .....	63
1.3.10	<u><i>Babesia</i> sp. Em roedores</u> .....	64
1.3.11	<u><i>Babesia</i> sp. No cão</u> .....	64
1.3.12	<u><i>Babesia</i> sp. No homem</u> .....	65
1.3.13	<u><i>Babesia</i> sp. No gênero <i>Didelphis</i></u> .....	67
1.3.14	<u>Conclusão</u> .....	68
1.4	<b>Hematologia e bioquímica</b> .....	69
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	71
2.1	<b>Hipótese</b> .....	71
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	72
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
4.1	<b>Área de estudo</b> .....	73
4.2	<b>Campanhas de campo</b> .....	77
4.3	<b>Manipulação dos animais e coleta de material</b> .....	79
4.4	<b>Processamento das amostras de sangue</b> .....	84
4.5	<b>Análise estatística</b> .....	85
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	86
5.1	<b>Considerações gerais</b> .....	86
5.2	<b>Hemograma</b> .....	89
5.3	<b>Bioquímica</b> .....	96
5.4	<b>Hemoparasitos</b> .....	109
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	115
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	116

## INTRODUÇÃO

### Biodiversidade

A biodiversidade, ou diversidade biológica não está uniformemente distribuída sobre as diferentes regiões e ecossistemas do planeta. O termo Megadiversidade foi criado em 1988 pelo primatólogo Russell Mittermeier para designar os países detentores da maior riqueza em biodiversidade. Os critérios para definir a megadiversidade são o número de espécies endêmicas vegetais e animais, e o número de espécies como um todo. A maioria dos países megadiversos está nas Américas, e o Brasil ocupa a primeira posição neste grupo, sendo considerado detentor de 15 a 20 % de todas as espécies encontradas no planeta (GROSS; JOHNSTON; BARBER, 2005).

Outro conceito relacionado à biodiversidade é o de *Hotspot*, que foi elaborado em 1988, pelo ecólogo inglês Norman Myers para designar as áreas mais importantes para preservação da biodiversidade. Myers procurou identificar regiões que concentravam os mais altos níveis de biodiversidade e onde este patrimônio estivesse mais urgentemente ameaçado, ou seja, áreas prioritárias para conservação, e sob ameaças antrópicas iminentes. O critério para caracterizar um *Hotspot* é o de uma área com pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de 3/4 de sua vegetação original<sup>1</sup>.

Inicialmente foram apontados dez *Hotspots* no planeta, e atualmente esse número aumentou para 34, em função do aumento do conhecimento científico. O Cerrado e a Mata Atlântica são os *Hotspots* brasileiros, ou seja, ecossistemas prioritários para a conservação da biodiversidade, principalmente frente ao elevado índice de endemismos e à intensa pressão antrópica (TABARELLI; GASCON, 2005).

A Floresta Tropical Atlântica ou Mata Atlântica abrangia originalmente uma área de 150 milhões de hectares distribuída numa ampla faixa latitudinal pelas regiões tropical e subtropical. Essa amplitude permitiu o desenvolvimento de ambientes florestais com condições bastante heterogêneas. As diferentes condições geológicas, pluviométricas e altitudinais de cada região favoreceram uma alta diversidade e endemismos, resultando em mais de 22.000 espécies animais e vegetais, sendo 8.000 delas endêmicas. Estima-se que as

---

<sup>1</sup>Sítio eletrônico da Conservação Internacional Brasil  
<<http://www.conservation.org.br/como/index.php?id=11>>, Acesso em 11.01.2013.



espécies animais e vegetais deste ecossistema possam corresponder a 1-8% da biodiversidade mundial (RIBEIRO et al., 2009).

A Mata Atlântica vem sendo continuamente pressionada pela intensa ação humana iniciada com a colonização do país, no século XVI, através de diversas atividades econômicas como monoculturas de açúcar e café, pecuária e agricultura de menor porte e principalmente pela ocupação humana, urbanização e industrialização. Atualmente, esse bioma sobrevive na forma de áreas fragmentadas, mas que ainda detêm altos graus de endemismo, sob constante pressão antrópica (TABARELLI et al., 2005).

Quase 70 % de toda a população brasileira vivem atualmente no domínio da Mata Atlântica, reduzida a aproximadamente 12% da cobertura florestal existente na época do descobrimento (RIBEIRO et al., 2009). As ações para conservação da biodiversidade neste ecossistema convergiram para o estabelecimento de áreas protegidas unidas por corredores de biodiversidade, a fim de viabilizar a sobrevivência de populações de espécies e a troca de material genético. Apesar de extremamente impactada, a Mata Atlântica concentra o maior número de iniciativas conservacionistas a partir de ONGs trabalhando na região, com aporte regular de recursos financeiros, e possui atualmente quase metade dos remanescentes florestais sob algum tipo de proteção ambiental<sup>2</sup>.

O estado do Rio de Janeiro preserva atualmente a maior porcentagem (cerca de 20%) de remanescentes de Mata Atlântica no país, perfazendo uma área de 900.000 hectares. Diversas áreas fluminenses são consideradas de “extrema importância biológica” devido à sua elevada biodiversidade e altos índices de endemismos de diversos grupos animais e vegetais (BERGALLO et al., 2009a).

A manutenção da biodiversidade e do patrimônio genético é vital para atividades econômicas essenciais, como o desenvolvimento da agroindústria, da indústria farmacêutica e biotecnológica (CAPOBIANCO, 2001). No Brasil, além da grande diversidade biológica encontra-se uma enorme riqueza sociocultural, representada pelas comunidades tradicionais que tem uma relação íntima com o ambiente natural em que estão inseridas e seus recursos. Assim, a posição de destaque do Brasil em número de espécies e endemismo aumenta a responsabilidade sobre a gestão desta biodiversidade, mas também representa uma oportunidade única, em termos ecológicos e econômicos. As mudanças ambientais exercem uma grande influência na proliferação e no surgimento de doenças parasitárias zoonóticas, como malária, leishmaniose, criptosporidiose, giardíase, tripanossomíase e esquistossomose.

---

<sup>2</sup> Sítio eletrônico *Hotspots* de biodiversidade  
<<http://www.biodiversityhotspots.org>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2013.

Alterações decorrentes de fenômenos naturais ou de intervenções humanas podem alterar o equilíbrio ecológico e a ocorrência de agentes patogênicos em seus hospedeiros silvestres e vetores (LALLO et al., 2009).

### **Medicina da Conservação**

Saúde é uma condição definida pela ausência de doença, a habilidade de resistir a desafios infecciosos e não infecciosos, e a habilidade de rapidamente resolver a doença quando esta ocorre. Assim como os indivíduos possuem faixas normais de variação, que o caracterizam como saudável, da mesma forma os ecossistemas tem taxas normais de flutuação, embora o que seja considerado “normal” para um sistema ecológico seja de difícil definição (OSTEFELD; MEFFE; PEARL, 2002).

Nesse contexto ecológico, a saúde de todos os organismos vivos se interliga por conexões estabelecidas entre as espécies, ecossistemas e recursos naturais disponíveis, fatores que estão em constante modificação ao longo do tempo (BOYCE; KJEMTRUP, 1993). A saúde humana está ligada à saúde das outras espécies, e vice-versa. E a saúde de todas as formas de vida está atrelada aos ecossistemas ou ambientes em que vivem (TABOR, 2002).

Os desafios ambientais modernos são complexos e multifatoriais, como o acúmulo de poluentes químicos persistentes no ambiente, a destruição, degradação e fragmentação de ecossistemas naturais, a perda de biodiversidade e mudanças climáticas globais e locais. Essas alterações ambientais afetam diretamente os microrganismos e parasitas, seus hospedeiros silvestres e vetores. Recentemente, o papel da biodiversidade e dos ecossistemas como sustentadores da saúde de comunidades de plantas e animais tem se tornado mais explícito (DASZAK et al., 2002). O declínio da biodiversidade pode afetar os ciclos de vida de parasitas e microrganismos, causando desequilíbrios de potencial negativo sobre espécies anteriormente não afetadas e desestruturando sistemas biológicos de controle que limitam a disseminação de patógenos (WOODFORD et al., 2002; MUNSON; KARESH, 2002). Assim, tem sido observado com maior frequência o aparecimento de doenças infecciosas emergentes e reemergentes como uma manifestação da perda de saúde ecológica (TABOR, 2002).

Além disso, fenômenos como a simplificação e fragmentação de habitats, disseminação de monoculturas, adensamentos humanos, penetração humana em áreas

naturais, desmatamento, perda de predadores e competidores, dominância de espécies generalistas, ecoturismo e sistemas agrícolas intensivos estão criando um novo meio para a dispersão de agentes patogênicos entre as espécies (TABOR, 2002; EPSTEIN, 2002). Dentre os impactos antrópicos já estudados, o desmatamento é um dos que mais afeta os nichos ecológicos de agentes potencialmente patogênicos (LALLO et al., 2009).

As infecções podem afetar diretamente o sistema imunológico, comportamento, predação, seleção sexual, sucesso reprodutivo, fecundidade, ecologia, estrutura de comunidade, diversidade de espécies e demografia, influenciando a distribuição e abundância de animais e interferindo na sobrevivência de espécies (SPALDING; FORRESTER, 1993).

Os impactos antrópicos vêm sendo notados de forma mais intensa sobre os ecossistemas terrestres, onde os animais competem com os seres humanos por habitat. Segundo Jones et al. (2008), dentre as doenças infecciosas emergentes (DIE), aquelas provenientes de espécies animais selvagens são as que mais vêm aumentando, em decorrência de processos de destruição da biodiversidade local. Projeções estatísticas deste estudo colocam a América do Sul como um possível foco de aparecimento de DIE provenientes de espécies selvagens.

A importância das infecções naturais nos processos históricos de declínio populacional é pouco documentada (MUNSON; KARESH, 2002). Com poucos dados prévios disponíveis, existe uma limitação para a avaliação do impacto das interferências antrópicas e das mudanças ambientais sobre a dinâmica destes agentes patogênicos. O entendimento do papel dos patógenos endêmicos na evolução das populações animais pode ter um uso prático no manejo de espécies selvagens (SPALDING; FORRESTER, 1993), e a influência que estes agentes exercem sobre a saúde das populações animais terrestres deve ser determinada (MUNSON; KARESH, 2002).

O estudo da relação entre os impactos ambientais e as suas consequências é tão abrangente, diverso e complexo que traz em si a necessidade de unir habilidades de diferentes campos do conhecimento em prol do entendimento do todo. Segundo este preceito foi cunhado o termo *medicina da conservação*, visando unir numa área de conhecimento disciplinas que anteriormente haviam sido separadas pelo processo de especialização da ciência. O termo foi utilizado pela primeira vez por Koch em 1996 para descrever o amplo contexto ecológico da saúde (TABOR, 2002). A medicina da conservação, assim como a biologia da conservação, é uma disciplina de crise, desenvolvida em resposta a uma rede de problemas que estão além de uma única área do conhecimento, e que requerem ações

intervencionistas sem que haja informações completas (OSTEFELD; MEFFE; PEARL, 2002).

Assim, a medicina da conservação se caracteriza como uma nova abordagem multidisciplinar que pretende estudar as conexões entre as mudanças na estrutura de habitat e uso do espaço; a emergência e reemergência de agentes infecciosos, parasitas e contaminantes ambientais; e a manutenção da biodiversidade e das funções de ecossistemas como sustentadores da saúde de comunidades de plantas e animais (DASZAK et al., 2002; OSTFELD; MEFFE; PEARL, 2002). Sob essa óptica, o equilíbrio dinâmico do que chamamos “saúde” é visto numa série de variáveis de diferentes disciplinas, incluindo saúde humana e pública, epidemiologia, medicina veterinária, toxicologia, ecologia e biologia da conservação. A medicina da conservação é a abordagem que une essas disciplinas para examinar a saúde dos indivíduos, de grupos de indivíduos e dos ambientes em que eles vivem, sem separar nenhum desses aspectos do todo comum (TABOR, 2002).

A análise dos problemas sob a óptica da medicina da conservação engloba a saúde animal, humana e dos ecossistemas, com ênfase especial aos pontos onde estas se comunicam, estudando os processos de interação ambiental de forma inclusiva e dinâmica, e até mesmo holística. Esta abordagem é tida como transdisciplinar, inovadora e inclusiva, visando desenvolver novos métodos de entendimento e intervenção (TABOR, 2002). Este tipo de análise pode fornecer a base científica para posicionamentos políticos na conservação e manejo de espécies e ecossistemas por revelar a utilidade da preservação da biodiversidade e decifrar processos e dinâmicas envolvendo doenças e biodiversidade (OSTEFELD; MEFFE; PEARL, 2002).

Trabalhos desenvolvidos sob o escopo da medicina da conservação podem, por exemplo, a partir de uma espécie alvo entender os impactos da perda de habitat ou de biodiversidade sobre os patógenos que por sua vez influenciam esta espécie. A coleta de dados em medicina da conservação inclui o monitoramento de infecções, que é raramente realizado em animais selvagens (DOBSON; MAY, 1986), com exceção daqueles que possuem significância econômica ou para saúde pública (SPALDING; FORRESTER, 1993).

O entendimento do papel das infecções naturais sobre as populações animais pode se tornar uma ferramenta para o manejo e conservação dessas espécies selvagens. (SPALDING; FORRESTER, 1993).

A manutenção de populações animais viáveis é essencial para o equilíbrio dos ecossistemas, e para isso são necessários animais saudáveis e reprodutivamente aptos.

Populações pequenas, que estejam isoladas geograficamente e geneticamente depauperadas devem responder de forma diferente a doenças infecciosas do que as populações maiores e mais heterogêneas. Isto mostra a importância de se determinar a influência da doença sobre a saúde de populações animais terrestres, em cada ecossistema e espécie, de preferência em estudos contínuos de longo prazo (MUNSON; KARESH, 2002).

Embora muitos patógenos possam ser encontrados em animais silvestres, a ocorrência de doença clínica vai depender do grau de patogenicidade do agente e da condição de saúde do hospedeiro. O estresse fisiológico pode resultar em imunodepressão e queda da resistência às doenças (WASSER et al., 2002). Assim, quando submetidos a situações de estresse como alterações no seu habitat, animais selvagens tornam-se mais suscetíveis a agentes causadores de doenças e podem se tornar fontes de infecção para outros animais da mesma espécie ou de outras (CORREA; PASSOS, 2001).

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Gênero *Didelphis*

Os marsupiais são um grupo de mamíferos que apresentam características que os diferenciam dos outros animais da Classe Mammalia, como alguns aspectos dentários, ósseos, metabólicos e, principalmente reprodutivos (SVARTMAN, 2009). A Infraclasse Marsupialia atualmente tem distribuição geográfica restrita às Américas e Oceania, porém no passado teve distribuição mais ampla, correspondente às radiações ocorridas no grupo (TARRAGONA et al., 2011). Junto com os monotremados, os marsupiais são considerados os mamíferos terrestres mais antigos (CASAGRANDE et al., 2009). Nas Américas os marsupiais são representados por três Ordens, sendo a mais diversa a Ordem Didelphimorphia. A Ordem Didelphimorphia por sua vez é composta por uma única Família, Didelphidae, que abriga 91 espécies em 18 gêneros (VOSS; JANSÁ, 2009).

O gênero *Didelphis* abriga os marsupiais de maior tamanho corporal das Américas, sendo localizados na Família Didelphidae, Subfamília Didelphinae (GARDNER, 2007). Este gênero endêmico das Américas abriga seis espécies de grande importância ecológica e epidemiológica (CERQUEIRA; LEMOS, 2000; DELCIELLOS; LORETTO; ANTUNES, 2006; MACEDO et al., 2007; PREVEDELLO; MENDONÇA; VIEIRA; 2008; SALVADOR; GRAIPEL; SIMÕES-LOPES, 2009), popularmente chamados de gambás, sariguês ou mucuras, dependendo da região do Brasil.

*Didelphis aurita* é uma espécie que ocorre naturalmente na Mata Atlântica e matas de Araucária, desde o nordeste da Argentina até o nordeste brasileiro (CERQUEIRA; LEMOS, 2000). Esta espécie apresenta alta capacidade adaptativa a ambientes perturbados (D'ANDREA et al., 2007), sendo caracterizada como tolerante à fragmentação florestal (FORERO-MEDINA; VIEIRA, 2009). São animais onívoros (CUNHA; VIEIRA, 2005) e de hábito semi-terrestre, eventualmente utilizando o estrato arbóreo (CUNHA; VIEIRA, 2002).

Pela sua grande capacidade de adaptação, os gambás podem ser encontrados em ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos (LUCHEIS et al., 2009; TARRAGONA et al., 2011). Por isso são chamados de animais sinantrópicos, ou seja, aqueles que são capazes de circular entre os diferentes ambientes, criando contato entre animais domésticos, silvestres

e o homem (FORNAZARI et al. 2011). Gambás são considerados dispersores, mantenedores e/ou introdutores de diversos agentes infecciosos, inclusive agentes etiológicos de zoonoses de grande importância na saúde pública, como a Doença de Chagas, Leishmaniose e Leptospirose (ABEL et al. 2000; FORNAZARI et al., 2011; LUCHEIS et al., 2009; PENA et al., 2011; RUIZ-PIÑA et al., 2002a).

Bergallo et al. (2009b) apontam que distúrbios ecológicos nos habitats de Mata Atlântica vêm levando a perda de predadores de grande porte e podem conduzir a um aumento na abundância de predadores e onívoros de médio porte, num fenômeno chamado de “liberação do mesopredador”. Em algumas regiões de Mata Atlântica esta situação vem sendo observada pelo aumento da abundância do gambá de orelha preta (*Didelphis aurita*), com consequente empobrecimento de espécies de pequenos mamíferos.

Com este trabalho, espera-se contribuir para o conhecimento teórico e prático do monitoramento de saúde em populações de *Didelphis aurita* de vida livre, gerando informações básicas sobre a espécie através de ações interdisciplinares, dentro do escopo da Biologia da Conservação (PRIMACK; RODRIGUES, 2001) e da Medicina da Conservação (OSTFELD; MEFFE; PEARL, 2002).

### 1.1.1 Classificação Taxonômica

Os animais do gênero *Didelphis* são marsupiais, agrupados dentro da Classe Mammalia como Metatheria. Embora apresentem características típicas de mamíferos como a homeotermia, pelos e glândulas mamárias, também possuem particularidades que justificam a sua separação num grupo distinto. Entre os aspectos típicos deste grupo estão características dentárias, osteológicas, cranianas, cerebrais e reprodutivas distintas (SVARTMAN, 2009).

Assim, estes animais são classificados na Classe Mammalia, Ordem Didelphimorphia, Família Didelphidae, Subfamília Didelphinae, Gênero *Didelphis* (GARDNER, 2007; VOSS; JANSA, 2009; WILSON; REEDER, 2005). A Ordem Didelphimorphia representa a única radiação intacta de Marsupialia no Novo Mundo. Ela é composta pela Família Didelphidae, onde são reconhecidas atualmente 91 espécies em 18 gêneros, entre eles *Didelphis* (VOSS; JANSA, 2009).

Estimativas recentes realizadas com dados moleculares apontam que a linhagem dos marsupiais divergiu do tronco dos mamíferos a 147,7 milhões de anos e a sua diversificação ocorreu a 82,5 milhões de anos. A descoberta de fósseis na China conduziu os pesquisadores a propor o surgimento dos marsupiais na Eurásia, com posterior migração para a América do Norte e desta para a América do Sul, Antártida e Austrália (SVARTMAN, 2009).

O gênero *Didelphis*, descrito por Linnaeus em 1758 conta com seis espécies reconhecidas, *D. marsupialis* Linnaeus 1758, *D. aurita* Wied-Neuwied 1826, *D. albiventris* Lund 1841, *D. virginiana* Kerr 1792, *D. pernigra* J.A. Allen 1900 e *D. imperfecta* Mondolfi e Pérez-Hernández 1984 (ALLEN, 1902; CERQUEIRA; TRIBE, 2007; GARDNER, 2005; GARDNER, 2007; VOSS; JANSÁ, 2009). O gênero apresenta distribuição geográfica desde o sul do Canadá, atravessando a maior parte da América do Norte, toda a América Central e a maior parte da América do Sul (VOSS; JANSÁ, 2009). Entretanto, somente *D. virginiana* tem ocorrência fora da região tropical, se estendendo até as zonas temperadas da América do Norte. As demais espécies são restritas à América do Sul e Central (PATTON; COSTA, 2003; TARRAGONA et al., 2011).

Figura 1 -Exemplar de *Didelphis aurita* capturado na Serra dos Órgãos, RJ.



Foto: A autora, 2011.



Estudos moleculares mostram que o grupo *Didelphis* se separou em duas linhagens, uma dando origem a *D. virginiana* e outra à linhagem tropical, de onde surgiram as demais espécies. *D. aurita* é considerado, junto com *D. marsupialis* como táxons monofiléticos e mais próximos entre si (PAIVA et al., 1992), tendo se separado como espécies a cerca de um milhão de anos atrás (PATTON; COSTA, 2003). *D. virginiana* é considerado um invasor recente, derivado de *D. marsupialis* (SVARTMAN, 2009).

Todas as espécies do gênero parecem ser bastante conservadas geneticamente, o que aponta *Didelphis* como um gênero jovem, que sofreu diferenciação em tempos recentes. Assim, este gênero não representa o arquétipo de marsupial primitivo. Estudos filogenéticos mostram ainda que *Didelphis* separou-se como gênero a 2,5 milhões de anos, sendo mais jovem do que outros gêneros de marsupiais como *Monodelphis* e *Marmosops* (PATTON; COSTA, 2003).

A espécie deste estudo é *Didelphis aurita*. Descrita por Wied-Neuwied em 1826, conhecido em inglês como *black eared opossum*, sua distribuição se estende do nordeste da Argentina ao nordeste do Brasil, principalmente na Floresta Tropical Atlântica, mas também nas florestas de Araucária (CERQUEIRA; LEMOS, 2000). É classificada como espécie de baixo risco de extinção pela IUCN (GARDNER, 2005). No Brasil é chamado de gambá de orelhas pretas.

Figura 2 - Exemplar de *Didelphis aurita* na Serra dos Órgãos, RJ.

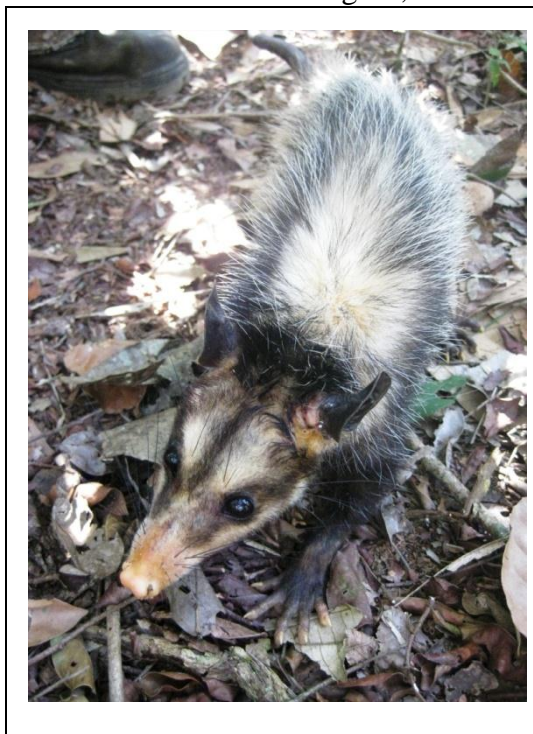


Foto: A autora, 2011.

### 1.1.2 Características biológicas

Os gambás são um grupo pouco diverso de marsupiais de tamanho corporal médio, com ampla distribuição geográfica, sendo elementos comuns de todas as comunidades de florestas tropicais e ambientes mais abertos como cerrado, Chaco e florestas temperadas (CERQUEIRA; LEMOS, 2000; PATTON; COSTA, 2003). Na Floresta Tropical Atlântica, marsupiais representam 9,1% de todas as espécies de mamíferos, e o gênero *Didelphis* abriga as espécies mais amplamente distribuídas, de maior tamanho, e mais bem estudadas (PREVEDELLO; MENDONÇA; VIEIRA; 2008).

Eles também têm um papel importante na estrutura de comunidade de pequenos mamíferos e nas interações parasita-hospedeiro (SALVADOR; GRAIPEL; SIMÕES-LOPES, 2009), sendo considerados dispersores de sementes e controladores de populações de roedores silvestres (DELICIELLOS; LORETTO; ANTUNES, 2006).

Possuem hábitos crepusculares e noturnos, sendo comuns em áreas de mata preservada, além de locais de vegetação em crescimento, plantações e outros cultivos. Para defender-se de predadores tem por hábito fingir-se de morto realizando tanatose, adquirindo posição encurvada e imóvel (HONMA; OKU; NISHIDA, 2006; MIYATAKE et al., 2004). Não tem comportamento agressivo para os seres humanos (PAIVA et al., 1992). A expectativa de vida de *Didelphis* spp. é de 2 a 4 anos (GONÇALVES et al., 2009). No Garrafão foi relatada uma expectativa de vida máxima para *Didelphis aurita* de 20 meses, sendo que nas fêmeas foi observado que quanto maior a taxa de fecundidade, menor a expectativa de vida. Poucos adultos sobrevivem de uma estação reprodutiva para a outra (KAJIN et al., 2008).

Apresentam focinho pontudo, vibrissas bem desenvolvidas, olhos proeminentes, orelhas membranosas e pelagem macia. Possuem tamanho médio, com comprimento de cabeça e corpo variando de 310-495 mm, e peso do adulto de 600 a 5100 g. A cauda é mais longa que o comprimento do corpo e sem pelos na sua maior parte. A pele exposta da cauda é variavelmente pigmentada, geralmente com base negra e ponta branca. Sua superfície é recoberta por escamas epidérmicas de formato hexagonal ou piramidal dispostas em espiral. A cauda é um órgão muscular e preênsil (VOSS; JANSA, 2009).

A abertura dos ductos urogenital e retal é inguinal, próxima e justaposta, e estes compartilham uma mucosa contínua, que normalmente fica recoberta por uma cloaca. O pênis

é bífido. A bolsa marsupial ou marsúpio é bem desenvolvido, com as pregas laterais se unindo na parte posterior, formando um recinto mais extenso que se abre anteriormente. As mamas se localizam no interior do marsúpio, e são em pares, mais uma mama central, variando em número, de 3-1-3=7 a 6-1-6=13 ou mais (VOSS; JANSÁ, 2009).

Em *Didelphis aurita* e *Didelphis marsupialis* os machos são maiores do que as fêmeas (CERQUEIRA; LEMOS, 2000). *D. marsupialis* pode alcançar 78 cm de comprimento total, sendo 45,6 cm de corpo e 32,4 cm de cauda. O peso pode chegar a 5,5 Kg (PAIVA et al., 1992a). As espécies de *Didelphis* apresentam 22 cromossomos (GARDNER, 2007; SVARTMAN, 2009) A temperatura corporal média de *Didelphis* é de 34,2°C e a frequência cardíaca varia de 120-240 bpm (WALLACH; BOEVER, 1983 apud PAIVA et al., 1991).

*Didelphis aurita* apresenta hábitos semi-terrestres, movendo-se com cuidado pelas árvores e utilizando a cauda como quinto membro. Na sua movimentação pelo estrato vertical frequentemente alcança o dossel, utilizando as garras para escalar. Em locais onde ocorre em simpatria com *Philander frenatus*, seu competidor direto, *D. aurita* utiliza mais frequentemente o estrato arbóreo, enquanto *P. frenatus* se restringe ao solo (CUNHA; VIEIRA, 2002). *D. aurita* tem membros anteriores maiores do que *P. frenatus*, o que provavelmente auxilia no hábito de escalar (VIEIRA, 1997). Exemplos de *D. aurita* foram observados em alturas de até 20 m. Indivíduos jovens tendem a utilizar o estrato arbóreo mais do que os adultos, provavelmente devido ao seu menor tamanho e para escapar de predadores (CUNHA; VIEIRA, 2005).

*Didelphis aurita* é considerada uma espécie comum em ambientes perturbados (D'ANDREA et al., 2007), e capaz de atravessar áreas de pasto e plantações para mudar de uma área de mata para outra, sendo caracterizada como tolerante à fragmentação (FORERO-MEDINA; VIEIRA, 2009). Em áreas com atividade humana, a área de atuação de *D. aurita* é ampliada pela maior oferta de alimentos. Isto foi observado para a região do Garrafão por Dinucci, Silva e Geise (2008).

### 1.1.3 Alimentação

Todas as espécies do gênero *Didelphis* possuem hábitos alimentares onívoros, ingerindo uma grande variedade de alimentos, como insetos, aves, ovos, pequenos mamíferos, frutas, sementes, folhas, répteis, anfíbios, crustáceos e moluscos, dependendo da região e disponibilidade (AGUIAR et al., 2004; CUNHA; VIEIRA, 2005; PAIVA et al., 1992b). Em cativeiro costuma-se oferecer ração para cães ou suínos, laranja, banana e fígado cru (PAIVA et al., 1992b). *Didelphis aurita* se alimenta principalmente de frutas e artrópodes (GENTILE et al., 2004), além de vertebrados. A diversidade de invertebrados ingerida por *D. aurita* é superior à de outras espécies mais insetívoras, como *Metachirus nudicaudatus* (SANTORI; ASTÚA DE MORAES; CERQUEIRA, 1995).

Macedo e Fernandez (2005) analisaram alimentação por amostras fecais em *Didelphis aurita*, encontrando artrópodes em 100% das amostras (principalmente Ordens Hymenoptera (família Formicidae) e Coleoptera), sementes em 82%, e penas em 11,7%. Não há variação de dieta entre machos e fêmeas, estações do ano ou período reprodutivo (LESSA; GEISE, 2010). Freitas et al. (1997) encontraram participação de invertebrados em 100% das amostras de *Didelphis aurita* analisadas, vertebrados em 30,8% e frutos em 53,8%.

A fórmula dentária de todas as espécies de *Didelphis* é I 5/4, C 1/1, P 3/3, M 4/4 x 2 = 50 (GARDNER, 2007; PAIVA et al., 1992; VOSS; JANSA, 2009), e somente o terceiro pré-molar é decíduo, sendo substituído por um dente de formato molar (GARDNER, 2007). Eles produzem fricção dos caninos superiores com os inferiores para produzir som durante a corte, disputas e quando a mãe quer chamar os filhotes. A abrasão causada pela fricção dos dentes, aliada à mastigação enérgica e ao tipo de dieta conduzem estes animais a um intenso desgaste dentário, mesmo quando jovens (AGUIAR et al., 2004).

É comum se observar perda de estrutura dental com exposição de dentina e fraturas dentárias nestes animais, com muito maior frequência quando comparado a outros grupos. Além disso, o único dente decíduo é o terceiro pré-molar, de forma que os demais dentes sofrem desgaste contínuo ao longo da vida sem substituição. Estes fatores somados fazem com que *Didelphis* apresente com frequência problemas dentários, dor e perda de funcionalidade, o que pode inclusive limitar o seu tempo de vida pela dificuldade de mastigar fazendo com que se alimentem cada vez menos (AGUIAR et al., 2004).

A estrutura anatômica do sistema digestório apresenta pouca variação em *Didelphis aurita* e *D. albiventris*, com o intestino delgado representando a maior porção do trato gastrointestinal (CÁCERES, 2005), e é simples e semelhante à de outros animais onívoros.

#### 1.1.4 Reprodução

O sistema reprodutor dos marsupiais é sua maior diferença para os outros mamíferos, sendo bífido nas fêmeas, com vagina e útero duplos, e placenta incompleta. O período de gestação é curto e os recém-nascidos são paridos em estágio embrionário. A bolsa marsupial ou marsúpio, que dá nome ao grupo não é a sua característica mais marcante, estando ausente em diversas espécies (SVARTMAN, 2009).

A reprodução de *Didelphis aurita* no Garrafão é sazonal, ocorrendo de julho a fevereiro (KAJIN et al., 2008), e até abril em outras áreas de mata atlântica (D'ANDREA et al., 2007). Os ninhos são feitos em buracos no solo, emaranhados de cipós nas copas das árvores e em ocos nos troncos (DELICIELLOS; LORETTO; ANTUNES, 2006). As fêmeas de *D. aurita* começam a reproduzir com cerca de cinco meses (KAJIN et al., 2008).

O período gestacional é de cerca de treze dias (GONÇALVES et al., 2009), podendo ocorrer duas ninhadas por ano (KAJIN et al., 2008). Por gestação são produzidos de cinco a 15 filhotes, que nascem com um cm de comprimento, e pesando cerca de 0,10 g (PAIVA et al., 1992). Na localidade do Garrafão, o tamanho das ninhadas de *D. aurita* foi de em média 7,33 indivíduos, variando de 6 a 10, com relação sexual de 1:1 (KAJIN et al., 2008).

Foi demonstrado que quanto maior a duração da estação reprodutiva, menor o tamanho das ninhadas, e quanto maior a latitude do local, maior o tamanho das ninhadas de *Didelphis*. Em climas mais frios, de maior latitude, as fêmeas tendem a ter uma ninhada por estação reprodutiva, com muitos filhotes. Em climas mais quentes e de menor latitude, as ninhadas são menores, porém podem ocorrer até três por fêmea durante a estação reprodutiva, que é maior (RADEMAKER; CERQUEIRA, 2006).

O útero das fêmeas de *Didelphis* sp. é duplo e paralelo, com cada um deles apresentando uma cérvix que se abre no seio vaginal. O canal vaginal consiste em duas vaginas laterais que se estendem até a pseudovagina e chegam ao seio urogenital. A existência

de duas vaginas influenciou na estrutura do pênis dos machos, que possui a glânde bifurcada para se adaptar às duas vaginas (GONÇALVES et al., 2009).

As fêmeas de *Didelphis* sp. possuem marsúpio em formato de ferradura na região abdominal caudal, com papilas mamárias no seu interior (SAMOTO et al., 2006). Após o nascimento os filhotes se dirigem para o marsúpio (GONÇALVES et al., 2009), onde se desenvolvem conectados às papilas mamárias, que aumentam de volume, auxiliando tanto a sucção do leite quanto a fixação do feto (SAMOTO et al., 2006).

O número de papilas varia entre as espécies, tendo sido descritas em número de 13 em *D. virginiana* e 11 em *D. albiventris*, sendo que as papilas craniais nem sempre são funcionais. O crescimento das glândulas mamárias em *D. albiventris* está atrelado ao desenvolvimento dos filhotes (SAMOTO et al., 2006). O tempo que os filhotes passam na bolsa marsupial grudados nas papilas mamárias excede bastante o período de gestação (GONÇALVES et al., 2009).

Os filhotes permanecem dentro do marsúpio ou bolsa marsupial por cerca de 70 dias, presos às tetas da mãe (figura 24). Após esse período começam a sair da bolsa marsupial, caminhando pelas costas da mãe, e um mês após a saída da bolsa se separam definitivamente da mãe (PAIVA et al., 1992). O desmame é o período mais crítico da vida de *Didelphis*, quando os animais devem iniciar a vida adulta, sendo ainda inexperientes e mais vulneráveis a predadores, sendo a fase de maior mortalidade (CUNHA; VIEIRA, 2005; FERREIRA et al., 2007; KAJIN et al., 2008).

Figura 3 - Filhote imaturo de *Didelphis aurita* dentro do marsúpio preso à teta da mãe.

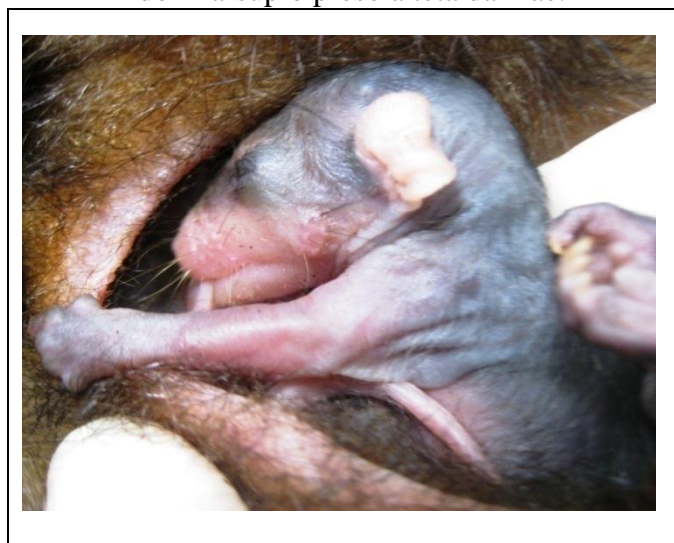


Foto: A autora, 2011.

Filhotes de *Didelphis* podem ser considerados embriões que entram na bolsa marsupial após um período gestacional de 12 a 15 dias. Neste estágio, os filhotes não apresentam linfócitos circulantes, e o timo é rudimentar. Na bolsa marsupial começa o amadurecimento dos linfócitos, e até o aparecimento destas células na corrente sanguínea, o baço exerce o papel de principal órgão hematopoiético (ROWLANDS; DUDLEY, 1969).

Assim, a resposta imune nos marsupiais em geral é mais lenta e menos acentuada do que nos mamíferos placentários, pois os filhotes nascem bastante imaturos, com capacidade imune rudimentar (JURD, 1994). O animal jovem não é imunologicamente competente, e a sobrevivência dos neonatos num ambiente rico em microrganismos depende das estratégias maternas, como a transferência de imunoglobulinas pelo leite e em algumas espécies pelo saco vitelínico no estágio pré-natal. As secreções da bolsa marsupial também exercem um papel na proteção imunológica dos filhotes (OLD; DEANE, 2000).

Em *Didelphis virginiana*, foi comprovado que quanto mais velho o indivíduo, mais vigorosa a sua resposta imunológica a vírus e a antígenos virais. Rowlands e Dudley (1969) sugerem que nesta espécie ocorra uma aquisição sequencial da capacidade de resposta imunológica ao longo do desenvolvimento, num período de tempo mais condensado do que o observado no gado.

Figura 4 - Filhotes de *Didelphis aurita* próximos à idade de desmame.



Foto: A autora, 2011.

A estimulação antigênica tem um papel importante no desenvolvimento do sistema imune, e o desenvolvimento dos filhotes no marsúpio ao invés do útero pode contribuir para o

amadurecimento tardio do sistema imune, já que na bolsa os filhotes têm pouco ou nenhum contato com antígenos maternos, enquanto no útero o contato é mais direto. Embora os marsupiais apresentem todas as classes de imunoglobulinas (JURD, 1994), a conversão de IgM a IgG ao longo do desenvolvimento é mais lenta em *Didelphis virginiana* do que em mamíferos placentários (ROWLANDS; DUDLEY, 1969).

A reprodução em cativeiro foi relatada em *D. marsupialis*, num viveiro com até 15 indivíduos, sendo três machos (PAIVA et al., 1992). A próstata de *D. virginiana* é um órgão heterogêneo dividido em três segmentos, cada um com morfologia celular, citoquímica e secreção de produtos distintos. Esta alta especialização entre os diferentes segmentos prostáticos está relacionada aos requisitos metabólicos das células espermáticas destes animais (MARTAN; ALLEN, 1965).

#### 1.1.5 Anatomia

Estudos anatômicos foram realizados em *D. albiventris* e podem ser extrapolados para as outras espécies. Assim, *Didelphis* possui vesícula biliar, e seu fígado é dividido em quatro lobos principais e mais o lobo caudado, que é apenas uma extensão do lobo lateral direito (NETO, 2000). O baço de *Didelphis* tem coloração cinzenta, formato irregular, sendo mais longo do que largo e encontra-se no lado esquerdo, ligado ao estômago pelo ligamento gastrolíenial (SILVA; MARTIN; GUAZELLI FILHO, 2005). Em *Didelphis virginiana* o baço não possui seios venosos, sendo classificado como não sinusal (HAYES, 1968), e provavelmente exerce uma função significativa como reservatório de sangue, como observado no marsupial australiano *Trichosurus vulpecula* Kerr 1792 (Diprotodontia: Phalangeridae) (DAWSON; DENNY 1968). O pâncreas tem conformação semelhante à de outros mamíferos, porém com maior predominância de ilhotas pancreáticas (FONSECA; NOGUEIRA; BARBOSA, 2004). O trato digestório de *Didelphis* segue o padrão geral de mamíferos, com estômago, intestino delgado, ceco e intestino grosso. O estômago é simples, com somente uma câmara e reniforme, e o intestino delgado é simples e tubular, de comprimento pequeno (SANTORI; ASTÚA DE MORAES; CERQUEIRA, 2004).



### 1.1.6 Ecologia

Estudos no sul do Brasil mostram que em áreas florestadas *D. aurita* estabelece suas áreas de vida em padrões agregados (CÁCERES, 2003), com baixa sobreposição durante a estação não reprodutiva. Quando são jovens, adquirem um perfil de dispersão exploratório em busca de áreas de vida próprias. Quanto maior a sua massa corporal, maior a sua área de vida (CÁCERES, 2003). Em áreas de floresta fragmentada, especialmente na ausência de grandes predadores, *Didelphis* spp. tendem a ser mais abundantes (KAJIN et al., 2008).

As fêmeas são consideradas residentes, com pouca sobreposição de áreas, tolerando a presença de vizinhos. Os machos são considerados mais errantes, poucos adquirindo áreas de vida fixas (CÁCERES, 2003; LORETTO; VIEIRA, 2005, MENDEL; VIEIRA; CERQUEIRA, 2008). *Didelphis* pode atuar como predador e competidor de outras espécies de pequenos mamíferos, e *D. aurita* é frequentemente uma espécie dominante entre esses mamíferos em áreas perturbadas (KAJIN et al., 2008).

No Garrafão, uma das áreas de estudo também deste trabalho, foi relatada para *Didelphis aurita* uma densidade populacional de 2,61 indivíduos/ha ( $\pm 1,16$ ), sendo este o marsupial mais abundante na região (DINUCCI; SILVA; GEISE, 2008). A relação sexual entre machos e fêmeas de *D. aurita* na área foi de 1:1.

Esta espécie tem sua densidade populacional correlacionada com a presença e quantidade de folhíço disponível no ambiente, pois utiliza o folhíço como fonte de obtenção de invertebrados, que formam grande parte da sua dieta (GENTILE et al., 2004; MENDEL; VIEIRA; CERQUEIRA, 2008). Como o período reprodutivo termina no fim do período de chuvas, este é o momento de maior tamanho populacional, e de maior abundância de recursos, o que aumenta as chances de sobrevivência da prole recém-desmamada (KAJIN et al., 2008).

### 1.1.7 Captura, manejo e coleta de amostras

Os gambás são capturados na natureza por meio de armadilhas de madeira com guilhotina (JORGE et al., 2008) ou de metal do tipo Sherman<sup>®</sup> e Tomahawk<sup>®</sup> (REJMANEK et al., 2009; TRUJILLO et al., 2010) com diferentes tipos de iscas (CARNEIRO et al., 2010; TARRAGONA et al., 2011). Já foi descrito na literatura o uso de frutas e vegetais (GOMES et al., 2003; PINTO et al., 2006; RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002), pasta de amendoim e

restos de carne (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; SALVADOR et al., 2007), frango, frutas e mel (TARRAGONA et al., 2011), sardinha enlatada (MARQUEZ et al., 2012), azeite de dendê e paçoca (CARNEIRO et al., 2010) manteiga de amendoim, aveia e essência de baunilha (TRUJILLO et al., 2010) e até pão com mel embebido em aguardente (PAIVA et al., 1992).

Por não apresentarem comportamento agressivo, a manipulação de *Didelphis* é facilitada, bastando utilizar a contenção manual (REJMANEK et al., 2009). Para isto se utiliza luvas de couro para proteção do manipulador, que então agarra firmemente a nuca do animal com uma mão e com a outra distende o seu dorso e pelve (PAIVA et al., 1992). Para a obtenção de dados biométricos e colheita de sangue, a contenção física é suficiente (CEUA, 2008).

Diversas técnicas de colheita de sangue têm sido relatadas para estudos em *Didelphis* spp., como a punção cardíaca após anestesia (CASAGRANDE et al., 2009; DIESCH et al., 1970; FERRARONI; MARZOCHI, 1980; FORNAZARI et al., 2011; JORGE et al., 2008; PINTO et al., 2006; RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002; TOLEDO et al., 1997), a punção da veia jugular (BLITVICH et al., 2009; CARNEIRO et al., 2010; CEUA, 2008), da veia mamária (CASAGRANDE et al., 2009), das veias femoral ou safena lateral (BLITVICH et al., 2009; CEUA, 2008) ou da veia caudal (CASAGRANDE et al., 2009; CEUA, 2008; FORNAZARI et al., 2011; REJMANEK et al., 2009; TARRAGONA et al., 2011). O volume de sangue coletado em geral é de dois a três ml, e para estudos de microscopia de parasitas, utiliza-se a heparina como anticoagulante (RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002).

É possível obter até 10% do volume total de sangue de um animal sem causar complicações ou comprometimento da vida, e amostras deste volume devem ser coletadas com pelo menos três a quatro semanas de intervalo (CEUA, 2008). A eutanásia de *Didelphis*, quando necessária, deve ser realizada por administração endovenosa ou intraperitoneal de superdosagem de barbitúricos (CEUA, 2008; LONG et al., 1975) como pentobarbital sódico (3 mg/2,5 kg de peso vivo) (MARQUEZ et al., 2012) e tionembital 6% (FONSECA; NOGUEIRA; BARBOSA, 2004).

A separação por faixa etária em gambás pode ser feita a campo através da análise da erupção dentária e comprimento total. Em trabalho no México, três grupos foram identificados: juvenis (3 a 5 meses), sub-adultos (6 a 9 meses) e adultos (mais de 9 meses) (PETRIDES, 1949 *apud* RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002). Segundo Macedo et al. (2006), quatro classes etárias podem ser definidas: neonatos e dependentes da mãe (classe I),

sub-adultos sexualmente imaturos (classe II), sub-adultos sexualmente maduros (classe III) e adultos (classe IV).

## 1.2 **Enfermidades**

Em vida livre, *Didelphis* sp. são frequentemente acometidos de lesões físicas como fraturas de membros, cauda e dentes. Estudos com indivíduos atropelados em rodovias mostram incidência alta de fraturas consolidadas (MEAD; PATTERSON, 2009). Em relação às enfermidades que afetam este grupo, a grande maioria dos estudos disponíveis se refere à *Didelphis virginiana*. Nesta espécie já foi descrita a osteodistrofia fibrosa ou osteíte fibrosa cística, uma condição degenerativa relacionada à disfunção da síntese de paratormônio, que provoca lesões na mandíbula e ossos faciais (LONG *et al.*, 1975).

A pneumonia lipídica é uma enfermidade respiratória relatada em *D. virginiana* de diversas regiões, com prevalência de cerca de 70% (BROWN, 1988; FITZGERALD *et al.*, 2003; MARQUEZ *et al.*, 2012). Embora assintomáticos, os animais afetados apresentam agregação de macrófagos repletos de lipídeos no espaço alveolar e no interstício pulmonar, por causas exógenas ou endógenas. A pneumonia intersticial exógena ocorre devido à aspiração iatrogênica de lipídeos (por exemplo, devido a uma sondagem nasotraqueal mal sucedida, em que ocorra aspiração de óleo mineral), enquanto a endógena se deve à produção excessiva de lipídeos, aliada à deficiência dos pulmões em metabolizá-los, o que acaba gerando acúmulo tecidual (MARQUEZ *et al.*, 2012). A pneumonia lipídica é geralmente idiopática, porém está associada ao parasitismo por *Dipelphostrongylus hayesi*, *Capillaria* sp. e *Besnoitia darlingi*, que são parasitas encontrados com frequência nos pulmões de *D. virginiana* (MARQUEZ *et al.*, 2012; BROWN, 1988).

### 1.2.1 Importância epidemiológica

As espécies de *Didelphis* possuem hábitos oportunistas, e podem viver em ambientes silvestres, rurais, peri-urbanos e urbanos (LUCHEIS *et al.*, 2009; TARRAGONA *et al.*,

2011). A capacidade de se adaptar a diferentes ambientes permite a estes animais estabelecer contato com outras espécies animais silvestres, domésticas, e com seres humanos. Este hábito de vida, denominado sinantrópico, coloca *Didelphis* como um grupo-chave na conexão entre o ciclo epidemiológico silvestre e o doméstico de parasitas e microrganismos (FORNAZARI *et al.*, 2011, TARRAGONA *et al.*, 2011). Por isso, *Didelphis* sp. é um grupo apontado por diversos autores como provável introdutor, dispersor e mantenedor de agentes infecciosos silvestres, com grande potencial de transmissão de zoonoses (ABEL *et al.*, 2000; RUIZ-PIÑA *et al.*, 2002, PENA *et al.*, 2011, FORNAZARI *et al.*, 2011).

Em vida livre, espécies de *Didelphis* são frequentemente encontradas infectadas com diversos parasitas e microrganismos de potencial zoonótico, sendo apontadas como hospedeiros naturais e reservatórios destes agentes. Entretanto, o papel deste grupo na epidemiologia de muitos agentes zoonóticos não foi avaliado (RUIZ-PIÑA *et al.*, 2002). Relatos na literatura destacam a participação deste grupo na epidemiologia de doenças como a toxoplasmose, a raiva (PAIVA *et al.*, 1992), a leptospirose (LUCHEIS *et al.*, 2009) e a doença de Chagas (RUIZ-PIÑA *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Utilização como modelo experimental

As espécies de *Didelphis* são consideradas um modelo experimental adequado e conveniente para diversas doenças, devido à sua fácil e barata manutenção em cativeiro, grande capacidade reprodutiva, abundância nas regiões tropicais e adaptabilidade à criação em cativeiro e em condições laboratoriais (TRUJILLO *et al.*, 2010). Estes animais já foram utilizados em pesquisas para inúmeros agentes de doenças, como: *Anaplasma marginale*, *Babesia* sp. *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. e vírus da estomatite vesicular (*D. marsupialis*) (PAIVA *et al.*, 1991, 1992; TRUJILLO *et al.*, 2010); *Brucella* sp., vírus da encefalite de Saint Louis, *Cryptosporidium parvum*, *Mycobacterium bovis* (*D. virginiana*) (DIEGEL *et al.*, 2002; FITZGERALD *et al.*, 2003; LINDSAY; HENDRIX; BLAGBURN, 1988; McCLEAN; FRANCY; CAMPOS, 1985; SCHNURREMBERGER *et al.*, 1985); e o vírus da varíola (*D. aurita*) (MOREIRA, 1955) .

### 1.2.3 Vírus

Poucos estudos com vírus em espécies de *Didelphis* são encontrados na literatura. Blitvich et al. (2009) estudando 13 *D. virginiana* nos Estados Unidos encontraram cinco deles positivos para flavivírus, correspondendo a uma soroprevalência de 48%. Em dois destes animais o flavivírus era o vírus da Febre do Oeste do Nilo, uma prevalência de 15%.

O vírus da encefalite de Saint Louis foi testado experimentalmente em três *D. virginiana* nos Estados Unidos, porém foi demonstrado que estes animais não foram capazes de estabelecer viremias, sendo pouco suscetíveis ao agente (McCLEAN; FRANCY; CAMPOS, 1985). No Brasil, *D. aurita* foi testado experimentalmente para o vírus da varíola, mostrando-se susceptível (MOREIRA, 1955).

Em *D. marsupialis* foi testado o vírus da estomatite vesicular em infecções experimentais na Colômbia. Este vírus infecta diferentes espécies animais, incluindo o homem. Lesões como feridas, úlceras e erosão sanguinolenta foram observadas entre 48 e 72 horas após a inoculação. Não houve a formação de vesículas e nenhum animal chegou ao óbito. *D. marsupialis* é comprovadamente suscetível ao vírus da estomatite vesicular, sendo capaz de eliminar o vírus por diversas vias, o que indica que esta espécie provavelmente participa do ciclo deste vírus como hospedeiro e transmissor (TRUJILLO et al., 2010).

### 1.2.4 Fungos

Existem poucos relatos de infecção fúngica em espécies de *Didelphis*. *D. marsupialis* foi encontrado naturalmente infectado por *Histoplasma capsulatum*. Silva-Vergara et al. (2001) investigaram órgãos de 20 *D. albiventris* de Minas Gerais em busca de *Paracoccidioides brasiliensis*, não encontrando resultado positivo por isolamento em cultura, xenodiagnóstico ou lesões histológicas. O que sugere que esta espécie não seja frequentemente infectada por este fungo, ou que tenha mecanismos para bloquear o seu desenvolvimento.

*Malassezia pachydermatis* foi relatada em cerúmen e pêlos do meato acústico de um *D. albiventris* enfermo por esteatose hepática. Esta levedura é um componente da microbiota

da pele, tendo sido isolada em diversas espécies como comensal, porém podendo passar à condição de parasita mediante alterações favoráveis de temperatura e umidade (MENDES et al., 2009).

### 1.2.5 Bactérias

Em estudo com mucosa conjuntival de *D. virginiana*, foram cultivadas bactérias aeróbias de todos os animais analisados, caracterizando uma microbiota conjuntival semelhante à do cão e do gato (PINARD et al., 2002). A bactéria mais frequentemente encontrada foi *Staphylococcus* (82% dos animais) sendo identificadas as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. intermedius*. Em seguida, segundo a frequência foram isolados *Streptococcus* spp. (29%), *Bacillus* spp. (29%), *Corynebacterium* spp. (12%) e *Enterococcus faecalis* (6%). 65% dos gambás apresentaram mais de uma bactéria crescendo simultaneamente na amostra. Por PCR se identificou *Chlamydomyxa* (18%) e *Mycoplasma* (12%) nas amostras, porém sem obter cultivo (PINARD et al., 2002).

Em estudo de microbiota de cavidade oral em *D. virginiana*, Howell e Dalsey (1990) coletaram amostras de saliva e de placa dental, onde identificaram cocos gram positivos como *Streptococcus* alfa e gama, *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo. Outros microrganismos isolados foram *Neisseria* spp., *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Flavobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Oerskovia* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., e *Corynebacterium* spp. Das placas dentais foram isoladas *Eikenella corrodens* e *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*. As bactérias mais prevalentes foram *Streptococcus* alfa, *Bacillus* spp. E *E. coli*.

Bactérias do tipo *Streptococcus* podem atuar como agentes virulentos ou participar da microbiota normal de mamíferos e do homem, como comensais inócuos (RURANGIRWA et al., 2000). Este microrganismo é comumente encontrado colonizando as membranas mucosas e a pele, podendo ser isolado como microbiota normal dos tratos digestório e genital (RUOFF, 1995 *apud* RURANGIRWA et al., 2000). Uma nova cepa de *Streptococcus* foi descrita em *D. virginiana*, causando septicemia e lesões cutâneas necróticas, além de fibrose hepática centrolobular, periportal ou ambas, ou ainda áreas multifocais de necrose hepática (RURANGIRWA

et al., 2000). Esta nova cepa, mais próxima do *S. dysgalactiae*, porém geneticamente diferente de todas as espécies de *Streptococcus* conhecidas, foi proposta como *Streptococcus didelphis*.

Schnurrenberger et al. (1985) isolaram *Brucella abortus* em *D. virginiana* nos Estados Unidos e demonstraram que estes animais, assim como outros animais selvagens podem se infectar com *B. abortus* ao revirar fetos e placenta do gado infectado. Apesar disso, há evidências de que as espécies selvagens não seriam boas mantenedoras nem transmissoras da bactéria. Experimentalmente foi demonstrado que *D. virginiana* é suscetível a *B. abortus*, podendo permanecer infectado por até 19 semanas, porém não é competente na eliminação do microrganismo, exceto por um curto período de carregamento mecânico no trato intestinal (SCHNURRENBERGER et al., 1985).

Diversos estudos foram feitos com tuberculose em *D. virginiana*, e esta espécie não é considerada um hospedeiro ou vetor importante para esta doença (PEDERSEN; MANNING; CORN, 2008). Nos Estados Unidos, foi comprovada a susceptibilidade de *D. Virginia* ao *Mycobacterium bovis* em inoculação por via oral e intramuscular. Nenhum dos animais apresentou evidência de doença, mantendo a condição corporal e o ganho de peso. *D. virginiana* parece ser um hospedeiro ocasional bastante resistente à infecção por *M. bovis* (DIEGEL et al., 2002)

*D. virginiana* são passíveis à infecção por aerossóis contaminados com *Mycobacterium bovis*, apresentando pneumonia granulomatosa multifocal e linfonodos torácicos aumentados, e raramente hepato e esplenomegalia. Todos os animais permaneceram sem sinais clínicos, e tiveram em sua maioria somente acometimento pulmonar, mostrando que *D. virginiana* pode ser hospedeiro de *M. bovis*, mas tem pouca capacidade de transmitir a doença para o gado (FITZGERALD et al., 2003).

Em estudo de prevalências naturais em *D. virginiana*, Witmer et al. (2010) encontraram casos positivos para *Mycobacterium bovis*, *M. avium* e *Nocardia* spp. em área onde houve casos de tuberculose bovina. A prevalência no local foi de 3% para a espécie e os autores sugerem que estes animais se infectem por escavar e revirar carcaças infectadas. Pedersen, Manning e Corn (2008) não encontraram *D. virginiana* positivos para *M. avium* subsp. *paratuberculosis* na Flórida.

O bacilo da hanseníase humana, *Mycobacterium leprae*, foi inoculado experimentalmente em *Didelphis* spp. por vias intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intrapleural e óssea, sem sucesso. Já em experimento com a lepra murina, inoculada na região inguinal, *D. aurita* foram suscetíveis, mostrando lesões pulmonares e em gânglios linfáticos,

mostrando susceptibilidade desses animais à lepra dos ratos, mas não à lepra humana (LINHARES, 1943).

Em São Paulo o estudo de Horta et al. (2007) mostrou que 68,1% dos *Didelphis* analisados (43 *D. aurita* e 21 *D. albiventris*) apresentaram reação positiva para *Rickettsia rickettsii* e *R. parkeri*, colocando *Didelphis* junto com gatos domésticos como excelentes sentinelas para estes dois agentes na região estudada. *R. rickettsii* foi identificada também em *D. virginiana*, e acredita-se que as espécies de *Didelphis* participem do ciclo deste agente como amplificadores naturais.

Numa avaliação de fezes de *D. virginiana* quanto a presença de *Salmonella entérica* no México, de 17 animais estudados cinco (29,4%) apresentaram-se positivos. Todas eram fêmeas com filhotes na bolsa marsupial capturadas no ambiente Peri-doméstico durante a estação seca, que é o período de maior incidência de infecção entre mamíferos (RUIZ-PINA et al., 2002).

#### 1.2.5.1 Borreliose

A Borreliose é uma doença causada por bactérias patogênicas do gênero *Borrelia*, transmitidas por carrapatos e piolhos humanos (BARBOSA, 1997). Nas duas últimas décadas, uma série de casos humanos provocados pela *Borrelia burgdorferi* (o agente causal da doença de Lyme) têm sido registrados, e a Borreliose tem ganhado importância (ABEL et al., 2000). Os principais reservatórios de *Borrelia burgdorferi* são os roedores, e na ausência destes os pequenos mamíferos, inclusive espécies de *Didelphis* (BARBOSA, 1997). Em Seropédica, infecção natural com prevalência de 23,21% de *B. burgdorferi* foi relatada em *D. aurita*, sem nenhum sinal clínico de doença (ABEL et al., 2000). Em estudo anterior, Barbosa (1997) encontrou infecção detectável somente após imunossupressão com ciclofosfamida.

O diagnóstico laboratorial é feito através da microscopia de contraste de fase e campo escuro, pois a observação direta do esfregaço sanguíneo é eficaz somente em casos de alta espiroquetemia. Em animais silvestres a espiroquetemia de *Borrelia* sp. é reduzida pela sua preferência pelo espaço intersticial, sendo mais fácil isolar a bactéria nos órgãos e tecidos do que encontrá-la no sangue (GORDUS; THEIS, 1993). Em *D. aurita* a observação de parasitos no esfregaço sanguíneo é dificultada pela baixa espiroquetemia, exceto em indivíduos juvenis



passando pela primeira infecção. Mesmo assim, exames seriados mostram que ocorre uma redução da espiroquetemia ao longo do tempo (ABEL et al., 2000).

#### 1.2.5.2 Leptospirose

A leptospirose é uma doença de grande importância na saúde pública, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que causam infecção aguda e crônica em humanos e outros animais (LUCHEIS et al., 2009). É uma enfermidade relacionada principalmente a baixas condições de infraestrutura sanitária, como ocorre em muitas regiões do Brasil. Acomete a população de baixa renda exposta a condições precárias de vida, além de alguns grupos profissionais, como veterinários, trabalhadores de abatedouro e tratadores de animais. Nos animais de criação a leptospirose provoca prejuízos econômicos por causar problemas reprodutivos (SILVA et al., 2010), e pode também infectar hospedeiros acidentais (LUCHEIS et al., 2009).

A *Leptospira* é eliminada pela urina de indivíduos acometidos, e nas grandes cidades os roedores do gênero *Rattus* são os principais dispersores da bactéria. Inundações favorecem a disseminação e a persistência do agente da doença no meio ambiente, pois as águas de esgoto contaminadas com urina de roedores misturam-se às águas da chuva e de rios, facilitando a ocorrência de surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A prevenção da doença deve ser feita através do controle de roedores, saneamento básico, remoção de lixo e restos orgânicos que possam atrair animais sinantrópicos e a eliminação de pontos de água parada e alagamentos (LUCHEIS et al., 2009).

No ambiente natural, a epidemiologia da leptospirose é complexa e envolve diversas classes animais. Num estudo nos EUA foram identificadas numa mesma área sete espécies de mamíferos silvestres envolvidas na epidemiologia da doença, além de resultados sorológicos positivos em quelônios, sapos e peixes. Entretanto, o papel ecológico da vida selvagem na transmissão da leptospirose ao homem ainda é de difícil compreensão (DIESCH et al., 1970).

Marsupiais e roedores já foram apontados como os reservatórios mais importantes de *Leptospira* spp. (LUCHEIS et al., 2009), e o gênero *Didelphis* vem sendo assinalado por diferentes autores como suspeito de participar da epidemiologia da doença em áreas periurbanas e rurais, como reservatório ou transmissores (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS,

2007;DIESCH et al., 1970;SILVA et al., 2010). Estes animais têm hábito sinantrópico, transitando em diferentes ambientes e circulando próximos a criações domésticas e residências humanas. Seres humanos podem se expôr diretamente ao contato com *Didelphis* através da caça ou indiretamente por partilhar o mesmo ambiente (DIESCH et al., 1970).

*Didelphis* já foi descrito como reservatório de vários sorovares de *Leptospira* como *ballum*, *bataviae*, *icterohaemorrhagiae*, *swajizam* e *grippotyphosa* (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2007; DIESCH et al., 1970). Seis novos sorovares foram descritos por Hidalgo e Sulzer (1984 *apud* Jorge et al., 2008) neste gênero no Peru. Os sinais clínicos da doença em geral são difíceis de serem detectados em animais silvestres, porém podem estar presentes (DIESCH et al., 1970).

Em Jaboticabal/SP um trabalho com *D. albiventris* de vida livre demonstrou 44% de indivíduos reativos para *Leptospira* pela soroaglutinação microscópica (SAM), tendo sido testados 24 sorovares, e considerados reativos os sorovares *patoc* (20%), *autumnalis* (12%) e *icterohaemorrhagiae* (12%). As amostras reativas foram coletadas no outono e inverno (SILVA et al., 2010). Já em Bauru/SP a SAM detectou alta reatividade para diversos sorovares, sendo os mais prevalentes *copenhageni* (82%), *patoc* (64.1%) e *ecynopteri* (53.8%). Entre animais sinantrópicos, o sorovar *copenhageni* é conhecido como uma fonte de infecção importante de leptospirose, sendo responsável pela manutenção do agente e originando infecção no homem e outros animais. Neste estudo foi evidenciado um alto grau de infectividade da *Leptospira* em *Didelphis* (LUCHEIS et al., 2009).

No México, Ruiz-Piña et al. (2002) testaram soros de *D. virginiana* para diferentes cepas de *Leptospira*, encontrando reatividade em quatro animais (4,9%). Três foram reativos ao sorovar *pomona* e um ao *wolffi*, e todos foram capturados ao redor de casas na estação chuvosa, período em que ocorrem a maioria dos casos da doença. Dois estudos realizaram a cultura e isolamento de *Leptospira* a partir de *Didelphis*, um no sul do Brasil e outro nos EUA. No Brasil Jorge et al. (2008) testaram 32 amostras de urina de *D. albiventris*, isolando uma bactéria patogênica do gênero *Leptospira*, porém não *L. interrogans*.

Nos EUA, Diesch et al. (1970) utilizaram diferentes métodos de diagnóstico para identificar infecção por *Leptospira* em *D. virginiana*, a soroaglutinação macroscópica em lâmina, a microscopia de campo escuro de suspensão de rim, o isolamento em meio de cultura e a análise histopatológica com coloração especial. Para *Didelphis* a soroaglutinação macroscópica mostrou-se mais sensível do que a microscópica. O isolamento demonstrou presença do sorovar *ballum*.

## 1.2.6 Parasitas

### 1.2.6.1 Endoparasitos

Diversos parasitas já foram encontrados em espécies de *Didelphis*. *Dracunculus fuelleborni* foi descrito como parasita de tecido subcutâneo em *D. aurita* (TRAVASSOS, 1934). *Aspidodera raillieti* e *Cruzia tentaculata* também foi encontrados parasitando o intestino grosso de *D. aurita*. Nesta mesma espécie, *Turgida turgida* foi encontrada parasitando estômago e *Gongylonemoides marsupialis* esôfago. No trato digestório também foi relatada a presença do trichostrongyloidea *Viannaia hamata*, sozinho ou em co-infecção com *A. raillieti*, *C. tentaculata* e *T. turgida* (GOMES et al., 2003).

Um mesmo indivíduo de *Didelphis* pode abrigar uma grande quantidade de parasitos. Em estudo com *D. virginiana* nos Estados Unidos da América, cada animal examinado apresentou infecção com 1 a 2.583 vermes (com média de intensidade de helmintos de 544) de 1 a 6 espécies diferentes (média de riqueza de espécies de 3,4). Foram relatados três nematóides, *Capillaria* sp. e *Physaloptera turgida* no estômago e *Cruzia americana* no intestino delgado, grosso e ceco; três trematóides, *Brachylaima virginiana*, *Brachylaima didelphis* e *Didelphodiplostomum variabile* no intestino delgado e um cestóide *Mesocestoides* sp. também do intestino delgado. Os mais comuns foram *P. turgida* e *C. americana* (RICHARDSON; CAMPO, 2005). Rejmanek et al. (2009) encontraram em *D. virginiana* na Califórnia ovos de *Cruzia americana*, *Turgida turgida* e *Didelphistrongylus hayesi*.

*Didelphis virginiana* é o hospedeiro definitivo de *Gnathostoma turgidum*, parasita que se desenvolve no fígado, já tendo sido encontrado também no estômago de *D. aurita*. A migração larval do *Gnathostoma* nos órgãos do hospedeiro afetado provoca a gnatostomose, doença que pode ser adquirida pelo homem através da ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo a larva do parasito, sendo uma infecção comum em países de alto consumo de peixe cru, como Japão e Tailândia (DIAZ-CAMACHO et al., 2010).

### 1.2.6.2 Ectoparasitos

*Didelphis* é considerado o gênero de marsupial mais importante em número de espécies de ectoparasitas, tendo sido registradas até 42 espécies de parasita para o gênero. Porém, nem todos refletem associações verdadeiras, podendo ser somente associações secundárias ou acidentais. A prevalência de ectoparasitas em ambiente de ilhas parece ser maior do que no continente (SALVADOR et al., 2007).

Nos Estados Unidos Nelder et al. (2009) encontraram o carrapato *Dermacentor variabilis* em *D. virginiana*. Em Santa Catarina relatou-se para *D. aurita* os carrapatos ixodídeos *Amblyomma aureolatum* Pallas 1772, *Amblyomma cajennense* Fabricius 1787 e *Ixodes loricatus* Neumann 1899 (SALVADOR et al., 2007). *A. cajennense* e *I. loricatus* também foram descritos em *D. aurita* e *D. albiventris* em São Paulo (HORTA et al., 2007).

Estudos recentes indicam a importância de *Didelphis* sp. e outros pequenos mamíferos como hospedeiros alternativos de formas imaturas de *Amblyomma dubitatum*, como observado para outras espécies do gênero *Amblyomma*. Larvas e ninfas de *A. dubitatum* já foram descritas em *D. aurita* (HORTA et al., 2007) e *D. albiventris* (NAVA et al., 2010), e seu hospedeiro definitivo são as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

Quanto a pulgas, *Adoratopsylla intermedia* Jordan 1926, *Leptopsylla segnis* Schönherr 1811 e *Xenopsylla cheopis* Rothschild 1903, todas da Ordem Siphonaptera foram encontradas em *D. aurita* no Brasil (SALVADOR et al., 2007). *Ctenocephalides felis felis*, *Polygenis (Neopolygenis) atopus* e *Rhopalopsyllus lutzi lutzi* foram descritas para *D. aurita* e *D. albiventris* (HORTA et al., 2007). *Ctenocephalides felis* também foi relatada em *D. virginiana* nos Estados Unidos, inclusive carreando *Bartonella clarridgeiae*, uma bactéria intracelular que pode causar doença em gatos e no homem (NELDER et al., 2009).

Comparando prevalências de infestação por ectoparasitos em ilhas e no continente, Salvador et al. (2007) encontraram valores variando de 14,3 a 100% de infestação. Em Seropédica, no Rio de Janeiro, Abel et al. (2000) observaram uma prevalência de 16,07% de gambás apresentando ectoparasitas, sendo identificadas pulgas do gênero *Ctenocephalides* e carrapatos *Amblyomma cajennense*. Os ácaros *Listophorus dozieri*, *Ornithonyssus wernecki*, *Archaemyobia inexpectatus* e *Androlaelaps fahrenheitsi* foram relatados em *D. virginiana* nos Estados Unidos.

### 1.2.6.3 Protozoários

Protozoários também foram descritos no gênero *Didelphis*, como *Besnoitia darlingi*, uma espécie de coccídeo da família Sarcocystidae foi descrito em *D. Marsupialis* no Brasil (Amazônia) e *D. virginiana* nos Estados Unidos e México. Ele infecta as células e se multiplica assexuadamente no seu interior, destruindo-as. Pode levar à morte rapidamente em infecções agudas e generalizadas, ou tornar-se crônico com o parasita encistado predominantemente no tecido conjuntivo (NAIFF; ARIAS, 1983), formando cistos teciduais em diversos órgãos, principalmente nas glândulas adrenais e orelhas (SHAW et al., 2009).

As espécies de *Didelphis* servem como hospedeiros intermediários, infectando-se após ingerir tecido contaminado ou oocistos excretados pelos hospedeiros definitivos, que ainda não foram identificados na natureza. Experimentalmente os gatos domésticos foram descritos como hospedeiros definitivos (SHAW et al., 2009). Animais parasitados por *B. darlingi* frequentemente são assintomáticos, e apresentam cistos em órgãos e tecidos, principalmente no fígado e nos músculos. Nos Estados Unidos foi observado acometimento sistêmico em um indivíduo, com lesões teciduais nodulares, multifocais, na pele, tecido subcutâneo, músculo e diversos órgãos, acompanhadas de infiltrado inflamatório granulocítico, degeneração e mineralização. O animal acometido apresentava ainda infecções concomitantes por *Didelphostrongylus*, *Physoloptera*, e Tricostrôngilos, e fratura exposta na pata (SHAW et al., 2009).

Infecções concomitantes por outros parasitas foram relatadas também por Naiff e Arias (1983), onde de 15 animais com resultado positivo para *B. darlingi*, 12 apresentavam também infecção por *T. cruzi* e/ou *Leishmania brasiliensis guyanensis*. O estresse provocado pela associação de parasitoses e/ou condições clínicas promove a liberação de corticóides endógenos que podem contribuir para o agravamento da infecção por *B. darlingi*, levando a disseminação maciça com lesões severas (SHAW et al., 2009).

No sul do Brasil, Zanette et al. (2008) encontraram em seis *D. albiventris* infecções isoladas e conjuntas por *Eimeria* sp., *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp., sendo esta última o primeiro registro para a espécie. Os animais estudados apresentaram infecções moderadas, sem sinais clínicos de parasitoses. Parasitas como *Cryptosporidium* sp., que afetam indivíduos imunossuprimidos, podem se favorecer de infecções mistas com outros protozoários. Em

estudo experimental, Lindsay, Hendrix e Blagburn (1988) demonstraram a suscetibilidade de filhotes de *D. virginiana* ao *Cryptosporidium parvum*, porém sem letalidade.

Lallo e colaboradores (2009) descreveram microsporídios semelhantes a *Encephalitozoon* nas fezes de *D. aurita*. Houk e colaboradores (2010) encontraram em *D. virginiana* anticorpos para *Encephalitozoon cuniculi*. Microsporídeos são protozoários primitivos, intracelulares obrigatórios, que parasitam vertebrados e invertebrados, causando infecções intestinais e sistêmicas, dependendo da capacidade imunológica do hospedeiro.

#### 1.2.6.4 Sarcocistose

A sarcocistose ou encefalite protozoária eqüina (EPE) é uma enfermidade importante causada pelo protozoário *Sarcocystis neurona* que vem provocando inúmeros prejuízos às criações de eqüinos (REJMANEK et al., 2009). As espécies de *Didelphis* são hospedeiros definitivos de *Sarcocystis*, especialmente *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri*, sendo uma peça importante na epidemiologia da doença (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001). A distribuição da EPE acompanha a distribuição das espécies de *Didelphis* (DUBEY et al., 2000a).

Os indivíduos de *Didelphis* infectam após ingerir cistos de *Sarcocystis* presentes no músculo dos hospedeiros intermediários, as aves. No intestino do marsupial o parasita se reproduz sexualmente gerando oocistos, que são eliminados nas fezes e vão infectar aves e equinos. Nos equinos o parasita se desenvolve até uma fase não infecciosa, de forma que os cavalos não transmitem o parasita (LINS et al., 2011). No sul do Brasil, Lins et al. (2011) encontraram prevalência de 100% para *Sarcocystis* em *D. albiventris* atropelados, sendo um animal positivo para *S. neurona*. Nos Estados Unidos, Rejmanek et al. (2009) analisaram 288 *D. virginiana* e encontraram esporocistos ou oocistos esporulados de *Sarcocystis* spp. em 18,4% destes (5,9% eram *S. neurona*; 10,4 % *S. falcatula* e 2,1% uma espécie não identificada de *Sarcocystis*).

Em São Paulo *D. albiventris* foi encontrado parasitado por uma espécie parecida com *S. falcatula* (DUBEY et al., 2000a), posteriormente identificada como uma nova espécie, *S. lindsayi* (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001). *Didelphis marsupialis* foi encontrado naturalmente infectado por *S. speeri* (DUBEY et al., 2000b). *Sarcocystis* spp. foi encontrado em

análise histológica de diversos órgãos de *D. virginiana* (DIEGEL et al., 2002). Houk e colaboradores (2010) encontraram nos Estados Unidos prevalência de anticorpos de 17% para *Sarcocystis neurona* em *D. virginiana*.

#### 1.2.6.5 Leishmaniose

A leishmaniose visceral é uma doença grave causada por protozoários do gênero *Leishmania* transmitida por vetores aos seres humanos, cães e outros mamíferos, principalmente os sinantrópicos. A transmissão se dá pela picada de insetos flebotomíneos, sendo que no Brasil o complexo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor. O cão doméstico é considerado o hospedeiro definitivo do parasita, e o homem um hospedeiro acidental. Os cães geralmente têm uma alta prevalência de infecção, um alto potencial infeccioso e infecções de longa duração. A infectividade dos cães para os vetores aumenta conforme aumentam os sinais clínicos da doença, entretanto, dos cães potencialmente infectantes, a severidade de sinais clínicos não interfere na taxa de infecção de vetores (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Outros modos de transmissão já foram descritos, como a transmissão congênita (MEINECKE et al., 1999; PAGLIANO et al. 2005; ROSYPAL et al., 2005) e por via sexual (SILVA et al., 2009; SYMMERS, 1960 *apud* QUINNELL; COURTENAY, 2009) em cães e humanos e por transfusão de sangue (OTERO et al., 2000 *apud* QUINNELL; COURTENAY, 2009) e transplante de órgãos (ANTINORI et al., 2008 *apud* QUINNELL; COURTENAY, 2009) em humanos.

A grande maioria das infecções naturais em animais silvestres tende a ser assintomáticas. *Didelphis* spp. têm uma alta taxa de prevalência de infecção na Colômbia e partes do Brasil, e tem sido demonstrada a sua capacidade de transmitir a infecção (QUINNELL; COURTENAY, 2009). *D. albiventris* foi o primeiro animal selvagem não canídeo encontrado naturalmente infectado por *Leishmania donovani* no Novo Mundo (SHERLOCK et al., 1984). No estado da Bahia *L. donovani* foi encontrada em *D. albiventris* naturalmente infectado, capturado próximo a residências onde foram registrados casos humanos e caninos. Na região, *D. albiventris* é o mamífero silvestre mais abundante ao redor

das moradias, e o vetor da leishmaniose visceral, indivíduos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, é visto frequentemente se alimentando neste marsupial (SHERLOCK et al., 1984).

Uma nova espécie do gênero *Leishmania* foi descrita em *D. marsupialis*, e nomeada *Leishmania forattinii*, sendo considerada pertencente ao grupo *L. mexicana* (YOSHIDA et al., 1993). Outras espécies de *Leishmania* têm sido descritas infectando gambás, entre elas *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. chagasi* (GRIMALDI Jr.; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989 *apud* YOSHIDA et al., 1993; LAINSON; SHAW, 1987 *apud* YOSHIDA et al., 1993).

Em relação à leishmaniose tegumentar americana (LTA), o gambá tem sido descrito como principal hospedeiro do parasita na região amazônica, principalmente por transitar no peri-domicílio e assim conectar os ciclos silvestre e urbano da doença (ARIAS; NAIFF, 1981; LAINSON et al., 1984). Nos locais em que a LTA é causada pela *Leishmania guyanensis*, os reservatórios silvestres como *D. marsupialis* têm causado maior preocupação, pois a sua fácil adaptação em ambientes alterados os põe em circulação entre o meio florestal, onde se infectam, e o meio humano, onde se tornam fonte de infecção a flebótomos (GUERRA et al., 2007), sendo considerados como importante reservatório secundário do parasita. A invasão de novas terras e manejo da mata pode causar perturbação no ciclo silvestre da doença fazendo com que animais silvestres saiam de seu habitat natural em busca de alimento. Os vetores também podem se adaptar a esta condição realizando hematofagia nos animais domésticos e no homem, dando origem a surtos da doença (GUERRA et al., 2007).

#### 1.2.6.6 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma enfermidade importante de regiões tropicais, ocasionada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por triatomíneos ao homem (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). Diversos animais domésticos e silvestres têm sido descritos como suscetíveis ao *T. cruzi* e outros tripanossomas, e alguns destes animais parecem ter maior importância no ciclo de transmissão do parasita.

Especialmente, os animais sinantrópicos possuem um papel epidemiológico destacado, por conectarem o ciclo silvestre, peridomiciliar e domiciliar da doença de Chagas, levando parasitas ou novas cepas destes ao contato com o homem através dos triatomíneos



(ZELEDÓN, 1974 *apud* Pinto et al., 2006). Cães, gambás, tatus e roedores têm sido descritos como importantes reservatórios da doença em ambientes peridomiciliares (BARRETO, 1979 *apud* GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). Diversos estudos em diferentes localidades do Brasil (GUIMARÃES; JANSEN, 1943; GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; TOLEDO et al., 1997) sustentam *Didelphis* spp. como os principais hospedeiros sinantrópicos de *T. cruzi* (WHO, 1991 *apud* RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002), sendo o grupo mais naturalmente infectado entre os animais silvestres. É comum o achado de triatomíneos, vetores da doença de Chagas, em ninhos de gambás próximos a residências humanas (GUIMARÃES; JANSEN, 1943; SANTOS et al., 2005; RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002). Essa estreita convivência entre hospedeiro e vetor aumenta a infectividade do triatomíneo (RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002) e a possibilidade de infecção humana (TOLEDO et al., 1997). Estes dados reforçam o gambá como a provável espécie que faz a conexão entre os ciclos de transmissão silvestre e peridoméstico da doença (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004).

No Paraná se observou uma taxa de infecção de 57,1 % (TOLEDO et al., 1997), no Rio de Janeiro, de 30% (GUIMARÃES; JANSEN, 1943), no cerrado de 33% (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004), e em São Paulo de 14,5% (FORATTINI et al., 1978). No México, estudos com *D. virginiana* mostraram taxa de infecção de 53,9%, sendo os adultos mais frequentemente infectados do que os subadultos, e estes do que os juvenis. Esta espécie é tida como capaz de manter por até dois anos a infecção natural ou experimental pelas cepas locais de *T. cruzi* (RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002).

*T. cruzi* apresenta grande variabilidade, tendo sido identificadas por análises genéticas e enzimáticas diversas populações do parasita. Atualmente são descritos dois “grupos maiores”, *Trypanosoma cruzi* I e II. O grupo conhecido como TC I é tido como de forte e antiga associação com gambás e triatomíneos (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). Alguns estudos relacionam o TCI aos marsupiais, especialmente gambás, e o TC II a espécies placentárias, inclusive seres humanos (MILES; FELICIANGELI; ROJAS, 2003 *apud* GURGEL-GONÇALVES et al., 2004).

Embora nem todas as espécies de triatomíneos sejam boas vetoras da doença de Chagas, modificações do habitat, como o desmatamento, podem alterar os hábitos desses insetos, aumentando a convivência com seres humanos e as taxas de transmissão do parasita (SANTOS et al., 2005). Essas e outras alterações ambientais afetam os nichos ecológicos das doenças, facilitando a transmissão (LALLO et al., 2009). Entre os vetores conhecidos,

*Panstrongylus megistus* parece ser o mais importante na transmissão a partir de hospedeiros sinantrópicos (como marsupiais e roedores), enquanto *Triatoma infestans* é mais importante para os animais domésticos.

*P. megistus* tem franca tendência à sinantropia, com grande poder invasivo em relação à ecótopos artificiais, como ninhos de *Didelphis* spp. em casas abandonadas ou forro de casas habitadas, tendo sido comprovado o repasto sanguíneo em espécies de *Didelphis* (FORATTINI et al., 1978). A ocupação de casas abandonadas por *Didelphis* e pelo triatomíneo pode representar uma etapa intermediária entre o ambiente domiciliar e extradomiciliar, aumentando a possibilidade de reinstalação do ciclo domiciliar da tripanossomíase em áreas onde o *T. infestans* já tenha sido erradicado. Este quadro parece ser bastante característico de áreas rurais, e pode contribuir para a manutenção de uma baixa taxa de infecção em cães nessas áreas (FORATTINI et al., 1978).

*Didelphis* podem se contaminar com *T. cruzi* pela ingestão de outros animais ou triatomíneos infectados. Em focos naturais da doença podem se infectar pela via oral, pois possuem hábitos onívoros, e iniciar novos focos de transmissão, já que mudam bastante de local de alimentação, perambulando pelas áreas domiciliares e extradomiciliares. Isso demonstra a posição destacada que esta espécie tem dentro da epidemiologia da doença de Chagas como elo entre o ambiente silvestre e o domicíliar (RIBEIRO; GARCIA; BONOMO, 1987).

A identificação de *T. cruzi* somente por esfregaços sanguíneos em gambás é difícil, sendo geralmente empregadas diversas técnicas diagnósticas associadas, como esfregaços de gota espessa (PINTO et al., 2006), hemocultura, cultura de medula óssea e de fragmentos teciduais. Parasitas cultivados são identificados em esfregaços corados com Giemsa ou através de xenodiagnóstico (TOLEDO et al., 1997). Técnicas moleculares como PCR são mais sensíveis e específicas para o diagnóstico, embora seu alto custo limite sua ampla utilização (PINTO et al., 2006).

#### 1.2.6.7 Toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular de distribuição global (FORNAZARI et al., 2011; PENA et al., 2011), que infecta naturalmente inúmeras espécies

animais entre mamíferos e aves, principalmente em climas quentes e úmidos. Gatos domésticos e alguns felinos silvestres são considerados hospedeiros definitivos do parasita, pois eliminam pelas fezes os oocistos, que são as formas de resistência. Artrópodes, como baratas e moscas também podem atuar na transmissão do oocisto de forma mecânica (FERRARONI; MARZOCHI, 1980; FORNAZARI et al., 2011).

Os hospedeiros intermediários albergam cistos e pseudocistos nos tecidos corporais, e podem infectar outros animais que vierem a ingerir sua carne crua (FERRARONI; MARZOCHI, 1980). Por isso, carnívoros tendem a ter uma prevalência de infecção mais elevada do que herbívoros (SMITH; FRENKEL, 1995), mas qualquer animal de sangue quente pode ser considerado hospedeiro intermediário. A ingestão de carne mal cozida pode representar uma fonte de infecção de toxoplasmose para os seres humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000 *apud* FORNAZARI et al., 2011).

Somente um pequeno percentual dos indivíduos infectados desenvolve sintomas de toxoplasmose (PENA et al., 2011), que são graves como encefalite, problemas de visão e retardo mental. É uma infecção mais perigosa para indivíduos imunocomprometidos e gestantes, pois pode prejudicar o desenvolvimento do feto. Entre os animais, a toxoplasmose causa principalmente problemas reprodutivos, porém é fatal para primatas neotropicais e marsupiais australianos, que são muito sensíveis a este parasita (FORNAZARI et al., 2011).

Estudos sobre o toxoplasma na fauna silvestre podem trazer informações importantes para a saúde animal e humana (FORNAZARI et al., 2011). Na Amazônia, Ferraroni e Marzochi (1980) encontraram 63% de positividade em *D. marsupialis*, sendo 36% em machos e 27% em fêmeas. Nos EUA, Smith e Frenkel (1995) encontraram uma prevalência de 13% de positividade em *D. virginiana*. Os hábitos alimentares dos gambás podem facilitar a sua infecção por via digestiva (FERRARONI; MARZOCHI, 1980), e animais onívoros como *Didelphis* tendem a apresentar uma prevalência intermediária de *T. gondii*, menor do que a de carnívoros, e maior do que a de herbívoros.

Em São Paulo, Pena et al (2011) isolaram e caracterizaram geneticamente pela primeira vez uma cepa de *T. gondii* em *D. aurita*. A diversidade genotípica do parasita no Brasil parece ser muito maior do que em outros países mais estudados, possivelmente devido ao clima quente e úmido, favorável ao parasita, e à grande biodiversidade de hospedeiros, gerando genótipos diferentes (PENA et al., 2011).

Embora já tenha sido considerado como um bom indicador de contaminação ambiental por *T. gondii*, um estudo realizado em Botucatu/ SP encontrou prevalência baixa (5,55%) de

*T. gondii* em *D. albiventris*. É possível que *D. albiventris* tenha maior soroprevalência para *T. gondii* em ambientes urbanos e periurbanos, onde existe menor quantidade de árvores, fazendo com que o animal tenha mais contato com o solo e, portanto, com fontes de infecção por oocistos esporulados. Apesar das poucas evidências, *D. albiventris* continua sendo apontado como fonte de infecção de *T. gondii* para seres humanos e outros animais (FORNAZARI et al., 2011).

Na Guiana Francesa, Thoisy et al. (2003) encontraram entre os marsupiais uma das menores prevalências para *Toxoplasma* (15%), junto com primatas (2%). *D. albiventris* teve 20% e *D. marsupialis* 15% de soroprevalência para *T. gondii*, o que foi considerado bastante inferior ao esperado pelas projeções estatísticas. Na Austrália, as baixas prevalências de toxoplasmose em marsupiais são atribuídas à alta sensibilidade e mortalidade dos animais infectados. Thoisy et al. (2003) acreditam que o mesmo possa ocorrer nos marsupiais do Novo Mundo, ou o seu reduzido tempo de vida (2 anos em média) possa diminuir as chances de exposição ao parasita. Nos EUA, Houk et al. (2010) relataram uma prevalência de 27% em *D. virginiana*.

### 1.3 Gênero *Babesia*

#### 1.3.1 Introdução

A babesiose ou piroplasmose é uma doença infecciosacausada por parasitos apicomplexos do gênero *Babesia*. Esta infecção potencialmente perigosa pode acometer diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além de seres humanos (SKOTARCZAK, 2008), e vem sendo apontada como uma zoonose emergente importante, principalmente nos Estados Unidos. Para manter seu ciclo de vida, as diferentes espécies de *Babesia* necessitam de dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Todas as espécies já descritas do parasito são transmitidas aos vertebrados por carrapatos vetores específicos da Família Ixodidae, e a transmissão ocorre após a alimentação do carrapato num reservatório vertebrado que seja competente na manutenção dos organismos da *Babesia* no estado infeccioso (HOMER et al., 2000).

No hospedeiro vertebrado os parasitas infectam os eritrócitos e se multiplicam no seu interior, sendo chamados piroplasmas pelo formato semelhante à pêra que adquirem no interior da hemácia (HOMER et al., 2000). Em seres humanos a doença se apresenta de forma amplamente variável, desde uma infecção silenciosa até doença fulminante semelhante à malária, podendo levar à morte (CHAUVIN et al., 2009).

*Babesia* é um dos grupos de hemoparasitas mais comuns e difundidos no mundo em número de espécies e de hospedeiros acometidos, podendo ser encontrado em qualquer ambiente onde ocorra o florescimento dos carrapatos transmissores. Considera-se que praticamente qualquer mamífero que sirva de hospedeiro para um carrapato infectado com *Babesia* é um potencial reservatório do parasita. Em animais silvestres de vida livre, é umas das infecções mais comuns (HOMER et al., 2000).

#### 1.3.2 Histórico

A babesiose vem causando problemas indiretos ao homem desde a antiguidade, principalmente por infecções em criações domésticas. Somente na segunda metade do século

XX estas infecções se tornaram uma ameaça direta para a saúde humana, sendo considerada atualmente como uma zoonose infecciosa emergente (HOMER et al., 2000).

O relato mais antigo de infecção por *Babesia* sp. no mundo parece vir da bíblia. No livro bíblico do *Exodus* encontra-se a descrição da praga do gado do Egito, uma moléstia “horível e dolorosa”, que é considerada por pesquisadores semelhante à febre do gado causada pela *Babesia bovis*, que provoca hematúria (HOMER et al., 2000).

Em 1888, Victor Babes pesquisou a causa da hemoglobinúria febril no gado, doença que chegou a causar a morte de 50 mil bovinos na Romênia. Babes descreveu microorganismos dentro dos eritrocíticos dos animais afetados, e os classificou como bactérias (HOMER et al., 2000). Posteriormente, em 1893, estes microorganismos foram reclassificados no Filo Protozoa e transferidos para o gênero *Babesia* (SKOTARCZAK, 2008).

Pouco tempo depois, os carrapatos foram descritos como os transmissores da *B. bigemina*, causadora da febre do gado do Texas (HOMER et al., 2000). Desde então, muitas espécies distintas de *Babesia* foram descobertas, relacionadas a diferentes mamíferos domésticos e silvestres, e a diversas espécies de carrapatos vetores (CHAUVIN et al., 2009).

O primeiro caso documentado de babesiose humana ocorreu em 1957, na Yugoslávia, onde um camponês que havia retirado o baço apresentou infecção por *B. bovis*, vindo a óbito. Desde então alguns casos de babesiose zoonótica foram relatados na Europa, a maioria envolvendo pessoas esplenectomizadas que morreram infectadas por *B. divergens* (HOMER et al., 2000).

### 1.3.3 Classificação

A babesiose ou piroplasmose é uma doença infecciosa potencialmente perigosa causada por parasitos do gênero *Babesia*, que pertence ao Filo Apicomplexa ou Sporozoa, Classe Aconoidasida ou Piroplasma e Ordem Piroplasmida (HOMER et al., 2000; IRWIN, 2009). Estes parasitos, também chamados piroplasmas, se caracterizam por apresentar formas intra-eritrocitárias semelhantes a uma pêra. Apresentam estágio merogônico dentro dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado e desenvolvimento sexual e formação de esporozoítos dentro do hospedeiro invertebrado (HOMER et al., 2000).

Na Ordem Piroplasmida existem duas famílias próximas, Babesidae e Theileridae. A descrição, classificação e distinção entre os gêneros *Babesia* e *Theileria* foram feitas inicialmente baseadas em características morfológicas, principalmente o padrão de comportamento do merozoíto nas células sanguíneas, locais de multiplicação no hospedeiro vertebrado e modos de transmissão no carrapato vetor (CHAUVIN et al., 2009).

Assim, *Babesia* infecta somente hemácias, enquanto *Theileria* apresenta um ciclo pré-eritrocítico, infectando primeiro linfócitos e depois hemácias. Além disso, *Babesia* sofre transmissão transovariana e transtadial nos carrapatos vetores, enquanto em *Theileria* não há transmissão transovariana (CHAUVIN et al., 2009).

Dentro do gênero monofilético, as espécies de *Babesia* foram inicialmente identificadas com base na morfologia das formas intraeritrocíticas (trofozoítos) visíveis nos esfregaços de sangue de animais infectados. Esta análise, juntamente com a especificidade de hospedeiro permitiu a separação em várias espécies, tendo sido descritas mais de 100 tipos de *Babesia*, infectando uma enorme gama de hospedeiros mamíferos, inclusive seres humanos, além de diversas espécies de aves (HOMER et al., 2000).

Inicialmente as babesias foram agrupadas pelo tamanho observado ao microscópio como pequenas babesias, com trofozoítos de 1,0 a 2,5  $\mu\text{m}$  (ex: *B. gibsoni*, *B. microti*, *B. rodhaini*, *B. ovis*) e grandes babesias, com trofozoítos de 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  (ex: *B. bovis*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. motasi*). É interessante notar que essa classificação morfológica em geral coincide com a caracterização filogenética baseada em seqüências moleculares, com raras exceções (CHAUVIN et al., 2009; HOMER et al., 2000). A análise genética mostra que as grandes e pequenas babesias se agrupam em dois troncos filogenéticos, sendo as pequenas mais relacionadas com o gênero *Theileria* do que com as grandes babesias. A única exceção é a *B. divergens*, que aparece pequena no esfregaço sanguíneo, mas é geneticamente relacionada às grandes babesias (HOMER et al., 2000). Além disso, nenhuma das pequenas babesias, assim como nenhuma *Theileria*, apresenta transmissão transovariana em carrapatos, e por isso, foi sugerido que as pequenas babesias fossem classificadas junto a *Theileria*, o que ainda não foi realizado (HOMER et al., 2000).

#### 1.3.4 Ciclo de vida

Como um parasita apicomplexo ou esporozoário, os organismos de *Babesia*, passam por três estágios de reprodução: gamogonia, esporogonia e merogonia. A gamogonia é a etapa de formação e fusão dos gametas dentro do intestino do carrapato. A esporogonia é a reprodução assexuada nas glândulas salivares do carrapato, e a merogonia é a reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (HOMER et al., 2000).

O ciclo se inicia com o carrapato se alimentando num hospedeiro infectado, ingerindo eritrócitos contendo *Babesia* sp no estágio de pré-gametócito, que iniciam a diferenciação em gametócitos. Algumas horas após a ingestão, os pré-gametócitos desenvolvem os corpúsculos de Ray, que são corpos alongados com formato de seta envolvidos na fusão dos gametas, que ocorre nesta etapa. Após essa fusão, é formado um zigoto alongado, de 8 a 10 µm de comprimento, que utiliza o corpúsculo de Ray para facilitar a penetração na célula epitelial intestinal (CHAUVIN et al., 2009). O corpúsculo toca a membrana celular, que invagina ao redor da organela no ponto de contato, internalizando o zigoto cerca de 80 horas após o repasto sanguíneo (HOMER et al., 2000). Após a penetração na célula intestinal o zigoto se transforma num estágio móvel, chamado oocineto, e o corpúsculo de Ray degenera. O oocineto escapa do epitélio intestinal e invade os tecidos corporais do carrapato (CHAUVIN et al., 2009).

Pela hemolinfa, o parasita se move até as glândulas salivares, onde penetra e se desenvolve em esporozoíto nos ácinos glandulares. Os esporozoítos são o estágio infectante do parasita, a forma com que este é introduzido no hospedeiro vertebrado (CHAUVIN et al., 2009). A saliva do carrapato, pela sua atividade antiinflamatória e imunossupressiva aumenta a eficiência da transmissão do parasita (HOMER et al., 2000). A esporogonia ocorre novamente a cada estágio de vida do carrapato, e a infecção de *Babesia* sp. adquirida em um estágio de desenvolvimento passa para o próximo, pela transmissão transtádial (CHAUVIN et al., 2009).

Algumas espécies de *Babesia* podem ser transmitidas de forma transovariana. Neste caso, após os zigotos atingirem a hemolinfa, eles invadem outras células como adipócitos ou nefrócitos, e iniciam um segundo ciclo de divisão. Os zigotos secundários originados invadem os ovários e infectam os ovos. A transmissão transovariana amplifica a infecção nos



carrapatos, fazendo com que nas áreas endêmicas exista um grande número de carrapatos portadores do parasita (HOMER et al., 2000).

Os vertebrados se infectam pela inoculação de esporozoítos com saliva durante o repasto sanguíneo do carrapato. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos infectam os eritrócitos. Quanto mais tempo o carrapato permanecer aderido ao hospedeiro, maior a probabilidade de transmissão do parasita e caso o carrapato consiga se alimentar até a plenitude, a taxa de infecção é de 100% (CHAUVIN et al., 2009).

A invasão da hemácia ocorre por invaginação, formando um vacúolo que se desintegra gradualmente liberando o parasita, que então adquire o formato característico de pêra. Dentro do eritrócito os esporozoítos se transformam em trofozoítos e se dividem por fissão binária, formando merozoítos. Hemácias infectadas acabam sendo retiradas da circulação pelo baço, ou sofrendo lise intravascular (CHAUVIN et al., 2009). Após a destruição do eritrócito, cada merozoíto invade um novo eritrócito e assim sucessivamente. A multiplicação é assincrônica e diversos estágios divisionais do parasita podem ser vistos na corrente sanguínea simultaneamente (CHAUVIN et al., 2009).

Alguns trofozoítos podem se tornar gametócitos potenciais, que aumentam de tamanho e não se reproduzem. Mais tarde, quando estiverem no interior do intestino do carrapato, esses gametócitos vão evoluir para gametas antes de deixar o eritrócito ingerido no intestino (HOMER et al., 2000).

### 1.3.5 Patogenicidade e imunidade

As diferentes espécies de *Babesia* possuem potencial patogênico distinto. Fatores como a idade e condição imunológica do hospedeiro também influem na intensidade da doença, bem como a presença de outras infecções concomitantes. De uma forma geral, a lesão celular direta das hemácias parasitadas, o aumento da fragilidade osmótica e a destruição imunomediada provocam hemólise intra e extravascular (IRWIN, 2009).

Todos os hospedeiros mamíferos já estudados foram capazes de desenvolver imunidade para *Babesia*, tanto após uma infecção natural e recuperação quanto por imunização profilática (HOMER et al., 2000). Na infecção por este parasita os mecanismos de resposta imune são direcionados contra os eritrócitos infectados e merozoítos livres, e

envolvem a resposta humoral e celular. Dentro dos glóbulos vermelhos a *Babesia* está parcialmente protegida da resposta imune, enquanto os merozoítos livres estão totalmente expostos, mesmo que por um curto período de tempo. O hospedeiro desenvolve anticorpos contra proteínas de ligação na superfície do merozoíto, que são variáveis entre as espécies de *Babesia*, e dentro da mesma espécie. Esse polimorfismo antigênico permite ao parasita fugir da resposta imune do hospedeiro (CHAUVIN et al., 2009).

O primeiro estágio da infecção por *Babesia* já ativa o sistema imune do hospedeiro. Após a picada do carrapato, os esporozoítos são lançados livres na corrente sanguínea, onde permanecem por um curto período de tempo. Nesta fase da infecção, a presença de IgG pré-existente pode conferir imunidade ao indivíduo, por neutralizar esporozoítos livres e impedir a infecção das hemácias. A resposta imune humoral, entretanto, é limitada porque os anticorpos agem sobre os parasitas livres e não sobre os glóbulos vermelhos infectados, sendo eficazes somente no curto período em que os organismos estão circulando livres na corrente sanguínea, antes que penetrem nas células alvo (HOMER et al., 2000).

A produção de anticorpos começa sete dias após a infecção e persiste por diversos meses. Animais imunizados apresentam uma resposta imune contra a *Babesia* sp. previamente desenvolvida quando encontram um novo desafio infeccioso. Estes animais não demonstram o estágio de parasitemia crescente, e geralmente nenhum parasita é encontrado na sua corrente sanguínea (HOMER et al., 2000).

A resposta imune humoral não provoca a eliminação do parasita, mas diversos mecanismos ajudam a controlar a parasitemia, como: citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada pela IgG I; a opsonização mediada pela IgG II; a neutralização da aderência de merozoítos livres às células vermelhas; a citoaderência de hemácias infectadas às células endoteliais; e a ativação do complemento mediado por IgG I e IgG II (CHAUVIN et al., 2009).

Uma nova fase começa depois que os organismos invadem os eritrócitos. Durante este estágio de progressão, a parasitemia aumenta e ocorrem os sinais clínicos de doença aguda. Experimentalmente os níveis de parasitemia começam a cair 10 dias após a infecção, devido a degeneração do parasita dentro do eritrócito e limpeza de detritos pelo baço, que fica hiper-reactivo. Nesta etapa a infecção entra no estágio de resolução e a doença regride (HOMER et al., 2000).

A ativação de respostas imunes não específicas, como a imunidade inata, pode conferir resistência contra a babesiose. As células do sistema imune inato são os linfócitos T, células

*Natural Killer* (NK) e macrófagos, essenciais na defesa contra *Babesia* sp. Estas células, além de linfócitos B, estão presentes em grande quantidade no baço, um importante órgão linfóide. Animais e seres humanos esplenectomizados são altamente suscetíveis à infecção por *Babesia*, o que demonstra que a resposta imune celular é a principal via de defesa do organismo contra este parasita (CHAUVIN et al., 2009).

Macrófagos, linfócitos T (principalmente T CD4<sup>+</sup> helper I) e células NK são responsáveis por controlar a taxa de crescimento do parasita e a extensão da parasitemia, entretanto o mecanismo pelo qual o parasita é eliminado do hospedeiro é desconhecido (HOMER et al., 2000). A destruição do parasita parece não ocorrer em função da ação direta das células de fesa, mas sim através de mediadores solúveis sintetizados por estas células, como o óxido nítrico, o gama interferon e o fator de necrose tumoral (CHAUVIN et al., 2009).

### 1.3.6 Adaptação entre *Babesia* spp. e seus hospedeiros

O sucesso evolutivo das espécies de *Babesia* é comprovado pelo grande número de espécies descritas (mais de 100) e pode ser comparado com a radiação do *Plasmodium*, com o qual tem proximidade filogenética e diversas características biológicas comuns. Ambos são Protozoa transmitidos por vetores artrópodes, seu ciclo de vida inclui multiplicação assexuada em eritrócitos de vertebrados, reprodução sexuada no vetor e produção de esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. *Babesia* pode ser considerado um gênero de Protozoa especificamente adaptado para utilizar carrapatos como vetores (e não dípteros, como em *Plasmodium*) (CHAUVIN et al., 2009).

*Babesia* sp.e seus dois hospedeiros (invertebrado e vertebrado) representam um sistema complexo no qual as interações entre os participantes são das mais antigas e demoradas já descritas. Algumas características específicas afetam a transmissão da *Babesia* e são dependentes das estratégias adaptativas dos três participantes do sistema, a própria *Babesia*, o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado (HOMER et al., 2000).

Primeiro, existe a necessidade de um contato íntimo entre o hospedeiro e o carrapato, na sua fase de alimentação, que permite um diálogo molecular prolongado entre o dois. Esta fase dura de dois dias até duas semanas, dependendo do estágio de desenvolvimento (larva, ninfa ou fêmea adulta) e da espécie do carrapato. Com mosquitos ou pulgas, este contato dura

somente alguns segundos (CHAUVIN et al., 2009). Após a introdução de um esporozoíto misturado com componentes da saliva do carrapato, a *Babesia* pode persistir assintomaticamente dentro do vertebrado por diversos anos. A utilização do hospedeiro vertebrado como reservatório permite à *Babesia* uma persistência de longo termo no ambiente (CHAUVIN et al., 2009).

O desenvolvimento de doença aguda ou a eliminação do parasita da corrente sanguínea podem ser considerados sinais de má adaptação entre as espécies de *Babesia* e seus hospedeiros vertebrados, como foi observado em gerbils (*Meriones* sp.) infectados com *B. divergens* em (CHAUVIN et al., 2009). Supõe-se, portanto, que hospedeiros adaptados, como os animais silvestres naturalmente infectados, não apresentem doença aguda nem consigam eliminar o parasita da corrente sanguínea, tornando-se assim portadores assintomáticos. A transmissão aos carrapatos num nível baixo de parasitemia parece ser a modalidade prevalente para *Babesia* no ambiente natural, conferindo a persistência de longo termo do parasita no ambiente, e geralmente o estado de portador assintomático nos vertebrados. Entretanto, mesmo no hospedeiro natural bem adaptado, uma resposta imune retardada, inadequada ou insuficiente pode levar a manifestações clínicas da babesiose e até à morte do hospedeiro, o que trará um desfecho desfavorável na transmissão do parasita (CHAUVIN et al., 2009).

O estabelecimento de parasitemias reduzidas e de longa duração apresenta muitas vantagens para a *Babesia*, como prolongar o período de transmissão e a chance de ser adquirida pelo carrapato. Além disso, estudos com *B. ovis* mostraram que baixas parasitemias podem salvar os carrapatos de efeitos deletérios, que ocorrem quando um grande número de parasitas é adquirido durante o repasto sanguíneo. Assim, a baixa parasitemia pode indiretamente melhorar a transmissão por preservar o desempenho do vetor (CHAUVIN et al., 2009).

A manutenção e persistência da *Babesia* dentro do vetor são aumentadas pelas transmissões transovariana e transestadial, por até diversas gerações de carrapatos. A capacidade de ser transmitida aos ovos, e de persistir ao longo de diversos estágios de desenvolvimento do carrapato pode ser considerada como a principal adaptação da *Babesia* ao hospedeiro (HOMER et al., 2000). Assim, tanto vertebrados quanto os carrapatos servem como reservatórios do parasita no ambiente natural, facilitando a persistência de longo termo da *Babesia* no ecossistema (CHAUVIN et al., 2009).

A transmissão transestadial pode também ser considerada como uma adaptação específica ao ciclo de vida do carrapato, que envolve somente um repasto sanguíneo a cada

estágio de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto), permitindo ao parasita a transmissão durante cada um desses estágios. A transmissão transestadial é observada na maioria dos patógenos transmitidos por carrapatos, enquanto a transmissão transovariana é mais rara. A persistência transestadial é um fator adaptativo chave da *Babesia* com o seu vetor (CHAUVIN et al., 2009).

A transmissão transovariana é característica do gênero *Babesia* quando comparado com *Theileria*. No ambiente natural, caso só o carrapato adulto se alimente num hospedeiro adequado à *Babesia*, a passagem do parasita para os ovos irá aumentar a eficiência de transmissão. Esta também pode ser considerada como a principal adaptação para a persistência de longo termo, porque alguns carrapatos permanecem infectados e infectivos por diversas gerações sem a necessidade de se alimentarem novamente em animais infectados (HOMER et al., 2000).

Devido à transmissão transovariana, a *Babesia* pode ser considerada como um parasita de transmissão vertical. Considerações teóricas sobre a evolução da virulência sugerem que estes parasitas tenham se desenvolvido em direção a uma baixa virulência para os seus hospedeiros, tanto mamíferos quanto carrapatos, em comparação com parasitas de transmissão horizontal pura (CHAUVIN et al., 2009).

Em relação ao seu vetor, *Babesia* geralmente é específica de uma única espécie de carrapato em determinada área geográfica. A probabilidade de transmissão de uma espécie de *Babesia* para o seu hospedeiro vertebrado específico é aumentada se a espécie de carrapato mostra especificidade restrita. Por outro lado, carrapatos generalistas são mais eficientes em apresentar isolados de *Babesia* spp. a novos hospedeiros potenciais. Os merozoítos de *Babesia* spp. são capazes de invadir eritrócitos de uma grande gama de espécies animais, demonstrando a possibilidade destes parasitas se adaptarem e se desenvolverem em novos hospedeiros. Uma maior gama de hospedeiros tanto para o carrapato quanto para a *Babesia* vai facilitar a transmissão a novas espécies e após adaptação haverá evolução potencial da *Babesia* sobre novos vertebrados (HOMER et al., 2000).

Assim, a distribuição geográfica das espécies de *Babesia* mostra-se altamente correlacionada com a distribuição da espécie de carrapato. Modificações na distribuição de doenças transmitidas por carrapato foram demonstradas no contexto das mudanças globais, e relacionadas a mudanças na distribuição dos carrapatos, sua dinâmica populacional e contato com hospedeiros. A expansão dos carrapatos pode ser facilmente seguida pela expansão da

*Babesia*, desde que estejam presentes na nova área os hospedeiros vertebrados (CHAUVIN et al., 2009).

Para o hospedeiro vertebrado, *Babesia* inicialmente foi tida como específica. Porém, após o desenvolvimento de técnicas moleculares, algumas espécies tiveram sua amplitude de hospedeiros bastante aumentada (CHAUVIN et al., 2009). Por exemplo, *B. bovis* e *B. bigemina* foram descritas inicialmente como *Babesias* de gado em áreas tropicais e subtropicais, e foram identificadas recentemente por PCR em cervo da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) no norte do México. *B. divergens* é outro parasita de gado de climas temperados, que também vem afetando humanos esplenectomizados, primatas, ungulados e roedores (CHAUVIN et al., 2009).

Considerando a duração do ciclo de vida da *Babesia* como o intervalo entre dois zigotos sucessivos produzidos no carrapato, a probabilidade de transmitir o esporozoítio será influenciada pela especificidade do vetor. Se for específico, o esporozoítio irá encontrar um hospedeiro adequado em cada picada. Já se um carrapato generalista infectado com *Babesia* se alimenta em um hospedeiro não receptivo ao parasita, a eficiência da transmissão do esporozoítio será retardada até o próximo estágio ou geração do carrapato (CHAUVIN et al., 2009).

Este fenômeno será amplificado pela biologia do carrapato. O tempo de geração em carrapatos monofásicos, que completam seu desenvolvimento em poucas semanas, será particularmente curto. Em contraste, o tempo de geração da *Babesia* transmitida por um carrapato generalista que leva um ou vários anos para completar seu ciclo de vida, será 50 vezes maior (CHAUVIN et al., 2009).

### 1.3.7 Resistência

A injeção de esporozoítos de *Babesia* através da picada do carrapato e os ciclos subseqüentes de replicação dentro do eritrócito induzem uma reação do sistema imune do hospedeiro. A expressão clínica da babesiose é altamente conectada às características individuais do animal, como raça e idade, e foi demonstrada uma base genética na resistência à babesiose (CHAUVIN et al., 2009).

Uma relação inversa entre idade e resistência foi relatada em algumas espécies, sendo animais jovens mais resistentes do que os adultos. Este fenômeno foi observado em bezerros infectados com *B. divergens*, *B. bovis* e *B. bigemina*, e em gerbils (*Merionessp.*) infectados com *B. divergens*, mas não em cães infectados com *B. canis*. Os mecanismos que determinam essa maior resistência dos jovens permanecem desconhecidos, porém a produção precoce de óxido nítrico pelo baço dos filhotes parece ser determinante. Os adultos, em contrapartida, expressam uma resposta inflamatória sistêmica retardada e são mais susceptíveis.

Em diversas espécies estudadas, como bovinos (*B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*), ovelhas (*B. divergens* ou *B. ovis*) e cães (*B. canis* ou *B. gibsoni*) o parasita pode persistir por diversos meses, ou mesmo anos, num nível muito baixo de parasitemia. A eliminação foi demonstrada em cães infectados com *B. canis*, mas ocorre somente em alguns indivíduos (CHAUVIN et al., 2009). Efeitos altamente patogênicos serão desfavoráveis tanto para a *Babesia* quanto para seu hospedeiro.

As espécies de *Babesia* desenvolveram estratégias para evitar ou limitar os efeitos da resposta imune, o que capacita o parasita a persistir dentro do hospedeiro vertebrado, e então a aumentar sua possibilidade de ser transmitido. Essa persistência pode resultar da modulação da resposta imune do hospedeiro. A *B. bovis*, por exemplo, é capaz de estimular diretamente alguns componentes do sistema imune, levando os macrófagos a produzirem óxido nítrico, interleucinas e fator de necrose tumoral.

Embora pareça estranho que a *B. bovis* estimule uma resposta imune que ao fim seja fatal para ela mesma, alguns mecanismos da resposta imune e de evasão do parasita de fato ajudam a desenvolver a expressão clínica da babesiose. Isso inclui a produção de altos níveis de citocinas inflamatórias, citoaderência responsável por alterações vasculares (vasodilatação, queda de pressão sanguínea, aumento da permeabilidade vascular) e estase sanguínea na microcirculação.

De forma experimental demonstrou-se a capacidade da *Babesia* de provocar a adesão das hemácias às células endoteliais levando ao seqüestro das hemácias infectadas na microvasculatura. Dessa forma, a *Babesia* persiste dentro do hospedeiro, evitando a passagem dos eritrócitos infectados no baço, onde seriam retirados da circulação. Este mecanismo adesivo que retêm as hemácias infectadas nos microvasos pode aumentar a transmissão dos parasitas quando a maior concentração de parasitas ocorre próxima aos pontos de picada de carrapato (CHAUVIN et al., 2009).

A citoaderência em *B. bovis* é mediada por um antígeno de superfície que é uma proteína exportada até a membrana do eritrócito infectado dificultando o contato prolongado com o sistema imune do hospedeiro. Assim, o parasita desenvolveu uma estratégia de proteção da sua função adesiva da interferência imune, principalmente por preservar a citoadesão mesmo diante da produção de anticorpos, na forma de variação antigênica (CHAUVIN et al., 2009).

Existem diversos exemplos de manifestações de doença diferentes e eventualmente mais severas resultantes da transmissão de uma espécie de *Babesia* comum numa espécie de vertebrado selvagem para um hospedeiro vertebrado não adaptado. Isto foi observado nos EUA em relação a *B. microti*, o rato *P. leucopus* e seres humanos. Como reservatórios naturais da *B. microti*, a maioria dos *P. leucopus* das regiões enzoóticas de *Babesia* são parasitêmicos, porém em baixas taxas, e permanecem parasitêmicos por toda a vida. Já hamsters e camundongos de laboratório infectados desenvolvem altas parasitemias, geralmente de 40 a 50%, e alta mortalidade (HOMER et al., 2000).

### 1.3.8 *Babesia* spp. no hospedeiro invertebrado

Dos sete principais gêneros de carrapatos ixodídeos, seis foram identificados como vetores de diferentes espécies de *Babesia*. Algumas como *B. bigemina* e *B. equi* podem infectar mais de um gênero de ixodídeo, e outras como a *B. microti* só infectam carrapatos do gênero *Ixodes* (HOMER et al., 2000).

Vários gêneros de ixodídeos podem carregar mais de uma espécie de *Babesia* simultaneamente. Porém não foi comprovado que eles possam transmitir simultaneamente mais de uma espécie do parasita (HOMER et al., 2000).

A longa interação entre carrapatos e *Babesia* provavelmente contribuiu para o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra estes parasitas. Duas moléculas envolvidas na defesa do carrapato contra a *Babesia* e *Theileria* foram descritas, a longicina e a longipaína. A longicina é um peptídeo antimicrobiano produzido no epitélio intestinal do carrapato, que adere especificamente à membrana dos merozoítos de *T. equi*, inibindo sua proliferação e matando os parasitas. A longicina também tem efeito sobre a *Babesia* (CHAUVIN et al., 2009).



A longipaína é uma protease encontrada numa grande gama de parasitas, incluindo nematóides, vermes chatos e carrapatos, e esta envolvida na digestão do sangue. A longipaína é expressa no epitélio intestinal do carrapato durante o repasto sanguíneo, e é capaz de matar os merozoítos de *Babesia* (CHAUVIN et al., 2009).

A saliva do carrapato contém diversos compostos ativos que modulam a resposta imune do hospedeiro e permitem o repasto sanguíneo do ácaro. Esta inibição da reação de defesa pode facilitar a transmissão da *Babesia*, de forma semelhante ao que foi descrito em algumas bactérias (CHAUVIN et al., 2009).

### 1.3.9 Diagnóstico

O método de diagnóstico mais difundido da babesiose é a observação ao microscópio óptico de esfregaços sanguíneos corados de sangue total. Os corantes mais utilizados são Giemsa e Wright. Quando presente, o parasito pode ser visualizado dentro dos eritrócitos, em formatos de pêra, oval, anelar ou amebóide. Em casos de baixa parasitemia células infectadas podem não ser observadas.

As espécies de *Babesia* spp. não podem ser diferenciadas somente com base na morfologia (SKOTARCZAK, 2008), mas a observação microscópica permanece como o método de diagnóstico mais simples e acessível. Durante a infecção aguda, é um método razoavelmente sensível para a detecção dos parasitas, e a microscopia ainda é a única opção viável para diagnóstico em muitas regiões afastadas e de poucos recursos, onde a babesiose é endêmica. O diagnóstico de animais cronicamente infectados ou portadores permanece como um desafio devido à parasitemia baixa e muitas vezes intermitente. (IRWIN, 2009).

A classificação de *Babesia* sp. pela especificidade de hospedeiro é bastante imprecisa, pois certas espécies como *B. microti* mostraram ter uma especificidade mais ampla de hospedeiros. As novas técnicas moleculares são mais objetivas, e podem demonstrar que algumas espécies de *Babesia* como *B. microti* são capazes de infectar um grande número de hospedeiros diferentes, resultando em sinónimas de espécies previamente diferentes (HOMER et al., 2000).

### 1.3.10 Babesia sp.em roedores

Até 2004 não havia sido descrita a babesiose em roedores silvestres no Brasil, embora em diversas regiões do mundo tenha sido demonstrado que a ocorrência do parasita em roedores pereniza a babesiose. O crescimento desordenado das cidades provoca uma aproximação entre as áreas urbanas e rurais, o que aliado à proliferação de roedores pode fornecer características ambientais adequadas para a dispersão da babesiose a partir de áreas endêmicas para outras livres da doença (GAZETA et al., 2004).

Em monitoramento de esfregaços sanguíneos de roedores silvestres e urbanos de Silva Jardim e Nova Iguaçu no Rio de Janeiro, foi encontrada prevalência geral de infecção por *Babesia* sp. de 27,3% (12 animais positivos em 44 analisados). De seis diferentes espécies estudadas, somente *Rattus norvegicus* (50%) e *Oligoryzomys nigripes* (33,3%) tiveram resultados positivos (GAZETA et al., 2004).

A alta prevalência de *Babesia* sp. Em *Rattus norvegicus* pode representar um risco à saúde pública, pelo hábito comensal e urbano dos roedores, com contato direto e indireto com o homem e animais domésticos (GAZETA et al., 2004).

### 1.3.11 Babesia sp.no cão

*Babesia c. canis* é a espécie mais patogênica para o cão, estando difundida por todo o mundo. Ela é transmitida principalmente pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* ou *Dermacentor reticulatus*. A infecção em cães pode ser hiperaguda, aguda ou crônica, e os sintomas da forma aguda incluem febre, perda de apetite, fraqueza, apatia, palidez de mucosas, hemoglobinúria, bilirrubinúria, policromasia, anemia hemolítica progressiva, hepato e esplenomegalia, icterícia e vômito (IRWIN, 2009; SKOTARCZAK, 2008). Pode ocorrer colapso associado à hemólise intra e extravascular, hipóxia, inflamação sistêmica e trombocitopenia (IRWIN, 2009).

*Babesia* sp. *vogeli* em cães adultos é frequentemente subclínica, sendo perigosa para filhotes de 3-4 meses. Ela é observada em esfregaços sanguíneos de animais sob tratamento por outras doenças, recebendo medicação (imunossupressores e quimioterapia) ou após

cirurgia (principalmente esplenectomia) Mesmo em pacientes imunodeprimidos o aparecimento da *B. vogelicostuma* não trazer conseqüências negativas, não sendo necessário tratamento (IRWIN, 2009).

Embora todas as espécies de *Babesi*sp. sejam reconhecidas como doenças transmitidas por carrapatos, recentemente foram encontradas evidências de transmissão direta através de trocas de sangue durante brigas e mordidas para *Babesia gibsoni* (IRWIN, 2009).

As conseqüências clínicas da babesiose crônica são imprevisíveis e enquanto a maioria dos cães parece tolerar este estado com poucos efeitos, eles permanecem em risco de desenvolver complicações imunomediadas e recrudescimento de doença clínica e parasitemia, se ficarem imunocomprometidos num período posterior. A infecção crônica pode ser até mesmo benéfica para hospedeiros que vivem em regiões endêmicas, por os protegerem de doenças posteriores. As drogas de escolha para o tratamento da babesiose canina são o dipropionato de Imidocarb e o aceturato de Diminazina, que promovem melhora dos sinais clínicos, raramente promovendo a eliminação do parasita (IRWIN, 2009).

#### 1.3.12 *Babesia* sp. no homem

Nos Estados Unidos, a babesiose era considerada uma infecção comum dos animais até a década de 60, quando uma série de infecções por *Babesia microti* foram identificadas, colocando esta enfermidade como uma ameaça à saúde pública. Cerca de 30 casos de babesiose humana foram relatados na Europa até hoje, principalmente relacionados com indivíduos esplenectomizados que lidam diretamente com o gado (CHAUVIN et al., 2009).

Alguns poucos casos foram descritos em outras partes do mundo, como a China, Taiwan, Egito, África do Sul e México. Nas Américas a babesiose vem sendo considerada uma doença emergente, com surgimento de novas espécies de comportamento mais agressivo (GAZETA et al., 2004).

Em cada região do mundo esta enfermidade é provocada por espécies diferentes. *B. microti* é o principal causador de babesiose humana na América do Norte, embora novas espécies tenham sido descobertas causando doença. Na Europa, onde a doença é mais rara, é causada pela *B. divergens* (HOMER et al., 2000).

Na maioria dos seres humanos a babesiose é uma doença auto-limitante, levando ao desenvolvimento de portadores assintomáticos. Levantamentos sorológicos nos Estados Unidos têm mostrado prevalências baixas, de 3 a 8% da população, porém acredita-se que a frequência real seja muito maior do que o número de casos relatados. A mortalidade nas infecções sintomáticas por *B. microti* é baixa, de 5% (HOMER et al., 2000).

A *B. microti* não tem grande importância para o homem na Europa porque naquele continente o seu vetor é o *Ixodes trianguliceps*, que é específico de roedores, não se alimentando em humanos. Assim, doença em seres humanos por *B. microti* é ocasional, tendo sido relatada somente duas vezes (HOMER et al., 2000).

A babesiose humana européia é causada principalmente pela *Babesia divergens*, um parasita de bovinos transmitido pelo carrapato *Ixodes ricinus*. A doença humana causada pela *B. divergens* é mais grave do que a provocada pela *B. microti*, atingindo 42% de mortalidade. Porém, a alta mortalidade pode dever-se ao fato de que a maioria dos europeus acometidos foram pessoas esplenectomizadas (HOMER et al., 2000).

A severidade da manifestação da doença depende de diversos fatores, entre eles a idade, imunocompetência e co-infecção com outros agentes patogênicos. Em humanos, por qualquer que seja o agente envolvido, a babesiose é mais grave e mais diagnosticada em idosos, indivíduos esplenectomizados e portadores do vírus HIV. Possivelmente muitos casos positivos não são detectados ou não são diagnosticados por se tratarem de doença branda (SKOTARCZAK, 2008). Alguns casos de transmissão por transfusão de sangue ocorreram nos EUA, sendo a maioria por *B. microti* envolvendo um doador assintomático (HOMER et al., 2000).

A apresentação clínica da babesiose em humanos é amplamente variável, desde uma infecção silenciosa até doença fulminante semelhante à malária, podendo matar. Os sintomas são provocados pelos estágios reprodutivos assexuados do parasita nos eritrócitos, e conseqüente lise celular. Os sinais clínicos refletem os níveis de parasitemia do agente, sendo bastante variáveis individualmente. O período de incubação desde a picada do carrapato até o aparecimento dos sintomas varia de uma a seis semanas e pode chegar a três meses (HOMER et al., 2000).

O pico dos sintomas corresponde a uma infecção fulminante semelhante à malária, como mal estar, calafrio, mialgia, anemia, fadiga e febre, de até mais de 40°C. Alguns pacientes ainda apresentam náusea, vômito, suores noturnos, perda de peso e hematúria, que

pode ser relacionada com os picos de parasitemia. Hepatomegalia e esplenomegalia também estão presentes (HOMER et al., 2000).

A anemia hemolítica que se estende por diversos dias a meses ocorre nos indivíduos mais suscetíveis e em casos severos, provocando icterícia e hemoglobinúria. Em casos muito graves, os pacientes desenvolvem um quadro típico de choque, com falência renal e edema pulmonar (HOMER et al., 2000).

### 1.3.13 *Babesia* sp.no gênero *Didelphis*

O primeiro relato de hemocitozoário em gambá é de 1916, feito por Silva e Arantes (1916). Em cerca de 50 *Didelphis aurita* coletados no Rio de Janeiro, apenas um, proveniente de Meriti/RJ foi encontrado com o parasita. Somente os glóbulos vermelhos foram infectados, sempre com um parasita por glóbulo, e raramente foram observadas formas livres no sangue. Os hemocitozoários mediram 8-10 µm de comprimento e 4-6 µm de largura, e os glóbulos afetados não apresentaram alteração de cor.

Morfologicamente se observaram corpúsculos hialinos, imóveis, esféricos ou ovóides, com protoplasma finamente alveolar, azul claro e com granulações vermelhas quando corado pelo Giemsa. O núcleo tinha forma esférica, ovóide ou alongada, sem membrana nuclear distinta, sem pigmentação e com maior refringência do que o protoplasma. A cromatina nuclear tinha coloração vermelha arroxeada (SILVA; ARANTES, 1916).

Em 1961, Deane e Deane relataram hemocitozoários em dois *D. marsupialis* de Belém, sendo um com infecção intensa. O diagnóstico foi feito por uma combinação de técnicas, utilizando esfregaço sanguíneo, gota espessa, esfregaço de fígado e baço corados por Giemsa, além de cortes histológicos de fígado, baço e coração. Os parasitas apresentavam tamanho pequeno, forma geral arredondada, oval ou elipsóide, raramente em chama ou com contorno irregular. O aspecto era de anéis com fino citoplasma azul claro, um grande vacúolo e núcleo pequenode formato variável, puntiforme e vermelho-rubi. Somente glóbulos vermelhos foram afetados e na sua maioria as hemácias continham um só parasita, raramente dois, não tendo sido observadas figuras de esquizogonia (DEANE; DEANE, 1961).

A suscetibilidade de *Didelphismarsupialis* à *Babesia* sp. e ao *Anaplasma marginale* foi comprovada em estudo de infecção experimental por Paiva e colaboradores (1991). Estes dois

parasitas são os agentes da tristeza parasitária bovina, uma doença de alta morbidade e mortalidade que causa diversos prejuízos econômicos à pecuária no Brasil (FARIAS, 2001). Paiva e colaboradores (1991) encontraram *Babesia bovis* em esfregaços sanguíneos de quatro *D. marsupialis* inoculados, acompanhado de redução no tamanho das hemácias. Clinicamente os animais apresentaram anorexia e febre intermitente, um quadro semelhante ao de bovinos. Nenhum *D. marsupialis* veio a óbito, nem necessitou de tratamento.

A esplenectomia aumenta a suscetibilidade de animais e do homem à infecção por *Babesia* sp., pois diminui a capacidade da resposta imune celular (CHAUVIN et al., 2009). Paiva e colaboradores (1992) testaram esta afirmação para *Didelphis marsupialis*, inoculando experimentalmente quatro indivíduos esplenectomizados com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Todos os animais apresentaram resultados positivos, com anemia e redução no tamanho das hemácias. A parasitemia e a temperatura corporal variaram de forma intermitente, coincidindo os picos de elevação de temperatura com os momentos de parasitemia observados (PAIVA et al., 1992). A retirada do baço não provocou uma maior suscetibilidade de *D. marsupialis* aos agentes da tristeza parasitária bovina. Pelo contrário, em animais não esplenectomizados, a parasitemia foi superior à obtida naqueles que tiveram o órgão retirado (PAIVA et al., 1991).

Sampaio e Massard em 2003 realizaram uma revisão dos hemocitozoários de *Didelphis*, propondo a unificação de três formas específicas sinonímicas (*Nuttallia brasiliensis*, *Theileria brasiliensis* e *Babesia brasiliensis*) sob o nome *Babesia brasiliensis*. A colocação destes parasitos no gênero *Babesia* foi justificada pelo fato de nunca terem sido observadas formas parasitárias pré-eritrocíticas ou leucocitárias, e por nunca terem sido encontradas formas de reprodução esquizogônica. Portanto, *Babesia brasiliensis* é um parasita de *Didelphis* que realiza reprodução binária assincrônicamente em eritrócitos.

#### 1.3.14 Conclusão

As estratégias adaptativas de *Babesia* sp. para a transmissão por carrapatos conduziram a interações de longa duração entre as espécies de *Babesia* e seus hospedeiros. Baixa parasitemia crônica no hospedeiro vertebrado e transmissão transovariana e

transestadial no carrapato resultaram num equilíbrio dinâmico das interações entre *Babesia* sp. e seus hospedeiros que permite a cada participante sobreviver ao mínimo custo.

Isto garante um ótimo desempenho a todo o sistema e permite a persistência de longo termo da *Babesia* sp. no ecossistema, uma vez que ambos os hospedeiros servem como reservatório. A evolução de novas cepas ou mesmo espécies de *Babesia* vai depender tanto do encontro de carrapatos vetores com novos hospedeiros quanto da capacidade das espécies de *Babesia* de se desenvolverem neste novo hospedeiro. Estas novas espécies vão exibir padrões seletivos diferentes dependendo das características biológicas do carrapato.

#### 1.4 Hematologia e bioquímica

Os tipos celulares presentes no sangue dos mamíferos podem ser divididos em eritrócitos ou glóbulos vermelhos, e leucócitos ou glóbulos brancos. Os leucócitos se classificam segundo a presença ou não de grânulos em granulócitos (neutrófilo, basófilo e eosinófilo) e agranulócitos (linfócito e monócito)(TARRAGONA et al., 2011).

A determinação do perfil hematológico é importante para a avaliação clínica e para acompanhamento da terapêutica de indivíduos de *Didelphis* recebidos em zoológicos e centros de triagem, o que é bastante comum no Brasil. O estudo do hemograma permite dimensionar a que desafios estes animais estão submetidos em vida livre (CASAGRANDE et al., 2009).

Variações nas concentrações de diferentes tipos de células sanguíneas em uma amostra de um animal, assim como alterações na morfologia destas células são indicativos de estados fisiológicos ou patológicos particulares (CASAGRANDE et al., 2009; TARRAGONA et al., 2011). Alguns fatores podem influenciar os parâmetros de hemograma, como condições de alimentação, clima, diferença entre espécies ou mesmo a estação do ano (CARNEIRO et al., 2010), sendo esta última considerada por alguns autores como o fator mais importante governando a variabilidade nas contagens de células sanguíneas (TARRAGONA et al., 2011).

A hematologia é uma ferramenta útil para analisar dinâmicas de saúde em animais silvestres, e avaliar índices genéricos de saúde em populações silvestres de *Didelphis* é importante para aumentar o conhecimento sobre a história natural deste gênero (TARRAGONA et al., 2011). A escassez de parâmetros fisiológicos relatados na literatura vem motivando alguns estudos sobre a hematologia de *Didelphis* (CARNEIRO et al., 2010;

CASAGRANDE et al., 2009; TARRAGONA et al., 2011) tanto em vida livre quanto em cativeiro.

Trabalhar com captura viva de animais silvestres em natureza traz dificuldades que muitas vezes atrapalham a obtenção de um grande número de amostras. Nos trabalhos encontrados na literatura com *D. albiventris* de vida livre, foram coletadas amostras de 34 (CASAGRANDE et al., 2009), 33 (CARNEIRO et al., 2010) e 39 indivíduos (TARRAGONA et al., 2011); com *D. aurita*, de 73 indivíduos (CASAGRANDE et al., 2009).

Embora possam ser consideradas amostragens reduzidas, são extremamente valiosas para a melhor compreensão da hematologia desta espécie em condições naturais. Por outro lado, é enfatizada a necessidade de se estabelecer parâmetros hematológicos para *Didelphis* nascidos e criados em cativeiro, livres de interferências ambientais, de parasitoses e outros processos mórbidos a fim de que sejam aferidos parâmetros de referência menos sujeitos a variações (CASAGRANDE et al., 2009).

Estudos de longo prazo podem gerar amostragens maiores e produzir conclusões melhores sobre as diferenças ocasionadas por variáveis como sexo e estações do ano. Isto facilitaria a determinação de quais fatores realmente influenciam nas contagens hematológicas. Além disso, é fundamental corroborar se os dados disponíveis são intrínsecos das populações estudadas ou se repetem em outras, ou seja, se são somente amostras do estado de saúde de uma determinada população num determinado momento influenciado por diversas variáveis ou se indiscutivelmente estas situações se repetem em outras populações e situações (TARRAGONA et al., 2011).

Da mesma forma, diversos fatores relacionados ao clima, à espécie e ao tipo de alimentação, entre outros, podem influenciar nas dosagens séricas de enzimas, impossibilitando o uso de valores determinados em outros países como referência (BORSA et al., 2006).

Neste estudo relatamos os parâmetros hematológicos e alguns parâmetros de bioquímica sérica de duas populações silvestres de *Didelphis aurita* região da Serra dos Órgãos (RJ), associando variabilidade destes parâmetros a fatores do animal (sexo e idade) e da localidade (qualidade de habitat).



## 2 JUSTIFICATIVA

Seguindo estes preceitos, no nosso estudo buscamos investigar aspectos hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas em *Didelphis aurita* de duas áreas de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. Esta espécie apresenta algumas características ecológicas e epidemiológicas relevantes, como grande área de ocorrência e relativa abundância nos ecossistemas, hábito alimentar onívoro e utilização dos estratos arbóreo e terrestre, o que indica uma participação ativa nas dinâmicas ecológicas do ambiente.

Outros fatores indicam que o gênero *Didelphis* tenha um papel epidemiológico importante no ciclo de algumas doenças no ambiente natural. Sua fácil adaptação a ecossistemas de diferentes qualidades (inclusive áreas periurbanas e ambientalmente degradadas); o seu papel como carreador de parasitas e microorganismos zoonóticos; e o fato de serem freqüentemente predados por carnívoros e até mesmo pelo homem colocam estes animais em posição estratégica para o estudo das doenças nos ecossistemas terrestres (FONSECA et al., 1996; FOWLER, 2001).

Além disso, são animais de tamanho médio e rotineiramente capturados em armadilhas comuns em estudos de pequenos mamíferos, o que facilita tanto a manipulação dos indivíduos em campo quanto a otimização de esforços no processo de captura.

### 2.1 Hipótese

Considerando que a biodiversidade seja um dos fatores determinantes para o estado de saúde apresentado por uma espécie animal em diferentes ecossistemas, testamos a hipótese de que indivíduos de *Didelphis aurita* apresentem diferenças nos índices hematológicos, bioquímicos e de hemoparasitas entre duas localidades de Mata Atlântica, uma de mata contínua e outra de vegetação fragmentada.

### 3 OBJETIVOS

#### **Objetivo Geral:**

Avaliar aspectos hematológicos, de bioquímica sérica e hemoparasitas de *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, a fim de gerar informações básicas sobre o estado de equilíbrio orgânico de saúde e hemoparasitas dos indivíduos dentro do âmbito da Medicina da Conservação.

#### **Objetivos Específicos:**

- Estabelecer parâmetros hematológicos de referência para *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos do Rio de Janeiro.
- Fazer comparações de parâmetros hematológicos entre diferentes áreas de estudo, sexos e classes etárias da população estudada.
- Estabelecer parâmetros bioquímicos de referência para *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos do Rio de Janeiro.
- Fazer comparações de parâmetros bioquímicos entre diferentes áreas de estudo, sexos e classes etárias da população estudada.
- Efetuar pesquisa de hemoparasitas na população estudada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

Foram estudadas duas áreas no município de Guapimirim, Estado do Rio de Janeiro. A primeira área localiza-se dentro dos limites do Parque Nacional da Serra dos Órgãos – PARNA/SO, na localidade do Garrafão (22°28'28''- S, 42°59'86''- W), próximo ao km 94 da BR 116 (Rio-Teresópolis), em um vale nos arredores dos afluentes do Rio Iconha, na face sul da Serra dos Órgãos, e será referida como Garrafão. O clima da região é mesotérmico-úmido moderado, com estação chuvosa de outubro a março (NIMER, 1989). A topografia é irregular e o solo é argiloso e rochoso (GENTILE et al., 2004).

Figura 5 - Mapa das duas localidades de estudo.



Fonte: Google Earth, 2012.

A localidade do Garrafão está situada na vertente voltada para o oceano, e pertence ao domínio da Floresta Ombrófila Densa Montana (LORETTO, 2012), a uma altitude aproximada de 600 m (Figura 2). A região do Garrafão possui um loteamento com menos de 100 casas de veraneio, uma ocupação que ocorreu na década de 50, resultado da indefinição

sobre a inclusão desta área no domínio do Parque, que durou até 1984. A área é considerada estratégica para a conservação, pois está localizada em um trecho de conexão entre o PARNA/SO e o Parque Estadual dos Três Picos, a nordeste. Apesar de situar-se dentro de um Parque Nacional, a floresta nesta área sofre uma grande variedade de interferências humanas (KAJIN et al., 2008), como presença de seres humanos, cães, gatos e aves domésticas como galinhas, patos e marrecos, no interior das casas (GENTILE et al., 2004; LORETTO, 2012; MACEDO et al., 2007). Já foi relatada a presença de ratos de esgoto (*Rattus* sp.) no local (MACEDO et al., 2007).

Figura 6 - Região do vale do rio Iconha, localidade do Garrafão, Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

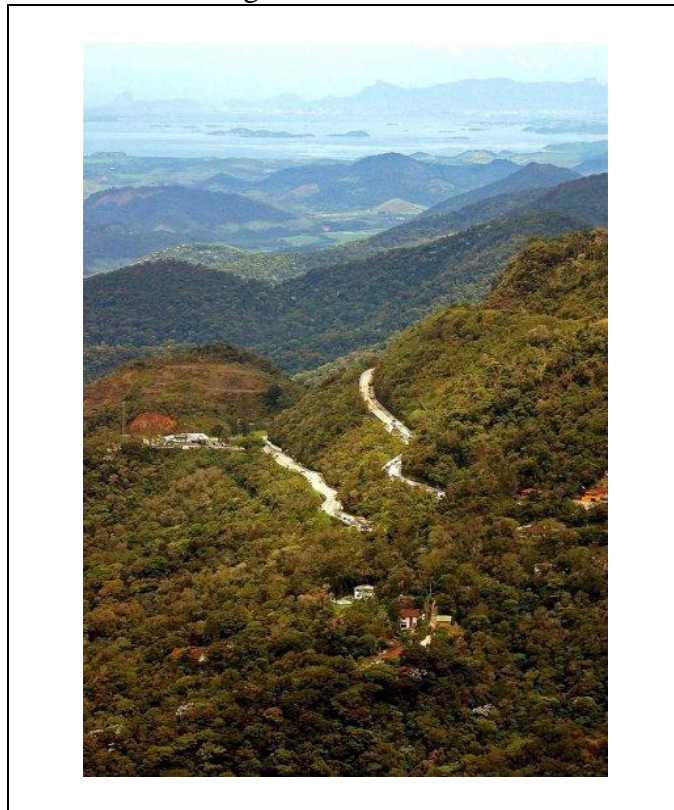
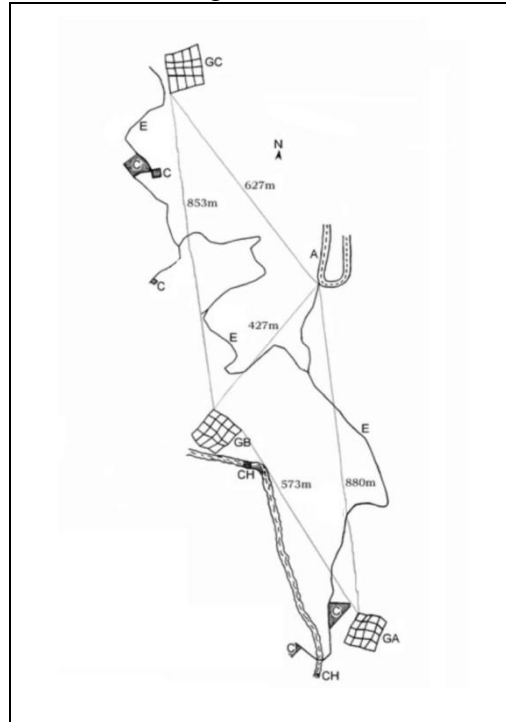


Foto: Ramon Campos, 2007.

No Garrafão já foram registradas seis espécies de marsupiais, entre elas, *Didelphis aurita* (OLIFIERS et al., 2007). Nesta área é desenvolvido pelo Laboratório de Vertebrados da UFRJ desde abril de 1997 um estudo de captura-marcação-recaptura (CMR) de pequenos mamíferos. No local existem três grades fixas de captura, denominadas A, B e C, situadas em diferentes altitudes, mas com aproximadamente a mesma orientação. Cada uma das grades de

armadilhas ocupa uma área de 0,64 ha, com 25 estações de captura equidistantes 20 m (Figura 3).

Figura 7 - Localização relativa das grades de amostragem.



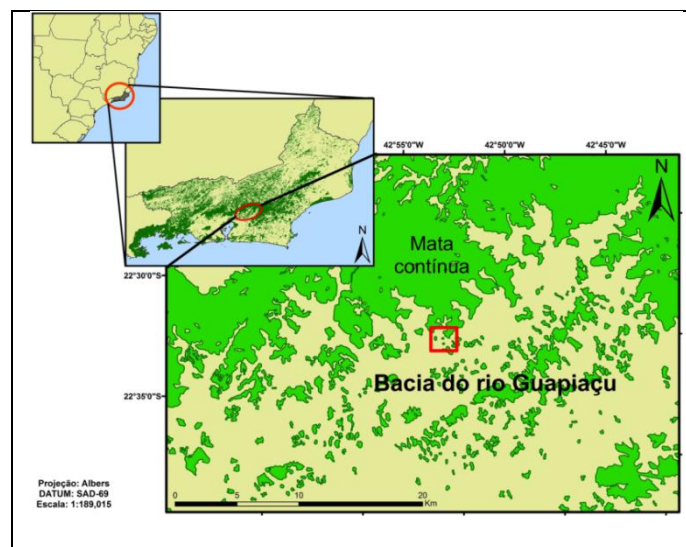
Legenda: GA, GB e GC- grades A,B e C;  
E- estradas vicinais; A- auto-estrada (BR-116);  
CH- Cachoeira do rio Iconha; C-casas.  
Fonte: Loretto, 2012.

A Grade A ( $22^{\circ}28'12''$  S,  $42^{\circ}59'50''$  W), possui altitude média de 750m, com cobertura vegetal fechada e contínua, e relevo irregular. A Grade B ( $22^{\circ}28'29''$  S,  $42^{\circ}59'08''$  W), com altitude média de 650 m, está situada ao lado do Rio Iconha, próximo a uma cachoeira de 20 m de altura, cujas rochas formam piscinas naturais. A grade fica próximo ao início de uma trilha que levada estrada vicinal do condomínio à cachoeira, e que recorta a grade em alguns pontos. A cobertura vegetal é similar à da Grade A, embora em certas áreas da Grade B o sub-bosque seja mais fechado em função da maior presença de bambus e, em outras, é mais aberto devido ao uso frequente da trilha por visitantes. A topografia é irregular e íngreme, principalmente nos pontos próximos à cachoeira.

A Grade C ( $22^{\circ}28'46''$  S,  $42^{\circ}59'22''$  W), com 520 m de altitude média, também possui topografia irregular, mas de menor inclinação, e está a cerca de 250 m da residência mais próxima. A cobertura vegetal é fechada e contínua, com dossel alto que atinge mais de 20 m de altura em alguns trechos. O sub-bosque é mais aberto que nas outras grades.

A segunda área estudada se localiza na bacia do rio Guapiaçu entre os municípios de Guapimirim e Cachoeiras de Macacu ( $22^{\circ} 21' - 22^{\circ}39'S$  e  $42^{\circ}40' - 43^{\circ}01'W$ ), e será referida como Fragmento (Figura 4). Nesta região a paisagem consiste em uma área rural cuja atividade econômica principal é a criação de bovinos leiteiros e outras pequenas criações, como suínos e aves, além de plantações de milho, aipim e cana-de-açúcar, com alguns fragmentos de Mata Atlântica remanescentes. Esta área é contígua, na sua porção norte, a um dos principais corredores remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, onde estão localizadas três unidades de conservação que protegem 60.000 hectares de floresta (FREITAS; MELLO; CRUZ, 2005).

Figura 8 - Localização dos fragmentos e da área de mata contínua, amostrados na bacia do rio Guapiaçu (quadrado vermelho), mostrando também os demais remanescentes florestais da bacia (em verde).



Fonte: Dalloz, 2013.

O local deste estudo consistiu num mosaico de três pequenos fragmentos e uma área de mata contínua, cujas distâncias para os fragmentos foram de 120, 410 e 500 metros (Figura 5). Dois fragmentos possuíam três hectares e meio e outro nove hectares. A matriz ou vizinhança das áreas estudadas consistia de um pasto baixo entremeado por algumas plantações e currais, com criação de bovinos para produção de leite (FREITAS; MELLO; CRUZ, 2005) (Figura 6). Diversos animais coexistem no entorno da área estudada como cães, gatos e equinos, além de animais de produção como bovinos, suínos, galinhas e ovinos (DALLOZ, 2013).



Figura 9 - Visão aérea da área de estudo com os Pontos de armadilhagem de cada área georeferenciados (pontos pretos).

Figura 10 - Vista da localidade dos Fragmentos, Serra dos Órgãos, RJ.

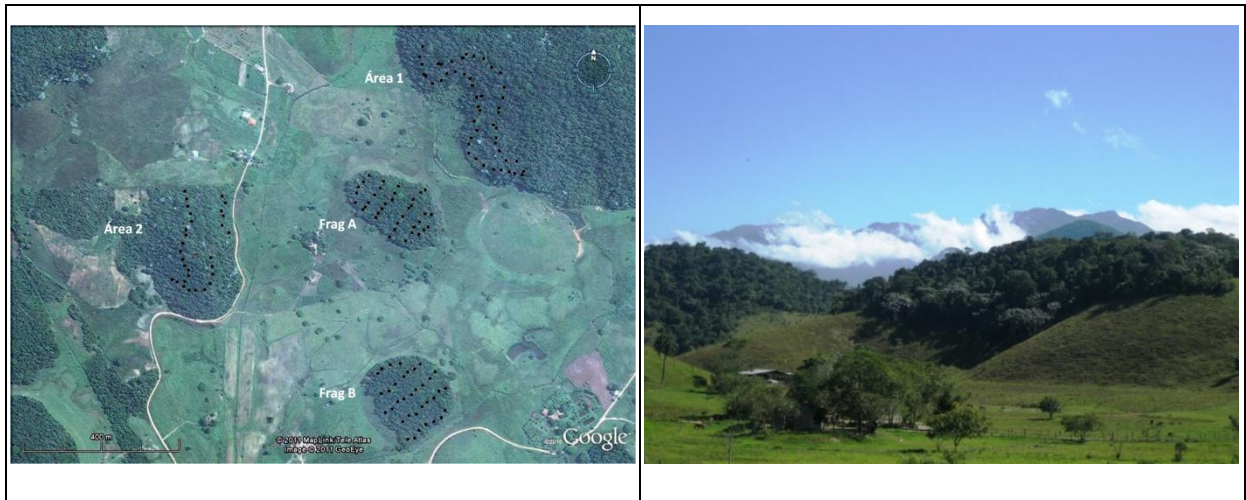


Foto: Dalloz, 2013

Foto: A autora, 2011.

## 4.2 Campanhas de campo

Foram realizadas oito coletas de material a campo, sendo quatro no Garrafão e quatro no Fragmento, intercaladas no tempo. Foi amostrado o período de julho de 2011 a fevereiro de 2012. As capturas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Vertebrados da UFRJ, que realiza trabalhos de longa duração nas duas áreas. A tabela 1 mostra o esquema de coletas ao longo do período amostrado, bem como as datas e o número de animais capturados em cada excursão.

No Garrafão as excursões de campo consistiram em cinco dias consecutivos de captura na mata. No Fragmento, por questões logísticas, os locais de coleta foram divididos em duas etapas consecutivas de cinco dias, totalizando dez dias de campo. Na primeira etapa as capturas foram realizadas nas áreas de mata e fragmento de nove hectares, e na segunda etapa nos fragmentos menores de 3,5 hectares. O esforço total no Fragmento foi de 5320 armadilhas-noite.

A metodologia de captura utilizada foi a mesma nas duas áreas, consistindo na colocação de armadilhas de captura viva do tipo Tomahawk®, modelo 201 (40.64 cm x 12.70 cm x 12.70 cm) no solo da mata, iscadas e abertas de tarde e verificadas pela manhã no dia seguinte (Figura 7). A isca utilizada consistiu numa mistura de amendoim, aveia, banana,

bacon e açúcar. As armadilhas eram verificadas diariamente e reiscadas em caso de não captura. Nos casos em que houve captura, a armadilha era trocada por uma limpa, e iscada.

Tabela 1 - Campanhas de campo, localidades, período e número de *Didelphis aurita* capturados. Em parêntesis o número de animais recapturados.

Campanha	Localidade	Período	Animais capturados (recapturas)
1	Fragmento	17 - 27 jul 2011	8
2	Garrafão	7 - 12 ago 2011	13
3	Fragmento	10 - 20 set 2011	11 (3)
4	Garrafão	10 - 14 out 2011	15 (4)
5	Fragmento	26 nov- 02 dez 2011	5 (2)
6	Garrafão	09 - 13 dez 2011	11 (4)
7	Garrafão	31 jan-04 fev 2012	15 (7)
8	Fragmento	06 - 15 fev 2012	9 (5)

Figura 11 - Armadilha Tomahawk montada no solo da mata.



Foto: Dalloz, 2013.



#### 4.3 Manipulação dos animais e coleta de material

Uma vez capturados na armadilha, os animais eram transferidos para sacos de contenção, onde eram pesados com o auxílio de dinamômetros (Figuras 8,9 e 10). Após pesagem, os indivíduos foram contidos fisicamente por um assistente equipado com luvas de couro. A contenção consistiu em segurar firmemente o pescoço e base da mandíbula com uma mão, enquanto a outra mão estendia os membros posteriores e pelve do animal (Figura 11).

Figura 12 - *Didelphis aurita* capturado em armadilha



Foto: A autora, 2011.

Figura 13 - Transferência de *Didelphis aurita* da armadilha para saco de contenção.



Foto: A autora, 2011.

A maioria dos animais mostrou-se tranqüila durante a contenção, alguns inclusive realizando tanatose, conhecido procedimento de defesa da espécie (CROFT, 2003; MIYATAKE et al., 2004; HONMA; OKU; NISHIDA, 2006). Entretanto outros poucos reagiram à contenção, permanecendo inquietos durante os procedimentos. Todos os esforços foram feitos no sentido de minimizar o impacto do estresse da contenção física sobre os animais.

Uma vez contido o animal, foi realizada biometria corporal com o auxílio de fita métrica (Figuras 12 e 13); determinado o sexo e a condição reprodutiva; examinado quanto à presença de ectoparasitas ou qualquer anormalidade, como ferimentos; e observada a dentição para caracterização da faixa etária (Figura 14) segundo Macedo et al. (2006), que dividiram os marsupiais em:

- Classe I (Jovens): Sexualmente imaturos; dentição  $dP^xM^{1,2}$ , ou como terceiro molar eclodindo.
- Classe II (Sub-adultos): Sexualmente já ativos; dentição ainda incompleta, mas já com o terceiro molar superior funcional ( $dP^x$  ou  $P^xM^3$ ).
- Classe III (Adultos): Animais sexualmente ativos, que possuem dentição completa ( $P^3M^4$ ).

Figura 14 - Pesagem com dinamômetro de indivíduo de *Didelphis aurita* em saco de contenção.



Foto: A autora, 2011.

Figura 15 - Contenção física de indivíduo de *Didelphis aurita*

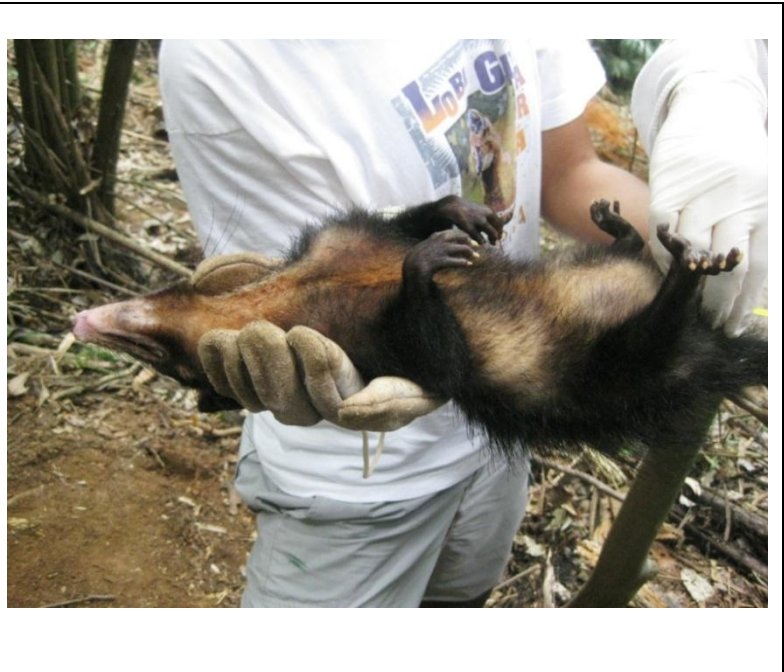


Foto: A autora, 2011.

Além destes procedimentos, caso fosse um animal capturado pela primeira vez, o mesmo era marcado com brinco numerado com quatro dígitos (National Band and Tag Co., Newport, Kentucky), colocado na junção das orelhas com o crânio, dos dois lados (Figura 15). Assim, cada indivíduo é identificado por uma série de dois números, correspondentes aos seus brincos. Caso fosse um indivíduo recapturado, o número dos brincos era anotado na identificação.



Figura 16 - Medição do comprimento do corpo.



Foto: A autora, 2011

Figura 17- Medição do comprimento da cauda.



Foto: A autora, 2011

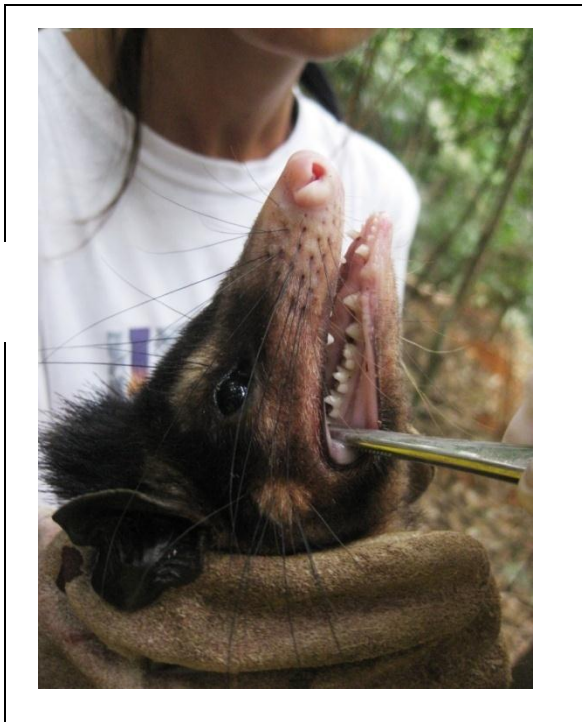
Figura 18 - Avaliação da dentição de indivíduo de *Didelphis aurita*.

Foto: A autora, 2011

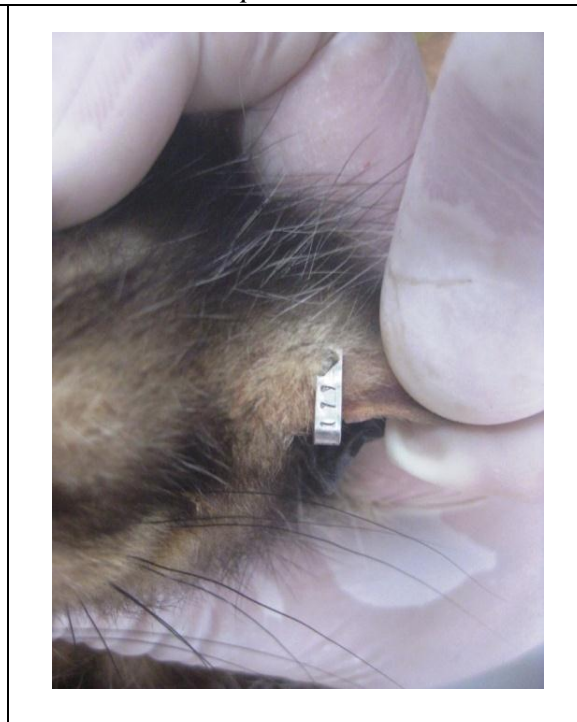
Figura 19 - Brinco de marcação individual colocado na orelha de *Didelphis aurita*.

Foto: A autora, 2011

No caso de fêmeas carregando filhotes na bolsa marsupial, os filhotes eram contados, sexados, medidos pelo menos um exemplar macho e uma fêmea, e marcados individualmente pelo corte de falanges, segundo procedimento padronizado (GENTILE; FERNANDEZ,

1999; SANDERSON, 1961) (Figuras 16, 17 e 18). Todo o cuidado foi tomado para evitar que filhotes desprendessem das mamas durante o procedimento.

Figura 20 - Filhotes de *Didelphis aurita* dentro do marsúpio.

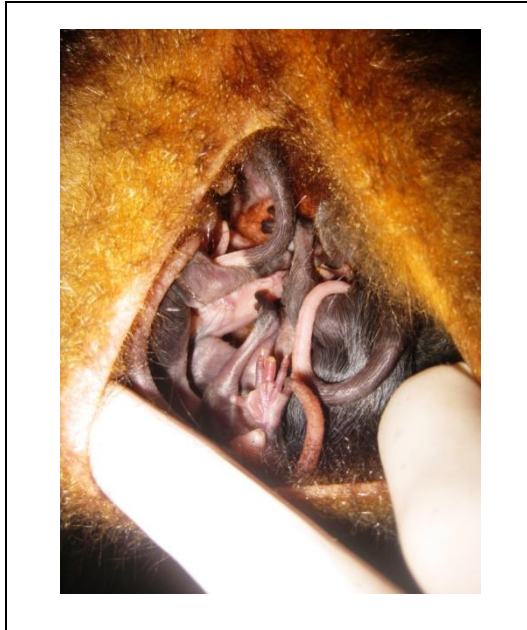


Foto: A autora, 2011.

O sangue foi coletado por punção da veia lateral caudal, após limpeza do local com álcool iodado (Figuras 19, 20 e 21). Utilizamos seringas plásticas descartáveis de três e cinco mL, com agulhas de calibre 25 x 7 e 20 x 5,5. Foram colhidos de 1 a 5 ml de sangue, dependendo do tamanho do indivíduo. Animais recapturados em diferentes excursões tiveram uma amostra de sangue avaliada por excursão.

Figura 21 - Medição de comprimento de cauda      Figura 22 - Corte de falange para marcação de filhote de *Didelphis aurita*.



Foto: A autora, 2011

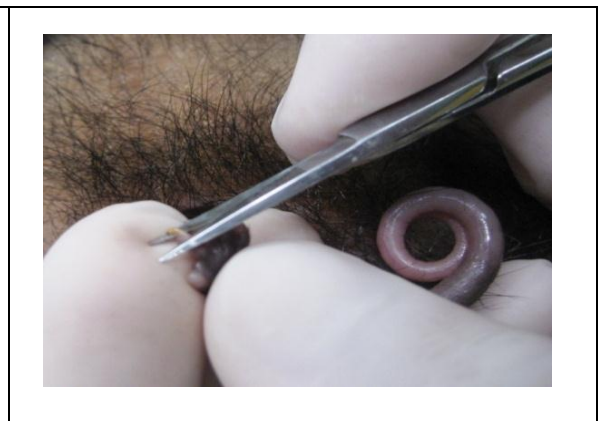


Foto: A autora, 2011.

Após a coleta, o sangue foi acondicionado em tubos do tipo Vacutainer® contendo EDTA (tampa roxa) para a realização do hemograma e sem anticoagulante (tampa vermelha) para a obtenção do soro sanguíneo. O tubo para hemograma foi mantido sob refrigeração em isopor com gelo artificial até ser levado ao laboratório, em período de até oito horas no máximo. O tubo sem anticoagulante foi mantido em temperatura ambiente até a retração do coágulo e centrifugado para separação do soro. Os soros foram congelados e mantidos a -2°C até a realização dos exames bioquímicos.

Não foram observadas irregularidades relacionadas à contenção e todos os animais foram liberados no mesmo local de captura logo após o término da coleta de material, que não excedeu 1 hora. Após soltura, os animais liberados mostraram comportamento e atividade normal da espécie. Este trabalho foi realizado sob licença # 29128 do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade/ ICMBio, e #034/2011 do Comitê de Ética no Uso de Animais/ CEUA-UERJ.

Figura 23 - Veia lateral caudal de *Didelphis aurita* (destacada pela linha vermelha).



Foto: A autora, 2011.



Figura 24 - Colheita de sangue de *Didelphis aurita*. Aspecto geral.



Foto: A autora, 2011.

Figura 25 - Colheita de sangue de *Didelphis aurita* pela veia lateral caudal. Detalhe.



Foto: A autora, 2011.

#### 4.4 Processamento das amostras de sangue

Os hemogramas das primeiras cinco campanhas foram realizados no Laboratório de análises clínicas da Faculdade de Veterinária da Fundação Educacional Serra dos Órgãos (FESO) e das últimas três no Laboratório do Instituto Veterinário de Diagnóstico (IVD), ambos em Teresópolis.

Os exames foram realizados manualmente, exceto para a dosagem de hemoglobina, realizada em espectrofotômetro com kit específico Labtest®. O volume globular foi determinado pela técnica do microhematócrito. Para a contagem de hemácias e leucócitos na câmara de Neubauer® foram utilizados os diluentes líquidos de Gower e Turk, respectivamente, nas diluições de 1:200 para hemácias e 1:20 para leucócitos (TARRAGONA et al., 2011). O volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média foram obtidos por cálculos matemáticos. A proteína plasmática total (PPT) foi dosada pela leitura do plasma sanguíneo após centrifugação em tubos de microhematócrito, com o auxílio de refratômetro manual (ATAGO, Tokyo, Japão).

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas coradas com Panótico rápido. As lâminas foram observadas em microscópio óptico no aumento de 1000x para contagem diferencial de leucócitos, avaliação das hemácias e busca por hemoparasitas. Foram avaliadas também capas leucocitárias para busca por hemoparasitas.

Os soros foram mantidos congelados até a realização dos exames, que demorou no máximo dois meses desde a coleta. As dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Clínica Veterinária VetCare, no Rio de Janeiro. As análises foram realizadas em espectrofotômetro tipo Bioplus® com kits comerciais Labtest®.

#### 4.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os programas *Statistical Analysis & Graphics Software (NCSS)* e *Power Analysis & Sample Size Software (PASS)*. Os resultados foram tabelados em dois grupos, correspondentes às duas áreas de estudo. Inicialmente foi feita a estatística descritiva de cada parâmetro e então foram aplicados os testes de Anderson-Darling e de Kolmogorov-Smirnov, para testar a compatibilidade das distribuições com a curva Gaussiana (curva normal). O critério estabelecido foi o de aceitar a normalidade somente se ambos os testes assim o indicassem.

Este procedimento orientou a escolha do tipo de teste estatístico (paramétricos ou não-paramétricos) para comparação dos valores entre os grupos, em busca de diferenças estatísticas significativas. Para distribuições normais foi aplicado o *Variance-Ratio Equal variance Test* e o *Modified-Levene Equal-Variance Test*, para verificar se as variâncias eram iguais ou não. Foram consideradas variâncias iguais quando ambos os testes assim o julgassem. Se elas fossem iguais, para comparar as amostras era empregado o *Equal-Variance T-test*. Se fossem desiguais, era aplicado o *Aspin-Welch Unequal-Variance Test*. Para as distribuições não normais, os valores foram comparados com os testes de Mann-Withney ou o de Wilcoxon, e o de Kolmogorov-Smirnov.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Considerações gerais

Diversas técnicas de colheita de sangue têm sido relatadas para estudos em *Didelphis* spp., como a punção cardíaca após anestesia (CASAGRANDE et al., 2009; DIESCH et al., 1970; FERRARONI; MARZOCHI, 1980; FORNAZARI et al., 2011; JORGE et al., 2008; PINTO et al., 2006; RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002; TOLEDO et al., 1997), a punção da veia jugular (BLITVICH et al., 2009; CARNEIRO et al., 2010; CEUA, 2008), da veia mamária (CASAGRANDE et al., 2009), das veias femoral ou safena lateral (BLITVICH et al., 2009; CEUA, 2008) ou da veia caudal (CASAGRANDE et al., 2009; CEUA, 2008; FORNAZARI et al., 2011; REJMANEK et al., 2009; TARRAGONA et al., 2011).

No nosso trabalho optamos pela veia lateral caudal para colheita de sangue por ser um vaso sanguíneo periférico, de fácil acesso sem a necessidade de sedação. Esta via mostrou-se adequada na maioria dos casos, sendo de fácil visualização e permitindo a obtenção de volume desejado de sangue. Entretanto, foi necessário algum tempo de treinamento para melhorar a eficiência da coleta, já que em alguns indivíduos a veia lateral caudal mostrou-se mais profunda.

Além disso, nos animais que realizaram tanatose observou-se uma dificuldade de extração do sangue na seringa, talvez em virtude de queda da pressão sanguínea. Utilizamos agulhas de tamanho 20x 5,5 e 25 x7, porém as agulhas de 20 x 5,5 mostraram-se mais adequadas por serem mais curtas e assim permitirem maior precisão na punção venosa.

A massa corporal dos *Didelphis aurita* variou significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparados os grupos das duas áreas de estudo. Animais do Garrafão apresentaram maior massa corporal do que indivíduos do Fragmento (Tabela 2). Este resultado pode refletir uma maior disponibilidade de recursos no Garrafão, ou mesmo um maior gasto energético dos animais do Fragmento como, por exemplo, a necessidade de maior movimentação em busca de alimento.

Morfologicamente, Lewis (1975) observou que as hemácias de *Didelphis virginiana* foram um pouco menores do que as humanas, porém os leucócitos foram semelhantes, com predominância de linfócitos. Além dos leucócitos normalmente encontrados em mamíferos,



Tarragona et al. (2011) relataram em *D. albiventris* na Argentina leucócitos anelares, tipos celulares que já haviam sido descobertos em marsupiais da Austrália.

Tabela 2 - Estatística descritiva de massa corporal (em gramas) para animais do Fragmento e Garrafão.

<b>Massa Corporal (n° de animais)</b>	<b>Média (± desvio padrão)</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>Fragmento (32)</b>	863,46 (± 334,38)	742,90- 984,02	59,11
<b>Garrafão (52)</b>	1.184,23(± 437,86)	1.062,32- 1.306,13	60,72

Fonte: autora, 2012.

Os leucócitos anelares, anteriormente não descrito em marsupiais da América do Sul, foi encontrado por Tarragona et al. (2011) em contagem elevada em um indivíduo que apresentava abscesso. Tratou-se de uma célula com núcleo anelar e citoplasma basófilo, encontrada em 25 % das amostras analisadas. No nosso estudo não observamos a presença deste leucócito anelar descrito por Tarragona et al. (2011), tendo sido encontrados os tipos leucocitários usuais de mamíferos (Figuras 26-32).

Figura 26 - Basófilo de *Didelphis aurita*. Aumento 1000x. Coloração Panótico. Figura 27 - Neutrófilo Bastão de *Didelphis aurita*. Aumento 1000x. Coloração Panótico.

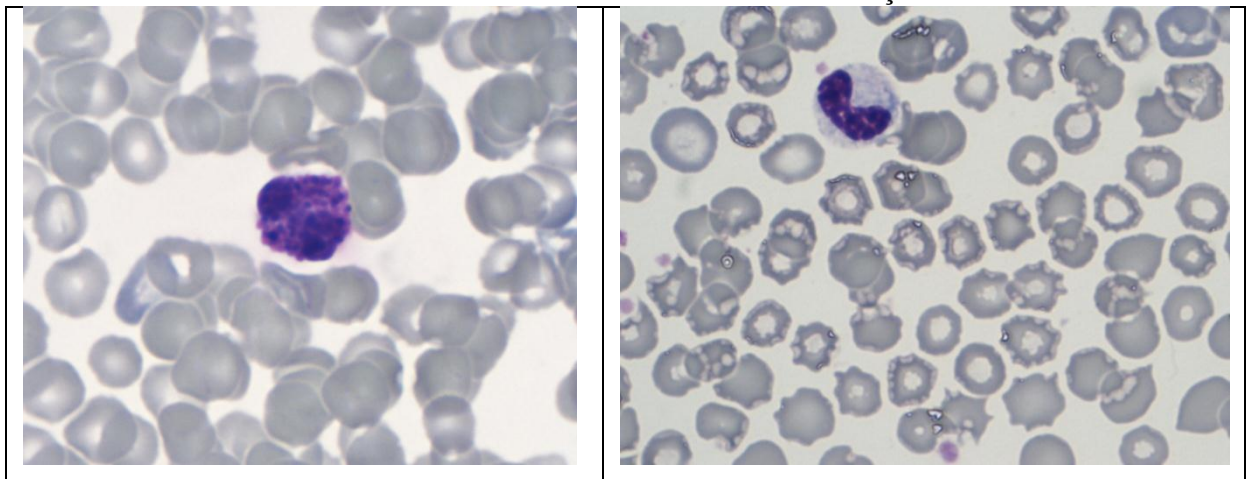


Foto: A autora, 2011.

Foto: A autora, 2011.

Alterações morfológicas foram encontradas em 55% das amostras de sangue avaliadas por Tarragona et al. (2011), sendo as mais comuns a formação de rouleaux e a presença de estomatócitos. Estomatócitos já haviam sido descritos em outros marsupiais, e podem surgir como resultado de falha na confecção do esfregaço sanguíneo. A formação de rouleaux pode ocorrer devido a características hematológicas próprias da espécie, como ocorre em felinos e

equinos, à falha técnica na confecção do esfregaço ou ainda devido ao aumento de fibrinogênio nos processos inflamatórios. No nosso trabalho observamos eventualmente a formação de rouleaux.

Figura 28 - Eosinófilo de *Didelphis aurita*. Aumento 1000 x. Coloração Panótico.

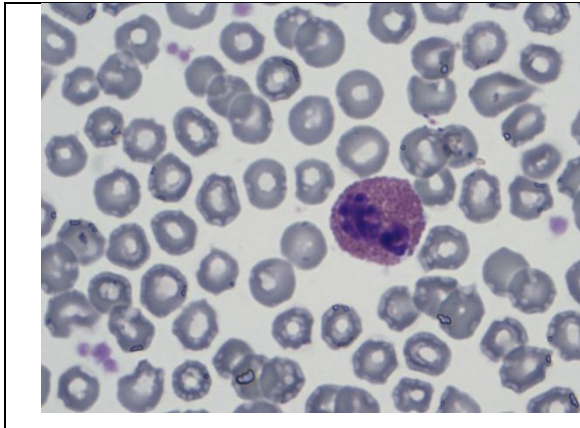


Foto: A autora, 2011.

Figura 29 - Eosinófilo de *Didelphis aurita*. Aumento 1000x. Coloração Panótico.

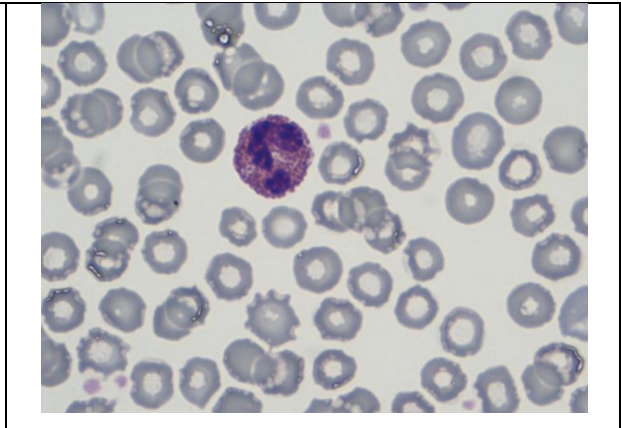


Foto: A autora, 2011.

Figura 30 - Neutrófilo segmentado de *Didelphis aurita*. Aumento 1000x. Coloração Panótico.

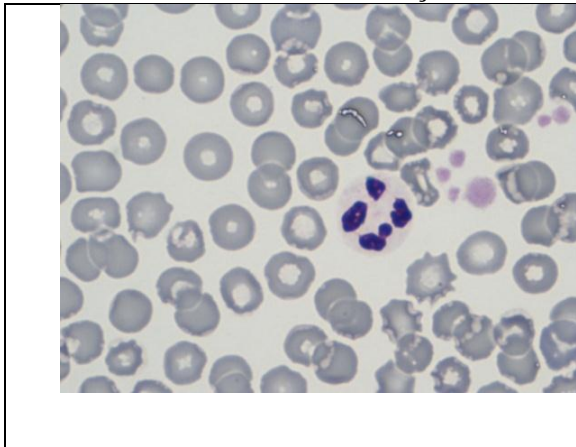


Foto: A autora, 2011.

Figura 31 - Linfócito de *Didelphis aurita*. Aumento 400x. Coloração Panótico.

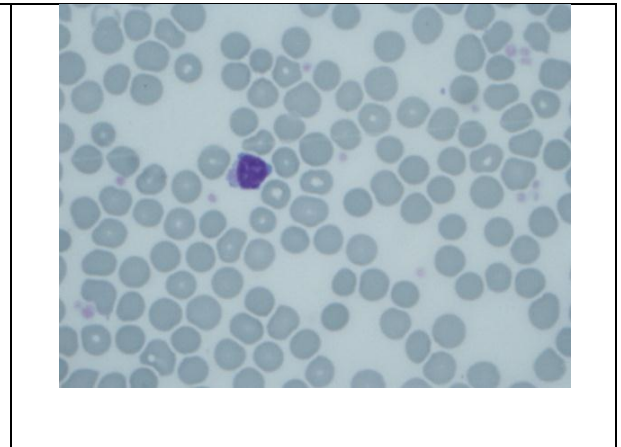


Foto: A autora, 2011.

As plaquetas dos mamíferos são derivadas do citoplasma dos megacariócitos, a única célula hematopoiética poliplóide, encontrada somente na Classe Mammalia. Em todos os outros grupos as células envolvidas na coagulação do sangue são nucleadas. As plaquetas estão envolvidas em mecanismos múltiplos de defesa, incluindo a coagulação, sendo capazes de agregação e recuperação de feridas (LEVIN, 2007).

O processo de coagulação foi descrito em monotrematas e marsupiais como semelhante ao humano. A retração do coágulo, que é consistente com a função normal das plaquetas também foi observada nas duas Ordens (LEVIN, 2007). Porém segundo Lewis (1975) o fibrinogênio de *Didelphis virginiana* tem menor capacidade de coagulação do que o de humanos, embora quantitativamente sejam semelhantes.

Figura 32 - Hemácias e metarrubricito em *Didelphis aurita*. Aumento 400x. Coloração Panótico.

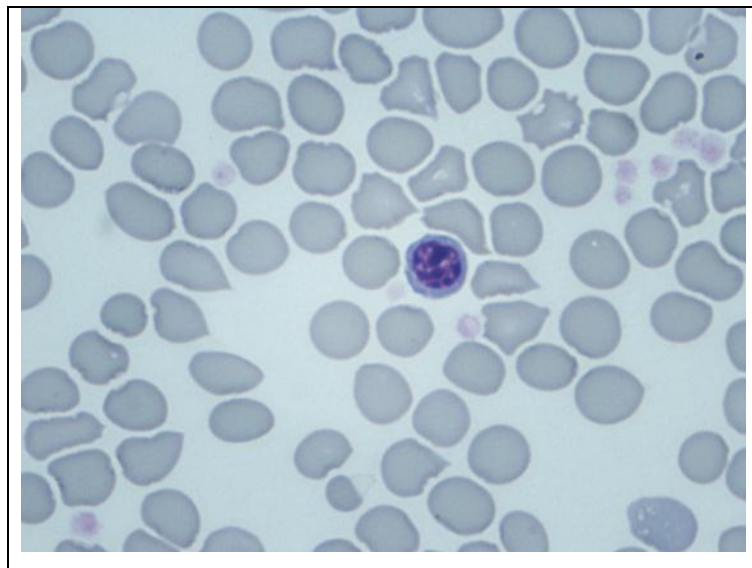


Foto: A autora, 2011.

## 5.2 Hemograma

Os resultados de eritrograma e leucograma de *Didelphis aurita* obtidos deste estudo serão apresentados sob a forma de artigo científico em seguida apresentado, submetido ao periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.

Nas oito excursões realizadas foram capturados 61 animais, e coletadas 81 amostras de sangue. Dezesseis indivíduos foram recapturados em diferentes excursões, e tiveram mais de uma amostra analisada. Os machos foram 28 e fêmeas 33, sendo ainda 14 jovens e 47 adultos. Os pesos variaram de 225 g a 2.520 g. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para os parâmetros avaliados entre as duas áreas de estudo. Na tabela 3 estão

apresentados os valores de eritrograma e leucograma de todo o grupo com média e desvio padrão.

A variabilidade expressa através do desvio padrão mostrou-se muito elevada para basófilos e bastões, pois o desvio padrão foi maior do que a média. A mesma situação foi observada por Carneiro et al. (2010) em *Didelphis albiventris*. Para os monócitos o desvio padrão também foi elevado. Nosso universo amostral foi maior do que outros trabalhos encontrados (Tarragona et al. 2011).

A coleta de sangue pela veia caudal lateral mostrou-se uma via adequada para a obtenção de amostras de sangue, necessitando somente de algum treino para aperfeiçoamento da técnica. Tarragona et al. (2011) também utilizaram esta via com sucesso em *D. albiventris*.

Tabela 3 - Valores de hemograma de *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos/ RJ com estatística descritiva. N=81 exceto PPT (N=38).

Parâmetro	Média ( $\pm$ DP)	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Hematócrito <sup>a</sup>	38,66 ( $\pm$ 4,97)	0,55	37,56-39,76
Hemácias <sup>b</sup>	5,40 ( $\pm$ 0,75)	0,08	5,23- 5,56
Hemoglobina <sup>c</sup>	12,78 ( $\pm$ 1,68)	0,18	12,41- 13,16
VGM <sup>d</sup>	71,69 ( $\pm$ 3,56)	0,39	70,91- 72,48
CHGM <sup>e</sup>	33,01 ( $\pm$ 0,63)	0,07	32,87- 33,15
Plaquetas <sup>f</sup>	514,70 ( $\pm$ 323,10)	35,90	443,25- 586,14
Leucócitos <sup>g</sup>	19.678,52 ( $\pm$ 10.152,26)	1.128,02	17.433,67- 21.923,37
Basófilos <sup>a</sup>	0,59 ( $\pm$ 0,72)	0,08	0,43- 0,75
Eosinófilos <sup>a</sup>	13,79 ( $\pm$ 6,94)	0,77	12,25- 15,32
Bastões <sup>a</sup>	0,77 ( $\pm$ 2,04)	0,22	0,32- 1,22
Segmentados <sup>a</sup>	41,12 ( $\pm$ 13,95)	1,55	38,03- 44,20
Linfócitos <sup>a</sup>	41,97 ( $\pm$ 12,97)	1,44	39,10- 44,84
Monócitos <sup>a</sup>	1,75 ( $\pm$ 1,51)	0,16	1,41- 2,08
PPT <sup>c</sup>	7,95 ( $\pm$ 1,04)	0,16	7,61- 8,30

Legenda: <sup>a</sup>%, <sup>b</sup> x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>, <sup>c</sup> g/dl, <sup>d</sup> fl, <sup>e</sup> %, <sup>f</sup> x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, <sup>g</sup>/mm<sup>3</sup>.

Fonte: A autora, 2012.

Casagrande *et al.* (2009) encontraram em *D. aurita* os seguintes valores: Volume globular: 31,85%; Hemácias:  $4,30 \times 10^6/\text{mm}^3$  e Hemoglobina 10,96 g/dL, todos inferiores aos valores aqui descritos. Embora se trate da mesma espécie, o trabalho citado foi realizado no Estado de São Paulo, com animais de vida livre e cativos, provenientes de diferentes regiões, e submetidos a condições heterogêneas de ambiente, clima e alimentação. Todas essas variáveis podem interferir nos parâmetros do eritograma.

Em comparação com outras espécies de gambás, Carneiro *et al.* (2010) relataram para *D. albiventris* os valores de Volume Globular: 34,15%; Hemácias:  $4,32 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hemoglobina 11,04 g/dL. Wallach e Boever (1983) trabalhando com *D. virginiana* encontraram os seguintes valores: Volume Globular: 37,5%; Hemácias:  $4,6 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hemoglobina 12,25 g/dL. A média de hemoglobina descrita por Hoversland *et al.* (1979) para *Didelphis virginiana* foi de 12,0 ( $\pm 2,2$ ) g%. Todos obtiveram valores também inferiores aos aqui descritos.

Em relação às plaquetas, não obtivemos valores de comparação para a mesma espécie. Olfert *et al.* (1993) relataram para *D. virginiana* o valor médio de  $735.000/\text{mm}^3$ , enquanto Carneiro *et al.* (2010) obtiveram  $311.520/\text{mm}^3$  em *D. albiventris*. Os valores citados são maiores e menores, respectivamente, aos aqui relatados, e mostram intensa variabilidade. A contagem de plaquetas é um parâmetro que pode sofrer diversas alterações decorrentes do tempo e dos métodos de colheita de sangue empregados, bem como do tempo decorrido entre a obtenção da amostra e a análise no laboratório (Feldman *et al.* 2000). Estes fatores podem ter sido responsáveis pelas diferenças observadas.

Casagrande *et al.* (2009) relataram para *D. aurita* valores médios de leucócitos de  $8.205/\text{mm}^3$ , bastante inferiores aos aqui descritos. Em *D. albiventris* foi relatado o valor de  $16.780/\text{mm}^3$  (Carneiro *et al.*, 2010) e em *D. virginiana* (Wallach; Boever, 1983)  $18.450/\text{mm}^3$ , um pouco mais próximos ao valor aqui descrito, porém ainda inferiores. Mais uma vez essas diferenças podem dever-se às diferentes condições ambientais, climáticas e alimentares às quais estes animais estiveram submetidos, além de possíveis variações entre as espécies.

Quanto às contagens diferenciais, em *D. aurita* Casagrande *et al.* (2009) relataram valores aproximados de: Neutrófilos 33,65%; Linfócitos 44,54%; Monócitos 4,42%; Eosinófilos 16,59% e Basófilos 0,80%. Comparativamente, os valores de eosinófilos, linfócitos e monócitos foram superiores aos deste trabalho, enquanto neutrófilos e basófilos foram inferiores. Entretanto, a variação entre os valores pode ser considerada pequena, exceto para linfócitos e monócitos.

Em *D. albiventris*, Carneiro et al. (2010) relataram valores de Neutrófilos 45,55%; Linfócitos 48,91%; Monócitos 1,52%; Eosinófilos 3,70%; e Basófilos 0,24%. Wallach e Boever (1983) descreveram para *D. virginiana* valores médios para Neutrófilos 39,5 %, Linfócitos 40,25%, Monócitos 1 %, Basófilos 1% e Eosinófilos 8,5 %. Todos os valores são próximos aos encontrados neste trabalho, com exceção dos eosinófilos, que variaram bastante em todos os trabalhos. Os valores aqui descritos foram quase o dobro (14,28%) do descrito por Wallach e Boever (8,5%) e mais de três vezes do encontrado por Carneiro *et al.* (2010).

Esta diferença pode dever-se ao fato de que no local do nosso estudo os animais encontravam-se intensamente parasitados, fato comprovado por análises coproparasitológicas realizadas nos indivíduos capturados. Além de alta incidência de parasitos, foi comum a ocorrência de múltiplas parasitoses simultâneas, tendo sido encontrados até oito parasitas diferentes colonizando o mesmo indivíduo (dados não publicados).

Casagrande et al. (2009) encontraram predominância de linfócitos em todas as classes etárias e ambos os sexos de *D. aurita*, seguidos de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos, uma distribuição semelhante a outros relatos na literatura (Giacometti et al., 1972; Lewis, 1975; Magalhães, 2001 *apud* Casagrande et al., 2009). Em jovens e machos de *D. albiventris* Casagrande et al. (2009) encontraram disposição semelhante, porém sendo os monócitos mais freqüentes do que os eosinófilos e basófilos. Em adultos desta espécie, os neutrófilos predominaram sobre os linfócitos, seguidos de eosinófilos, monócitos e basófilos. No nosso trabalho encontramos predominância de linfócitos, seguidos de segmentados, eosinófilos, monócitos e basófilos quando avaliado o grupo como um todo, machos e fêmeas e indivíduos adultos. O grupo dos jovens apresentou inversão entre linfócitos e segmentados, sendo os segmentados mais freqüentes. As demais células seguiram a mesma freqüência.

Analisando variações de parâmetros de hemograma segundo as estações do ano na Argentina, Tarragona et al. (2011) encontraram valores de eosinófilos significativamente maiores no verão do que no inverno em *D. albiventris*, creditando esta diferença à oscilações nos níveis de parasitoses, que são mais freqüentes no verão. No nosso trabalho não realizamos comparações entre as estações do ano, porque não pudemos obter amostras representativas de todas as estações.

Para a dosagem de proteína plasmática total (PPT) não puderam ser aproveitadas todas as amostras. Este parâmetro não variou significativamente entre machos e fêmeas, apresentando valor médio ( $\pm$  desvio padrão) de 7,76 ( $\pm$  1,28) para machos (N= 10) e 8,14 ( $\pm$  0,89) para fêmeas (N= 26). Entre jovens e adultos foi observada diferença significativa

( $p < 0,05$ ) sendo os valores dos adultos maiores do que os dos jovens. Assim, a PPT nos jovens ( $N = 18$ ) foi de 7,41 ( $\pm 0,77$ ), e nos adultos ( $N = 19$ ) foi de 8,42 ( $\pm 1,04$ ). Casagrande et al. (2009) também encontraram esta variação em *Didelphis aurita* e *D. albiventris*.

As tabelas 4 e 5 trazem os resultados de eritrograma e leucograma de machos e fêmeas e jovens e adultos, respectivamente.

Os parâmetros hematócrito, hemoglobina e hematimetria apresentaram variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de machos e fêmeas, sendo maiores nos machos (tabela 4). Em estudo com *D. albiventris* na Mata Atlântica de Pernambuco, Carneiro et al. (2010) não encontraram diferença entre machos e fêmeas para os valores de eritrograma, plaquetas, proteína plasmática total e reticulócitos ( $p < 0,05$ ), concluindo que o sexo não interfere significativamente nas variáveis hematológicas desta espécie. Outros autores também não encontraram variação de parâmetros de eritrograma relacionado ao sexo em *D. albiventris* de vida livre e *D. aurita* de cativeiro e vida livre (Tarragona et al., 2011; Casagrande et al., 2009).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores hematológicos de *Didelphis aurita* da Serra dos Órgãos segundo o sexo.

<b>Parâmetros Hematológicos</b>	<b>Machos (N=28)</b>	<b>Fêmeas (N=51)</b>
Volume Globular	41,64 ( $\pm 5,32$ )	36,98 ( $\pm 4,04$ )
Hemácias	5,85 ( $\pm 0,81$ )	5,13 ( $\pm 0,58$ )
Hemoglobina	13,8 ( $\pm 1,80$ )	12,22 ( $\pm 1,36$ )
VGM	71,31 ( $\pm 2,98$ )	72,04 ( $\pm 3,49$ )
CHGM	33,08 ( $\pm 0,33$ )	32,99 ( $\pm 0,73$ )
Plaquetas	437.000 ( $\pm 290.000$ )	543.000 ( $\pm 334.000$ )
Leucócitos Totais	22.526,79 ( $\pm 12.171,97$ )	18.449,21 ( $\pm 8.711,38$ )
Basófilos	0,46 ( $\pm 0,63$ )	0,66 ( $\pm 0,76$ )
Eosinófilos	13,67 ( $\pm 6,04$ )	13,76 ( $\pm 7,29$ )
Bastonetes	1,03 ( $\pm 3,17$ )	0,66 ( $\pm 1,07$ )
Segmentados	40,71 ( $\pm 11,77$ )	41,62 ( $\pm 14,92$ )
Linfócitos	42,07 ( $\pm 11,09$ )	41,66 ( $\pm 14,09$ )
Monócitos	2 ( $\pm 2,16$ )	1,64 ( $\pm 1,03$ )

Legenda: <sup>a</sup>%, <sup>b</sup>  $\times 10^6/\text{mm}^3$ , <sup>c</sup> g/dl, <sup>d</sup> fl, <sup>e</sup> %, <sup>f</sup>  $\times 10^3/\text{mm}^3$ , <sup>g</sup>  $\text{mm}^3$ .

Fonte: A autora, 2012.

Entretanto, a literatura relata que em pequenos mamíferos as espécies menores tendem a ter valores mais elevados de hemoglobina e hematócrito do que espécies maiores, fêmeas prenhas e lactantes tendem a ter valores menores do que machos e fêmeas não prenhas, e juvenis apresentaram valores inferiores do que adultos (Sealander, 1964). No nosso trabalho identificamos que fêmeas de *Didelphis aurita* da Serra dos Órgãos apresentam valores de hemograma, hemoglobina e hematimèntria inferiores aos adultos.

Em relação ao leucograma, Tarragona et al. (2011) observaram fêmeas de *D. albiventris* com contagens de neutrófilos significativamente maiores do que os machos ( $p < 0,05$ ), com o dobro de média em relação a estes. Os autores sugeriram que exista uma exposição diferencial das fêmeas a infecções agudas ou ao estresse, porém esta diferença não foi encontrada por outros autores em *D. albiventris* e *D. aurita* de diferentes localidades (Casagrande et al., 2009; Carneiro et al., 2010).

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos valores hematológicos de *Didelphis aurita* da Serra dos Órgãos segundo a classe etária.

<b>Parâmetros Hematológicos</b>	<b>Jovens (N= 18)</b>	<b>Adultos (N= 62)</b>
Volume Globular	35,38 (± 3,94)	39,61 (± 4,90)
Hemácias	4,98 (± 0,74)	5,51 (± 0,73)
Hemoglobina	11,71 (± 1,23)	13,09 (± 1,68)
VGM	71,38 (± 6,53)	71,83 (± 2,14)
CHGM	33,08 (± 0,75)	32,99 (± 0,60)
Plaquetas	849.000 (± 138.000)	413.000 (± 295.000)
Leucócitos Totais	15.366,67 (± 6.924,12)	20.930 (± 10.711,31)
Basófilos	0,66 (± 0,68)	0,56 (± 0,73)
Eosinófilos	15,33 (± 8,77)	13,24 (± 6,33)
Bastonetes	0,27 (± 0,57)	0,91 (± 2,29)
Segmentados	44,83 (± 16,71)	40,17 (± 13,09)
Linfócitos	37,44 (± 11,89)	43,25 (± 13,17)
Monócitos	1,44 (± 0,85)	1,85 (± 1,65)

Legenda: <sup>a</sup>%, <sup>b</sup> x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>, <sup>c</sup> g/dl, <sup>d</sup> fl, <sup>e</sup> %, <sup>f</sup> x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, <sup>g</sup>/mm<sup>3</sup>.

Fonte: A autora, 2012.

A contagem de neutrófilos pode se alterar por inflamação aguda em função de infecções bacterianas ou em resposta ao estresse agudo ou crônico. Futuras investigações com uma amostragem mais ampla poderão elucidar a validade desta correlação, e de sua aplicação



para além das condições regionais do estudo de Tarragona e colaboradores (2011). No nosso estudo, não observamos diferenças entre os sexos para variáveis de leucograma.

Os parâmetros hematócrito, hematimetria e hemoglobina foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos adultos em relação aos jovens (tabela 5). Casagrande et al. (2009) comparando jovens e adultos de *D. aurita* encontraram valores de hemoglobina, eritrócitos e CHGM significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em adultos do que em jovens. Já os valores de hemoglobina foram maiores nos jovens do que nos adultos. Em *D. albiventris*, os mesmos autores encontraram valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) de hematócrito em adultos do que em jovens. Tarragona et al. (2011) não encontraram influência de idade, sexo ou estação do ano sobre eritrócitos de *D. albiventris*.

Indivíduos jovens apresentaram médias significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os adultos para plaquetas. Este parâmetro foi bastante variável entre os indivíduos.

A leucometria global foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos adultos do que nos jovens (tabela 3). Este resultado está de acordo com o descrito por Casagrande et al. (2009) para *Didelphis aurita* e *D. albiventris*, justificado pelo fato de que animais adultos são mais parasitados e infectados por diversos agentes do que os jovens.

Foi descrita a variação sazonal de eosinófilos de *D. albiventris* na Argentina, sendo estes mais comuns no verão. O inverno foi a estação com menor número de eosinófilos, possivelmente associado a uma menor carga parasitária em relação ao verão (Tarragona et al. 2011). Outro estudo com roedores concluiu que a estacionalidade seria o fator mais importante para determinar a variabilidade das contagens de células sanguíneas.

Os resultados mostraram diferenças quando comparados a literatura citada, porém é válido ressaltar que se trata de diferentes espécies, que habitam ambientes distintos, e estão submetidas a condições diversas de alimentação, clima, parasitismo e enfermidades. Outros fatores que podem interferir nos resultados são a época do ano em que foi realizado o estudo e se são animais cativos ou de vida livre.

*Didelphis* spp. são animais que aparecem com frequência em centros de Triagem e Zoológicos, muitas vezes precisando de suporte médico. Assim torna-se importante o estabelecimento de parâmetros hematológicos de referência para as espécies brasileiras, especialmente aquelas menos estudadas. Os resultados aqui apresentados contribuem para o estabelecimento destes parâmetros para *Didelphis aurita*, aperfeiçoando assim o estudo desta espécie.

### 5.3 Bioquímica

Os resultados dos parâmetros bioquímicos estudados na população total de *Didelphis aurita* da Serra dos Órgãos estão expressos na tabela 6, as diferenças entre as duas áreas de estudo na tabela 7, diferenças entre sexos na tabela 8 e diferenças entre classes etárias na tabela 9.

Na comparação entre jovens e adultos, obteve-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros albumina, proteína total, creatinina e GGT, sendo todos mais elevados em adultos do que em jovens. O inverso foi observado para fosfatase alcalina e globulina. Entre machos e fêmeas observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para ALT, AST e fosfatase alcalina, sendo todos mais elevados em machos do que em fêmeas.

Tabela 6 - Estatística descritiva de bioquímica sérica de *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos, RJ. Amostras não separadas por sexo nem idade.

Parâmetro	Média ( $\pm$ desvio padrão)	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)	n° de animais
PT <sup>a</sup>	8,50 ( $\pm$ 1,68)	0,19	8,10- 8,90	71
Albumina <sup>a</sup>	3,03 ( $\pm$ 0,69)	0,08	2,87-3,19	74
Globulina <sup>a</sup>	5,44 ( $\pm$ 1,66)	0,19	5,05-5,84	71
Uréia <sup>b</sup>	83,57 ( $\pm$ 20,11)	2,35	78,88- 88,26	73
Creatinina <sup>b</sup>	0,44 ( $\pm$ 0,13)	0,02	0,41- 0,47	75
ALT <sup>c</sup>	85,01 ( $\pm$ 65,65)	8,40	68,20- 101,83	61
AST <sup>c</sup>	314,55 ( $\pm$ 130,58)	15,60	283,42- 345,69	70
FA <sup>c</sup>	420,38 ( $\pm$ 371,89)	43,82	332,99- 507,77	72
GGT <sup>c</sup>	19,40 ( $\pm$ 8,51)	1,02	17,35-21,44	69

Legenda: <sup>a</sup>g/dl; <sup>b</sup>mg/dl; <sup>c</sup>U/L. PT= proteínas totais; ALT= Alanina amino transferase; AST= Aspartato aminotransferase; GGT= Gama glutamil transferase; FA= Fosfatase alcalina.

Fonte: A autora, 2012.

Comparando as duas áreas de estudo, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros proteínas totais, ALT, AST, fosfatase alcalina, uréia e creatinina. Os parâmetros albumina, globulina e GGT foram significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre as duas áreas, conforme resultados na tabela 6.

Não encontramos na literatura valores para comparação de proteínas totais em *Didelphis aurita*. Valores de proteínas totais de 6,4 ( $\pm$  0,5) g/dl e de albumina de 2,32 ( $\pm$  0,54) g/dl foram relatados para adultos de *Didelphis virginiana* (ROWLANDS; DUDLEY, 1969), sendo inferiores ao encontrados neste estudo. A concentração de proteínas totais pode ser influenciada pelo estado nutricional, função hepática e renal, estimulação da resposta imune e ocorrência de doenças (KRUPP; SCHROEDER; TIERNEY, 1994; SANTOS, 1999). Assim, a diferença observada entre o nosso trabalho e o de Rowlands e Dudley (1969) pode dever-se a diversos fatores, como diferença entre espécies, oferta de recursos e desafios imunológicos.

A dosagem de proteínas totais reflete a albumina e todas as frações de globulinas presentes no soro do animal. Em *D. virginiana*, foram identificadas cinco frações de proteínas por separação em gel de eletroforese, correspondentes à albumina, e às globulinas gama, beta, alfa 1 e alfa 2 (ROWLANDS; DUDLEY, 1969).

Tabela 7 - Valores com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Fragmento e Garrafão.

Parâmetro	Localidade	Média ( $\pm$ desvio padrão)	Intervalo de confiança	Erro padrão (n° de animais)
<b>GGT<sup>a</sup></b>	Fragmento	24,93 ( $\pm$ 9,47)	21,18- 28,68	1,82 (27)
	Garrafão	15,84 ( $\pm$ 5,48)	14,13- 17,55	0,84 (42)
<b>Albumina<sup>b</sup></b>	Fragmento	2,76 ( $\pm$ 0,62)	2,52- 3,00	0,11 (29)
	Garrafão	3,20 ( $\pm$ 0,68)	3,00- 3,41	0,10 (45)
<b>Globulina<sup>b</sup></b>	Fragmento	6,07 ( $\pm$ 2,02)	5,28- 6,85	0,38 (28)
	Garrafão	3,29 ( $\pm$ 4,11)	2,02- 4,55	0,62 (43)

Legenda: <sup>a</sup>U/L; <sup>b</sup>g/dl. GGT= Gama glutamil transferase.

Fonte: A autora, 2012.

Portanto, além de variar segundo o teor de albumina, que é produzida pelo fígado, as proteínas totais podem ter ampla variação segundo a intensidade de síntese de globulinas. Além disso, variações entre diferentes espécies, ou mesmo entre raças têm sido descritas, como observado em raças de bovinos (SOUZA et al., 2004).

Em *Didelphis virginiana* as proteínas séricas se elevam gradualmente desde o nascimento até 80 dias de vida, quando atingem os valores de adulto (ROWLANDS; DUDLEY, 1969). Este processo foi evidenciado nos nossos resultados, onde encontramos valores de proteínas totais de jovens significativamente ( $p < 0,05$ ) menores do que os de adultos de *Didelphis aurita*. Esta variação foi considerada fisiológica para a espécie.

Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores de bioquímica sérica segundo o sexo (machos e fêmeas).

<b>Parâmetro</b>	<b>Sexo (N° de animais)</b>	<b>Média (<math>\pm</math> desvio padrão)</b>	<b>Intervalo de confiança 95%</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>PT<sup>a</sup></b>	Fêmeas (45)	8,62 ( $\pm$ 1,56)	8,15- 9,09	0,23
	Machos (25)	8,33 ( $\pm$ 1,91)	7,54- 9,12	0,38
<b>Albumina<sup>a</sup></b>	Fêmeas (46)	2,96 ( $\pm$ 0,73)	2,74- 3,18	0,10
	Machos (27)	3,14 ( $\pm$ 0,62)	2,90- 3,39	0,11
<b>Globulina<sup>a</sup></b>	Fêmeas (45)	2,88 ( $\pm$ 5,74)	1,16- 4,61	0,85
	Machos (25)	5,15 ( $\pm$ 2,04)	4,30- 5,99	0,40
<b>Uréia<sup>b</sup></b>	Fêmeas (47)	83,76 ( $\pm$ 20,27)	77,81- 89,71	2,95
	Machos (25)	84,96 ( $\pm$ 18,57)	77,29- 92,62	3,71
<b>Creatinina<sup>b</sup></b>	Fêmeas (47)	0,44 ( $\pm$ 0,15)	0,40-0,49	2,21
	Machos (27)	0,44 ( $\pm$ 0,11)	0,40- 0,49	2,15
<b>ALT<sup>c</sup></b>	Fêmeas (45)	71,4 ( $\pm$ 45,8)	75,64- 139,73	15,55
	Machos (26)	107,69 ( $\pm$ 79,33)	57,63- 85,16	6,82
<b>AST<sup>c</sup></b>	Fêmeas (45)	291,13 ( $\pm$ 113,41)	257,05- 325,20	16,9
	Machos (24)	362,41 ( $\pm$ 150,63)	298,80- 426,02	30,74
<b>FA<sup>c</sup></b>	Fêmeas (46)	376,95 ( $\pm$ 370,26)	267,00- 486,91	54,59
	Machos (25)	478 ( $\pm$ 363,41)	327,99- 628,00	72,68
<b>GGT<sup>c</sup></b>	Fêmeas (44)	20,43 ( $\pm$ 7,12)	16,24- 21,84	1,38
	Machos (24)	19,04 ( $\pm$ 9,21)	17,42- 23,44	1,45

Legenda: <sup>a</sup>g/dl; <sup>b</sup>mg/dl; <sup>c</sup>U/L. PT= proteínas totais; ALT= Alanina amino transferase; AST= Aspartato aminotransferase; GGT= Gama glutamil transferase; FA= Fosfatase alcalina.

Fonte: A autora, 2012.

Entre as frações das proteínas totais, a albumina se eleva rapidamente com a idade, alcançando valores de adulto mais rápido do que outras frações de proteína. Entre as imunoglobulinas, a IgM esteve presente em todos os estágios de desenvolvimento dos animais, enquanto a IgG só foi detectada a partir do sexto dia de vida. Em *D. virginiana* foi demonstrado que praticamente não ocorre transferência de imunoglobulinas pelo colostro entre a mãe e os filhotes (ROWLANDS; DUDLEY, 1969).

A albumina constitui a principal proteína do soro. Elevações de albumina no soro geralmente refletem desidratação, e sua redução pode indicar insuficiência hepática crônica,

perda renal, hemorragia grave e baixa ingestão protéica ou inanição (SANTOS, 1999). Não encontramos valores de albumina para comparação em *Didelphis aurita*.

Em outro marsupial neotropical *Caluromys lanatus*, Santos (1999) relatou valores de albumina de 5,12 ( $\pm$  0,40), superiores aos nossos. Desde o nascimento, a albumina se eleva gradualmente com a idade, alcançando valores de adulto mais rápido do que outras frações de proteína (ROWLANDS; DUDLEY, 1969). Esta dinâmica se refletiu nos nossos resultados, onde observamos valores de albumina significativamente ( $p < 0,05$ ) menores em indivíduos jovens em relação aos adultos em *D. aurita*. Esta variação foi considerada fisiológica para a espécie.

No nosso trabalho, os valores de albumina dos animais do Fragmento foram significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores do que os do Garrafão (tabela 7). Considerando que os animais estudados não mostravam indícios de doenças associadas, sendo caracterizados como clinicamente saudáveis, acreditamos que esta diferença se deva a uma menor ingestão protéica por parte dos indivíduos do Fragmento em comparação ao Garrafão, ocasionando valores de normalidade de albumina inferiores. *Didelphis aurita* do Fragmento também apresentaram massa corporal inferior aos animais do Garrafão, indicando novamente que os animais da área fragmentada dispõem de menor oferta de recursos, ou que estes recursos são de qualidade inferior. Apesar disso, a população do Fragmento se reproduz normalmente.

*Didelphis aurita* possui hábitos alimentares onívoros, utilizando uma ampla gama de recursos dependendo da região e da disponibilidade (AGUIAR et al., 2004; CUNHA; VIEIRA, 2005; PAIVA et al., 1992b). Em áreas preservadas e fragmentadas, diversos autores demonstraram a importância da ingestão de artrópodes na dieta de *D. aurita*, especialmente aqueles presentes no folhíço (FREITAS et al., 1997; GENTILE et al., 2004; MACEDO; FERNANDEZ, 2005). É possível que na área correspondente ao Fragmento a variedade e/ou disponibilidade de artrópodes no folhíço seja menor do que no Garrafão, ocasionando uma menor ingestão proteica e levando às diferenças observadas.

As globulinas séricas correspondem à fração das proteínas totais sem a albumina, e são sintetizadas pelo fígado ou pelas células do sistema imune. Quando em contato com antígenos específicos, o sistema imunológico produz anticorpos, ou imunoglobulinas de diferentes classes. Estas proteínas podem ser separadas e identificadas por eletroforese no soro, mas nos exames clínico-laboratoriais de rotina as globulinas não são dosadas diretamente, porém calculadas a partir da subtração do valor da albumina das proteínas totais, segundo a fórmula: Globulina = PT - albumina (SANTOS, 1999).

Tabela 9 - Estatística descritiva dos valores de bioquímica sérica segundo a classe etária (jovens e adultos).

<b>Parâmetro</b>	<b>Classe etária (n° de animais)</b>	<b>Média (± desvio padrão)</b>	<b>Intervalo de confiança 95%</b>	<b>Erro padrão</b>
<b>Proteínas</b>	Jovens (10)	7,1 (1,22)	6,22-7,97	0,38
<b>Totais<sup>a</sup></b>	Adultos (59)	8,6 (1,63)	8,25-9,11	0,21
<b>Albumina<sup>a</sup></b>	Jovens (11)	2,21 (0,74)	1,72-2,71	0,22
	Adultos (61)	3,17 (0,58)	3,02-3,32	0,07
<b>Globulina<sup>a</sup></b>	Jovens (10)	4,84 (1,25)	3,94-5,73	0,39
	Adultos (59)	1,34 (6,40)	0,32-3,00	0,83
<b>Uréia<sup>b</sup></b>	Jovens (11)	77 (28,80)	57,65-96,34	8,68
	Adultos (60)	85,4 (18,15)	80,70- 90,09	2,34
<b>Creatinina<sup>b</sup></b>	Jovens (11)	0,37 (0,10)	0,30-0,44	0,03
	Adultos (62)	0,46 (0,13)	0,43-0,50	1,75
<b>ALT<sup>c</sup></b>	Jovens (10)	92,7 (56,66)	52,16-133,23	17,91
	Adultos (60)	83,73 (63,94)	67,21- 100,25	8,25
<b>AST<sup>c</sup></b>	Jovens (10)	285,1 (105,24)	209, 81- 360,38	33,28
	Adultos (58)	315,22 (134,77)	279,78-350,66	17,59
<b>FA<sup>c</sup></b>	Jovens (11)	636,54 (255,66)	464,79-808,30	77,08
	Adultos (59)	388,72 (381,97)	289,18-488,27	49,72
<b>GGT<sup>c</sup></b>	Jovens (10)	14,16 (6,15)	9,75-18,56	1,94
	Adultos (57)	20,48 (8,57)	18,20-22,75	1,13

Legenda: <sup>a</sup>g/dl; <sup>b</sup>mg/dl; <sup>c</sup>U/L. PT= proteínas totais; ALT= Alanina amino transferase; AST= Aspartato aminotransferase; GGT= Gama glutamil transferase; FA= Fosfatase alcalina.

Fonte: A autora, 2012.

A concentração de globulinas pode ser influenciada por uma série de fatores, como estado imunológico, doenças intercorrentes, e na espécie humana, pela raça. Indivíduos negros apresentam dosagens séricas de gamaglobulinas maiores do que brancos, sem interferência da alimentação ou doenças. Acredita-se que as dosagens elevadas de globulinas em negros sejam responsáveis por uma tendência de desenvolver hipertensão sanguínea (COMENS, 1957).

Em crianças, os níveis de globulinas são elevados ao nascer, diminuem até um mês de vida, chegando a um terço dos valores de recém-nascido e após dois meses de estabilidade, voltam a subir até alcançarem os valores de adulto. Isto indica que em recém-nascidos até os

três meses não ocorre produção de gamaglobulinas, sendo que os valores séricos refletem as globulinas transferidas pela mãe e pelo colostro (ORLANDINI; SASS-KORTSAK; EBBS, 1955).

No nosso estudo, encontramos variações de globulinas entre as áreas estudadas e entre as classes etárias, porém não entre os sexos. Animais do Fragmento apresentaram valores significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores de globulina do que os do Garrafão, e indivíduos jovens também apresentaram valores significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores de globulina do que adultos. Por serem resultado de um cálculo matemático envolvendo proteínas totais e albumina, as variações de globulina observadas são inversas às variações de albumina encontradas, especialmente em relação às classes etárias.

Apesar disso, podemos conjecturar que as diferenças observadas entre as áreas podem indicar que os animais do Fragmento apresentam maior produção de imunoglobulinas do que os do Garrafão, por viverem em um ambiente sujeito a um maior número de antígenos. Em ambientes rurais existe uma maior possibilidade de transmissão de diversas zoonoses da vida selvagem para os seres humanos (D'ANDREA et al., 2007).

De fato, a área do Fragmento é um mosaico de Mata Atlântica, plantações, fazendas de gado e outras criações domésticas, como aves e suínos, além de gatos, equinos e cães. Os cães, especialmente, circulam com frequência pelas áreas de mata podendo ter contato direto com a fauna silvestre, ocasionando condições para a propagação de doenças entre as espécies. Assim, é provável que *Didelphis aurita* do Fragmento tenham mais contato com diferentes antígenos do que os do Garrafão, ocasionando níveis séricos de globulinas mais elevados no Fragmento.

A uréia é um produto formado no ciclo da ornitina, que passa para o sangue e se distribui por todos os tecidos do organismo. Ela se eleva no sangue em função de doença pré-renal (como desidratação, doenças cardíacas ou choque), doença renal, doença pós-renal, dieta hiperproteica e doenças metabólicas como diabetes mellitus (SANTOS, 1999), sendo utilizada como um indicador de função renal, porém que pode sofrer influências da dieta e de outras condições clínicas, como a desidratação.

Nas nossas análises, não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dos valores de uréia entre as duas áreas de estudo, sexos e classes etárias. Santos (1999) relatou valores de uréia de 48,84 ( $\pm 12,78$ ) em *Caluromys lanatus*, bem abaixo dos valores por nós encontrados. Não encontramos na literatura valores para comparação com *Didelphis aurita*.

A creatinina é formada no fígado e excretada pelos rins. A constância da sua produção e excreção faz da creatinina um marcador muito útil da função renal, principalmente da filtração glomerular, pois seus valores não sofrem influência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico (SANTOS, 1999). Porém, podem ser influenciados pela idade, sexo e peso corporal (BJORNSSON, 1979). Os valores de creatinina são pouco variáveis na maioria das espécies, oscilando de 0,2 a 2,7 mg/dl. O aumento da creatinina no sangue reflete geralmente insuficiência renal ou doenças metabólicas como hipertireoidismo (SANTOS, 1999).

Bjornsson (1979) relatou que a taxa de produção de creatinina variava com o sexo, sendo menor nas fêmeas. Em seres humanos foi observado que homens apresentam valores séricos de creatinina 21% maiores do que mulheres (JAMES et al., 1988). No nosso estudo, não encontramos variação de creatinina em *Didelphis aurita* entre ossexos, nem entre as duas áreas de estudo. Os valores encontrados foram bastante constantes, o que fortalece sua importância como parâmetro de referência para a espécie. Além disso, indicam que a função renal dos indivíduos estudados está preservada.

Encontramos variação de creatinina entre as classes etárias estudadas. Indivíduos jovens de *Didelphis aurita* apresentaram valores de creatinina significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores ao dos adultos. A creatinina sérica é determinada pela sua taxa de produção e pela sua taxa de filtração glomerular, que sofrem influência da idade, sexo e peso corporal (BJORNSSON, 1979).

A taxa de produção de creatinina é proporcional a massa corporal, ou seja, menor nos jovens do que nos adultos. Quando as fêmeas são menores do que os machos, tende a ser menor nestas. A taxa de filtração glomerular, por outro lado, decai com a idade, sendo mais alta nos jovens, e costuma ser menor em fêmeas do que em machos (BJORNSSON, 1979). Assim, é esperado que indivíduos jovens tenham menor produção e maior rapidez de eliminação da creatinina do que adultos, gerando valores menores de creatinina em jovens. Em seres humanos, os valores médios de creatinina sérica se elevam com a idade (JONES et al., 1998). No nosso estudo, este comportamento foi observado para *Didelphis aurita*, com os jovens apresentando valores de creatinina sérica inferiores aos adultos.

Enzimas plasmáticas não funcionais são aquelas encontradas em concentrações plasmáticas muito inferiores às concentrações teciduais. Estas enzimas não possuem função no plasma, são características dos tecidos corporais, onde se encontra seu substrato de ação. Sua elevação no sangue sugere destruição tecidual de velocidade avançada, e a dosagem



destas enzimas pode fornecer evidências clínicas para o diagnóstico e prognóstico de doenças. Normalmente, os índices destas enzimas são baixos no sangue, refletindo a rotina normal de destruição das células. Com a morte celular acelerada, as concentrações destas enzimas também se elevam (RODWELL, 1994).

A alanina amino é uma enzima (ALT) encontrada no citoplasma dos hepatócitos. Seu aumento está relacionado com lesão hepática de natureza inflamatória, tóxica e degenerativa (SANTOS, 1999). Em ratos de laboratório, a ALT se eleva rapidamente após consumo de substâncias hepatotóxicas, e também em lesões biliares, não sendo específica para nenhuma destas regiões (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984). Os níveis de elevação em geral estão relacionados com o grau e duração da lesão, sendo maiores em casos agudos (SANTOS, 1999).

Neste trabalho, encontramos variação significativa ( $p < 0,05$ ) para ALT entre machos e fêmeas de *Didelphis aurita*, sendo os valores de machos superiores ao das fêmeas. Este quadro se repetiu em relação à aspartato amino transferase (AST). A aspartato amino transferase (AST) é uma enzima encontrada nas mitocôndrias dos hepatócitos, células renais, pancreáticas e musculares, inclusive no coração (SANTOS, 1999).

A AST se eleva no soro quando há acometimento hepático, inflamação de fibras musculares esqueléticas e lesão de células miocárdicas (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984). A AST é utilizada em conjunto com a Lactato desidrogenase e a Creatino-quinase para avaliar lesões musculares, entre elas as provocadas pelo exercício. O exercício pode liberar quantidades de enzimas suficientes para elevar as concentrações séricas das mesmas (BALARIN et al., 2005).

Valores de referência de AST para equinos puro sangue inglês foram determinados, sendo  $141,02 \pm 22,03$  UI/L para machos e  $140,40 \pm 36,07$  UI/L para fêmeas, ambos aumentando bastante após 12 meses de treinamento físico (BALARIN et al., 2005). Em cavalos da raça crioula, os valores variaram de 218 a 290 UI/L, também se elevando após exercício, principalmente 48 horas após. Por estar localizada no citoplasma e na mitocôndria, a elevação de AST induzida pelo exercício parece ser mais lenta do que a de outras enzimas (DA CÃS et al., 2000).

Em potros, ao nascimento a AST apresenta valores mais baixos do que os de adultos, e estes vão se elevando até os 102 dias de vida, quando então começam a baixar. Com 15 dias de vida, as concentrações séricas de AST são superiores às do adulto, e este aumento é atribuído ao aumento da atividade muscular dos potros neste período (DA CÃS et al., 2001).

Em frangos de corte foram obtidos valores de AST de  $209 \pm 17$  UI/L (BORSA et al., 2006). Em bovinos observou-se variação significativa da AST entre raças, sendo que animais da raça Jersey mostraram valores mais elevados ( $49,27 \pm 17,87$  U/l) do que os de raça holandesa ( $34,76 \pm 10,61$  U/l). No nosso trabalho não observamos variação significativa de AST entre as duas áreas estudadas e entre classes etárias. Em estudos futuros poderia ser coletado sangue de indivíduos recém-nascidos que ainda encontram-se no marsúpio.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima produzida por muitos tecidos corporais, principalmente pele, osso, fígado, intestinos e placenta (SANTOS, 1999). É encontrada no trato hepatobiliar dos animais e do homem, sendo excretada pela bile. As elevações séricas desta enzima são inespecíficas, ou seja, não se relacionam com nenhum local particular do trato hepatobiliar. A FA é, portanto, um marcador pouco específico de lesões hepáticas ou de ductos biliares, porém se eleva bastante nas lesões obstrutivas de ductos biliares (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984).

Os ossos em crescimento liberam FA na corrente sanguínea, portanto crianças possuem valores de FA mais elevados do que adultos, e durante a puberdade esses valores aumentam ainda mais (PENN; WORTHINGTON, 1983; KERR, 2003). Nos animais este processo ocorre de forma semelhante, e as concentrações mais elevadas de FA em animais jovens são atribuídas a uma maior atividade osteoblástica. Após o fechamento dos discos epifisários, essas concentrações diminuem.

Outra influência sobre a FA é exercida pelos hormônios masculinos, que podem induzir elevações nesta enzima, ocasionando diferenças entre machos e fêmeas (KERR, 2003). Em cutias (*Dasyprocta agouti*), por exemplo, machos apresentaram valores de fosfatase alcalina superiores ao das fêmeas, e jovens apresentaram valores superiores aos adultos (RIBEIRO et al., 2008). No nosso trabalho, também encontramos estas diferenças, sendo os valores de FA dos machos significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) do que o das fêmeas e os de jovens superiores aos de adultos.

A GGT é uma glicoproteína amplamente distribuída nos tecidos corporais (GRUNDY, 2007), sendo encontrada na membrana plasmática das células que possuem alta capacidade de secreção e absorção (NEMESÁNSZKI; LOTT, 1985), como as células dos rins e do fígado (GRUNDY, 2007). Além destas, é também encontrada em outros tecidos como pulmões, pâncreas e endotélio vascular, assim como no fluido extracelular e ligada a moléculas de albumina (MASON; STARKE; KIRK, 2010).

Esta glicoproteína de ação enzimática catalítica tem como principal função metabolizar a glutatona em ácido glutâmico e cisteinil-glicina, e transferir o grupamento gama-glutamil para aminoácidos receptores (NEMESÁNSZKI; LOTT, 1985). Assim, os aminoácidos precursores são assimilados e entram no conjunto de aminoácidos da célula para reutilização (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004; NEMESÁNSZKI; LOTT, 1985). A glutatona reduzida é novamente formada no ciclo gama-glutamil e serve como coenzima em diversas reações enzimáticas intracelulares (NEMESÁNSZKI; LOTT, 1985).

Esta ação ocorre continuamente, gerando um ciclo de glutatona através da membrana plasmática em diversos tipos celulares, provendo as células com a glutatona, que é o antioxidante não protéico mais importante. Além desta, outras funções importantes tem sido atribuídas à GGT, como a atividade de enzima transpeptidase, regulação da atividade dos osteoclastos e participação na biossíntese de leucotrienos (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004).

Lesões renais ocasionam aumento da concentração de GGT na urina, mas não alteram sua atividade no soro (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984). A maior parte da GGT sérica é proveniente do fígado, sendo transportada no plasma principalmente ligada à lipoproteínas e à albumina (GRUNDY, 2007).

A dosagem sérica de GGT se tornou um teste comercial a mais ou menos 30 anos, tendo sido usada inicialmente como um marcador sensível de inflamação hepática (MASON; STARKE; KIRK, 2010). Desde então a GGT tem sido amplamente utilizada como índice de disfunção hepática, marcador de consumo de álcool em seres humanos (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004; PERSSON; MAGNUSSONN, 1987; SILLANAUKEE, 1996), indicador de acúmulo intracelular de gordura nos hepatócitos, esteatose hepática, diabetes mellitus não insulino-dependente e resistência à insulina (MASON; STARKE; KIRK, 2010).

De fato, a GGT é uma ferramenta eficaz para diagnóstico de desordens hepáticas, especialmente obstruções biliares intra e extra-hepáticas. Em ratos de laboratório com lesão experimental, observou-se que a GGT e a fosfatase alcalina se elevaram rapidamente após obstrução dos ductos biliares, e a GGT continuou elevada mesmo após um tempo da lesão, o que a faz ser considerada uma enzima indicadora de lesão obstrutiva crônica (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984).

Nos ratos, a bilirrubina sérica se eleva nas desordens de ductos biliares, porém demora para ser detectada, não sendo um indicador sensível de lesão de ductos biliares, e sim de colestase. A GGT, por outro lado, tem o pico de elevação 24 horas após a lesão, sendo o

indicador mais sensível e específico de necrose de ductos biliares (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984).

A enzima pode ainda ser utilizada para diferenciar entre colestase e necrose hepática e de ductos biliares, pois nos casos de colestase isolada, a bilirrubina se eleva antes da GGT, e nos casos de necrose hepática, não há alteração da GGT. No cão a GGT se comporta da mesma forma, e em humanos, suspeita-se que ocorra o mesmo (LEONARD; NEPTUN; POPP, 1984). Na hepatite aguda, a dosagem de transaminases se mostra mais indicada, tanto para diagnóstico quanto para acompanhamento da evolução do quadro (PENN; WORTHINGTON, 1983).

Em seres humanos, a GGT se eleva em condições como doença hepática obstrutiva, uso de drogas indutoras de enzimas e abuso de álcool (WHITFIELD, 2001), sendo que 50 a 72% dos valores de GGT elevados se devem ao abuso de álcool (SILLANAUKKEE, 1996). Nestes casos, a elevação pode ser relacionada ao estresse oxidativo, e segue uma relação de dose-resposta, ou seja, quanto maior o consumo de álcool, maiores as taxas de GGT (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004).

Alguns estudos sugerem que a GGT sérica possa servir como indicador sensível e precoce de estresse oxidativo (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004), associado com regulação e degradação da glutatona, e possivelmente um marcador pró-aterogênico (MASON; STARKE; KIRK, 2010). Assim, elevações de GGT teriam uma forte associação com fatores de risco cardiovasculares.

Índices altos de GGT sérica em seres humanos são considerados fator de risco para doenças coronarianas e diabetes tipo 2, e estão relacionados com uma maior mortalidade (WHITFIELD, 2001). A GGT aumentada tem sido associada a risco elevado de doença cardiovascular aterosclerótica (GRUNDY, 2007) em homens e mulheres, tendo sido encontrada correlação positiva entre a elevação da enzima com a ocorrência de doença cardiovascular e com a morte por doença cardiovascular, sendo que quanto mais elevada a enzima, maior a probabilidade de óbito (RUTTMANN et al., 2005). Assim, a elevação da GGT é atualmente um marcador de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular (MASON; STARKE; KIRK, 2010).

Em níveis máximos, porém dentro dos limites de normalidade, a GGT pode ser um bioindicador de síndrome metabólica (síndrome de resistência à insulina) (MASON; STARKE; KIRK, 2010). Existem evidências de que o fígado seja o órgão alvo da síndrome metabólica, sendo também a principal fonte da GGT sérica, e a sua elevação parece ocorrer

devido a gordura hepática ectópica ou inflamação hepática secundária nesta síndrome (GRUNDY, 2007).

Neste caso, a elevação da enzima está fortemente associada à degeneração hepática pela gordura (esteatose), que por sua vez é fortemente associada com a síndrome metabólica. Na esteatose, porém, ocorrem outras alterações laboratoriais, como elevação de transaminases (GRUNDY, 2007).

A síndrome metabólica consiste principalmente de um grupo de fatores aterogênicos que se agrupam em um indivíduo, como elevação de lipoproteínas, da glicose, da pressão arterial, de citocinas inflamatórias circulantes e de fatores pró-trombóticos, e diminuição do colesterol HDL. Ainda não se sabe se a GGT tem efeito patogênico indutor da síndrome metabólica, ou se a síndrome provoca elevação da GGT (GRUNDY, 2007).

Foi observado também que a GGT tem correlação positiva com diversos fatores de risco para infarto do miocárdio, como idade, sexo masculino, índice de massa corporal, fumo, sedentarismo, pressão alta, frequência cardíaca, colesterol alto, triglicerídeos altos, colesterol LDL alto, colesterol HDL baixo, glicose elevada e entre as mulheres, uso de contraceptivos orais (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004).

A alimentação rica em frutas é negativamente correlacionada com a GGT, pela ingestão de compostos antioxidantes presentes nestes alimentos, porém a ingestão de antioxidantes isolados como suplementos vitamínicos não tem essa associação. O consumo de carne tende a elevar a GGT pela sua associação com o ferro presente no heme, que é um catalisador importante na geração do estresse oxidativo (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004).

Embora ainda não se saiba como a GGT sérica possa refletir o estresse sistêmico, a medição de GGT é uma ferramenta barata, fácil e confiável. Esta enzima é bastante estável no soro, mantendo atividade inalterada por mais de nove meses quando a amostra é congelada (LEE; BLOMHOFF; JACOBS JR, 2004).

Na maioria das doenças hepáticas, a GGT é um indicador sensível, porém inespecífico, de doença hepática primária, pois se eleva em quase todas as doenças hepáticas, não sendo específica para diagnóstico diferencial entre doença hepática e hepatobiliar. Porém, a magnitude da elevação de GGT é maior nas doenças obstrutivas de ductos biliares, carcinoma hepático metastático, cirrose e alcoolismo crônico (PENN; WORTHINGTON, 1983).

A atividade sérica da GGT é afetada por diversos fatores, e aumenta em diversas condições clínicas. Já foi comprovado que a atividade sérica da GGT é afetada pela idade,

sexo, e peso corporal. Em seres humanos, os valores de referência de homens são maiores do que de mulheres, e tendem a aumentar com a idade e ganho de peso. Isto dificulta a adoção de um intervalo de referência para toda uma população, e o ideal seria estabelecer intervalos de referência para cada um destes grupos (PENN; WORTHINGTON, 1983).

Recém-nascidos podem apresentar valores de GGT de cinco a oito vezes acima os valores de adulto, e caem rapidamente e chegam ao intervalo de normalidade dos adultos com sete a nove meses de idade. Grávidas não parecem ter alterações de GGT induzidas pela gestação, apresentando valores da enzima dentro da normalidade (PENN; WORTHINGTON, 1983). O padrão de atividade sérica de GGT em seres humanos é bem superior ao de equinos (FRANCISCATO et al., 2006).

Em equinos da raça puro sangue inglês, foram obtidos valores de referência de GGT de  $11,85 \pm 2,55$  UI/L para machos e  $11,78 \pm 2,32$  UI/L para fêmeas, ambos se elevando após 12 meses de treinamento físico (BALARIN et al., 2005). Em frangos de corte, foram obtidos valores de GGT de  $20 \pm 2$  UI/L (BORSA et al., 2006). Outra influência seria dos hormônios masculinos, podem induzir elevações na FA e GGT, ocasionando diferenças entre machos e fêmeas (KERR, 2003).

Neste trabalho, encontramos valores de GGT significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores nos animais do Fragmento em relação ao Garrafão. Considerando que os animais avaliados foram caracterizados como saudáveis, esta diferença pode indicar um maior grau de estresse oxidativo nos animais do Fragmento, ou seja, estes animais estariam produzindo maiores quantidades de radicais livres e peróxidos, que contribuem para danos nos tecidos biológicos.

Analisadas em conjunto, as variações de massa corporal, albumina e GGT entre o Fragmento e o Garrafão indicam que os animais do Fragmento vivem em um ambiente menos favorável do que o Garrafão, provavelmente com menor disponibilidade e qualidade de recursos, e passando por alterações metabólicas que propiciam o estresse oxidativo.

O estudo de ambientes rurais possui interesse especial para a saúde pública devido à possibilidade de transmissão de diversas zoonoses da vida selvagem para os seres humanos. Em ambientes fragmentados e áreas preservadas, *Didelphis aurita* costuma ser uma das espécies de pequenos mamíferos mais abundantes, sendo capaz de persistir em ambientes perturbados pela sua característica generalista e amplo nicho ecológico (D'ANDREA et al., 2007). Apesar disso, diferenças na massa corporal e em alguns parâmetros bioquímicos séricos foram identificadas em *D. aurita* de área fragmentada na Serra dos Órgãos.

## 5.4 Hemoparasitas

Na hematoscopia foram observados parasitas intraeritrocitários de tamanho pequeno, formato arredondado ou elíptico, fino citoplasma, núcleo pequeno e puntiforme (figura 33 e 34). Pela morfologia observada no esfregaço sanguíneo em comparação a descrições de Silva & Arantes (1916) e Deane & Deane (1961), julgamos tratar-se de *Babesia*.

A intensidade da parasitose foi variável, variando de uma a incontáveis hemácias parasitadas. O número de parasitas por hemácia variou de um a seis (figura 33 e 34). Além dos eritrócitos, nenhuma outra célula sanguínea foi encontrada parasitada e não foram observados parasitas livres na corrente sanguínea.

Figura 33 - *Babesia* spp. em eritrócito de *Didelphis aurita* (seta). Aumento 1000x. Coloração Panótico.



Foto: A autora, 2011.

Figura 34 - Diversos eritrócitos parasitados por *Babesia* spp. em *Didelphis aurita* (setas). Aumento 400x. Coloração Panótico.

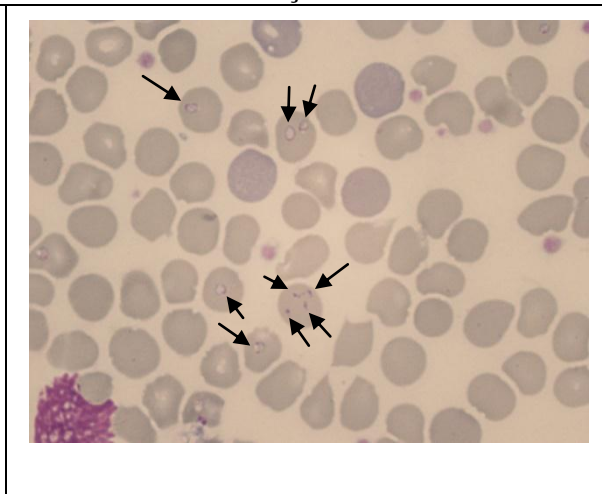


Foto: A autora, 2011.

De um total de 60 animais analisados nas duas áreas de estudo, 16 apresentaram *Babesi*sp. no esfregaço sanguíneo, correspondendo a uma prevalência de 26,6% na população. Na área 1 foram capturados 22 animais, dos quais três foram positivos (13,6%). Na área 2 foram capturados 38 animais dos quais 13 foram positivos (34,2%). Estatisticamente não houve diferença na prevalência da infecção entre as duas áreas ( $p < 0,05$ ).

Dezesseis animais foram recapturados em diferentes excursões, tendo sido acompanhados por até quatro exames ao longo do tempo. Destes, somente três apresentaram resultados diferentes entre as amostras analisadas, todos pertencentes à área 2 (Tabela 10).

Embora estas diferenças possam dever-se às limitações do meio de diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo, também podem demonstrar a evolução da infecção pela *Babesia* sp..

Assim, observamos animais inicialmente não parasitados tornando-se positivos após infecção aguda (animais 1278-1286 e 1282-1284), e animais infectados e positivos tornando-se negativos ao esfregaço após recuperação da infecção e redução da parasitemia (animais 1206-1212 e 1278-1286). Em relação ao animal 1278-1286, pudemos observar toda esta dinâmica.

Tabela 10 - Animais com resultados diferentes ao longo do tempo.

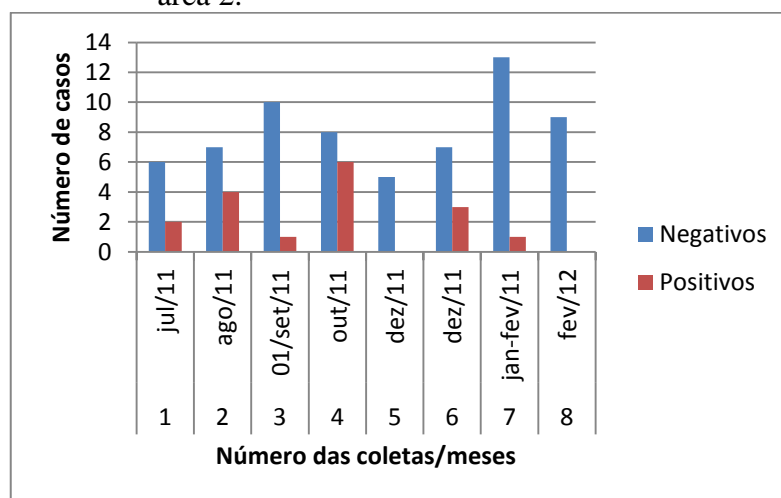
N. do animal	Coleta 2 (out/2011)	Coleta 3 (dez/ 2011)	Coleta 4 (jan/fev/2012)
1206-1212	Positivo	-	Negativo
1278-1286	Negativo	Positivo	Negativo
1282-1284	Negativo	Positivo	-

Nota: Animal 1206-1212 não foi capturado na coleta3 e animal 1282-1284 não foi capturado na coleta4 (representados por -).

Fonte: A autora, 2012.

O Gráfico 1 mostra o número de casos positivos e negativos ao longo dos meses de coleta. Observa-se o pico na detecção de positivos no mês de outubro. Nos meses de dezembro e fevereiro não foram detectados positivos na área 1.

Gráfico1 - Distribuição de resultados positivos e negativos de *Babesia* sp. ao longo dos meses. Números 1,3,5 e 8 correspondem a coletas na área1. Números 2,4,6 e 7 correspondem a coletas na área 2.



Fonte: A autora, 2012.



A massa corporal dos animais positivos variou amplamente de 520 a 2.520g. Nos indivíduos que foram acompanhados por mais de uma coleta, a massa corporal não sofreu alterações significantes.

Dentre 16 animais parasitêmicos 14 eram adultos (87,5%), um subadulto (6,2%) e somente um juvenil (6,2%). Seis albergavam carrapatos, correspondendo a uma prevalência de 37,5%, mais elevada do que a encontrada por Abel e colaboradores (2000) em Seropédica, RJ, de 16,07 %. Seis eram fêmeas (37,5%) e 10 machos (62,5%).

Todas as fêmeas estavam com filhotes na bolsa marsupial no momento da coleta, mostrando que a presença do parasita não afetou sua capacidade reprodutiva. Em duas fêmeas que foram capturadas mais de uma vez pudemos constatar que a presença do parasita não afetou a sobrevivência dos filhotes, que apresentaram evolução e crescimento normal. Uma delas (1279/1286) inclusive foi capturada por três vezes e teve duas ninhadas acompanhadas, mesmo positiva para *Babesia* sp..

Nos animais positivos os hematócritos variaram de 27 a 48%, sendo que somente três indivíduos (18,7%) apresentaram hematócrito abaixo de 35%. A análise de sinais de regeneração medular no esfregaço sanguíneo mostrou presença de diferentes graus de anisocitose em 94% da população e de policromasia em 81%. Todos os animais apresentaram metarrubríctos no esfregaço sanguíneo, com contagens variadas, de um a 306 células/100 leucócitos (tabela 11).

O primeiro relato de hemocitozoário em *Didelphis* no Brasil é de 1916, por Silva & Arantes. Estes autores estudaram o sangue de *D. aurita* provenientes de Meriti/RJ, onde encontraram corpúsculos hialinos, imóveis, esféricos ou ovóides, com núcleo arredondado na sua parte média e protoplasma de cor azul clara. Raramente foram observados parasitos livres no sangue, na maioria das vezes no interior do eritrócito. Este parasita tem descrição semelhante ao encontrado no nosso estudo.

Deane & Deane (1961) relataram em *D. marsupialis* do Pará um parasita de hemácias de descrição semelhante ao encontrado neste trabalho, e sugeriram que se tratasse de *Nuttalia brasiliensis*. Sampaio & Massard (2003) numa revisão de piroplasmas propuseram a sinonímia de *N. brasiliensis* com *Babesia brasiliensis*, hemoparasitas de marsupiais Didelphidae.

Tabela 11 - Resultados de massa corporal (MC), hematócrito, metarrubríctos, anisocitose e policromasia dos animais com resultado positivo para *Babesi* sp.

<b>Animal</b>	<b>MC (g)</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>Metarrubríctos</b>	<b>Anisocitose</b>	<b>Policromasia</b>
<b>1</b>	520	42	3	Discreta	Discreta
<b>2</b>	915	38	1	Discreta	Discreta
<b>3</b>	700	27	22	Moderada	Intensa
<b>4</b>	1.550	28	306	Intensa	Intensa
<b>5</b>	1.525	44	1	Ausente	Ausente
<b>6</b>	1.585	43	32	Intensa	Moderada
<b>7</b>	1.020	32	38	Intensa	Moderada
<b>8</b>	1.380	48	2	Discreta	Discreta
<b>9</b>	910	38	33	Moderada	Moderada
<b>10</b>	1.270	37	38	Intensa	Intensa
<b>11</b>	2.085	46	6	Discreta	Ausente
<b>12</b>	1.170	46	9	Moderada	Discreta
<b>13</b>	2.520	44	28	Intensa	Moderada
<b>14</b>	1.080	40	26	Intensa	Intensa
<b>15</b>	1.970	41	13	Moderada	Moderada
<b>16</b>	545	38	7	Discreta	Ausente

Legenda: Metarrubríctos expressos como nº de células/ 100 leucócitos. Fonte: A autora, 2011.

A multiplicação da *Babesia* nos eritrócitos é assíncrona e diversos estágios divisionais do parasita podem ser vistos na corrente sanguínea simultaneamente (Chauvin et al. 2009). Silva & Arantes (1916) encontraram somente um parasita por glóbulo. No nosso estudo encontramos hemácias com até seis parasitas.

Os parasitas encontrados em *D. aurita* no nosso estudo foram visualizados somente nos eritrócitos, não sendo detectadas outras células sanguíneas infectadas. A multiplicação estrita nos eritrócitos é uma característica de *Babesia*, que a diferencia do gênero próximo *Theileria*, que apresenta fase pré-eritrocítica de multiplicação nos linfócitos (Chauvin et al. 2009).

Num estudo com seis espécies de roedores silvestres e urbanos em Silva Jardim e Nova Iguaçu/ RJ, foi relatada prevalência geral de infecção por *Babesia* sp. de 27,3% (12 animais positivos em 44 analisados), bastante próxima a prevalência encontrada por nós em *D. aurita*, de 26,6%. O estudo foi realizado utilizando a microscopia óptica em esfregaço sanguíneo como meio diagnóstico (Gazeta et al. 2004). Em Nova Iorque foi relatada uma prevalência de 29 % de *B. microti* em *D. virginiana*, porém este marsupial foi considerado de

baixo poder de transmissão (Hersh et al. 2012). Não encontramos na literatura prevalência de infecção natural por *Babesia* sp. em outras espécies de *Didelphis*.

A observação microscópica de esfregaços sanguíneos é o método mais simples e acessível para o diagnóstico da babesiose durante a infecção aguda. Limitações deste método incluem a impossibilidade de diferenciar as espécies de *Babesia* pela morfologia, e a não detecção de células infectadas em casos de baixa parasitemia. Entretanto, a microscopia ainda é a opção mais viável para diagnóstico em muitas regiões afastadas e de poucos recursos, onde a babesiose é endêmica (Irwin 2009).

É bastante provável que num ambiente natural endêmico, todos os animais já tenham entrado em contato com a *Babesia*. Assim, os animais negativos encontrados neste estudo possivelmente já teriam passado pela fase aguda da infecção, encontrando-se no momento da coleta em baixa parasitemia. Esta observação mostra a importância de estudos horizontais de longa duração, que permitam acompanhar indivíduos ao longo do tempo.

Os pesos dos animais positivos variaram bastante, portanto acreditamos não haver influência da presença do parasita no ganho de peso dos indivíduos. Houve variação no número de casos positivos ao longo dos meses, o que pode estar relacionado com a sazonalidade do vetor.

Os carrapatos são os vetores de babesioses, e *Didelphis* é frequentemente parasitado por carrapatos ixodídeos de diversos gêneros, entre eles o *Amblyomma* (Muller et al. 2005, Nava et al. 2010). Acreditamos que as limitações da inspeção visual como método de avaliação da presença de carrapatos, bem como a possível intermitência do parasitismo podem ter contribuído para uma baixa prevalência de carrapatos na população estudada.

Fatores individuais como idade, estado reprodutivo, sexo, tempo de infecção e grau de coinfeção podem afetar a capacidade de transmissão de *Babesia* pelo hospedeiro (Hersh et al. 2012). Em trabalho com *Babesia microti* no rato de patas brancas (*Peromyscus leucopus*) nos EUA, animais adultos foram mais frequentemente parasitêmicos do que os juvenis (Homer et al. 2000). O mesmo comportamento foi observado em *D. aurita* neste estudo.

Em bovinos infectados com *B. bigemina*, *B. divergens* e *B. bovis* e em esquilo da Mongólia (*Merionessp.*) infectados com *B. divergens* foi descrito o fenômeno de resistência inversa à idade. Nestes casos, indivíduos juvenis mostram mais resistência do que os adultos à infecção por *Babesia* (Chauvin et al. 2009). Não sabemos se o mesmo fenômeno possa ocorrer em *D. aurita* na região estudada, entretanto em 14 jovens encontramos somente um positivo.

Assim como Silva & Arantes (1916) não encontramos alteração de coloração nos glóbulos vermelhos afetados. Entretanto, características indicativas de regeneração medular como anisocitose, policromasia e presença de metarrubríctos foram significativamente mais frequentes nos animais positivos.

A literatura mostra que em diferentes hospedeiros vertebrados a presença de *Babesia* não provoca doença aparente nem influi na capacidade de sobrevivência do animal (Homer et al. 2000). As manifestações clínicas da babesiose são causadas pelos estágios reprodutivos assexuados do organismo nos eritrócitos do hospedeiro, e conseqüente destruição celular. As hemácias parasitadas deixam de exercer a função de transporte de gases e acabam sendo capturadas pelo baço. A variação de sinais clínicos é ampla, provavelmente refletindo o nível de parasitemia. Pode ocorrer anemia hemolítica, febre, calafrios, fadiga, mal estar e vômitos (Chauvin et al. 2009)

Paiva et al. em diferentes trabalhos (1991 e 1992a) com infecção experimental de *D. marsupialis* por *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, relataram nos animais infectados anorexia e redução no tamanho das hemácias, sem letalidade. Embora não tenha sido realizado um acompanhamento clínico posterior, os animais do nosso estudo apresentavam-se com peso adequado para a faixa etária, condição corporal satisfatória e reproduzindo-se, o que indica que a presença de *Babesia* no sangue não caracterizou uma condição de doença clínica.

*Babesi*asp. são hemoparasitas cosmopolitas bem adaptados aos seus hospedeiros vertebrados, causando pouca ou nenhuma sintomatologia clínica, fazendo com que os hospedeiros se tornem fontes de infecção como portadores assintomáticos. Nas condições de campo onde se realizou este estudo, a análise do esfregaço sanguíneo foi a técnica de diagnóstico mais viável, encontrando prevalência de *Babesi*asp. de 26,6% na população. Pelas limitações do método de diagnóstico utilizado, é possível que a prevalência deste parasita em *D. aurita* na Serra dos Órgãos seja ainda maior do que a encontrada.

Existem na literatura diversos exemplos de manifestações de doença diferentes e eventualmente mais severas resultantes da transmissão de uma espécie de *Babesia* comum em uma espécie de vertebrado selvagem para um hospedeiro vertebrado não adaptado (Homer et al. 2000). Assim, ressaltamos a importância deste estudo em *D. aurita*, pelo seu hábito de vida sinantrópico, podendo tornar-se fonte de infecção para animais domésticos e até mesmo para o homem.

## CONCLUSÃO

Foram estabelecidos os primeiros parâmetros hematológicos e bioquímicos de referência para *Didelphis aurita* de vida livre da Serra dos Órgãos do Rio de Janeiro.

Foi demonstrado que machos de *Didelphis aurita* apresentaram valores maiores de hematócrito, hemoglobina, hematimetria, ALT, AST e FA do que fêmeas. Foram demonstradas as seguintes diferenças entre as classes etárias de *Didelphis aurita*: Jovens apresentaram valores maiores de plaquetas, globulina e FA do que adultos. Adultos apresentaram valores de proteína plasmática total, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, hematimetria, albumina, proteínas totais, creatinina e GGT maiores do que jovens. Estas variações estão de acordo com o encontrado na literatura.

As plaquetas foram um parâmetro bastante variável. A veia lateral caudal mostrou-se uma via adequada para obtenção de até cinco ml de sangue em *Didelphis aurita* sem necessitar de contenção química e sem causar prejuízos ao animal.

Foram observadas diferenças entre as duas áreas estudadas para massa corporal, GGT, albumina e globulina. Os animais do Garrafão apresentaram valores de albumina e massa corporal maiores do que os do Fragmento. Estes por sua vez apresentaram maiores valores de GGT e globulinas do que os do Garrafão. Acreditamos que estas diferenças estejam relacionadas a condições ecológicas das duas áreas, sendo que o Garrafão seria um local com maior oferta de recursos para *Didelphis aurita* do que o Fragmento.

*Babesia* sp. é um hemoparasita difundido entre *Didelphis aurita* da Serra dos Órgãos, causando parasitose de intensidade variável com prevalência de 26,6% na população. Animais acompanhados ao longo do tempo mostram oscilação na positividade pela avaliação do esfregaço sanguíneo. O pico de casos correspondeu ao mês de outubro. Adultos apresentaram o hemoparasita mais frequentemente do que jovens.

A presença de *Babesia* sp. não interferiu na capacidade reprodutiva de *Didelphis aurita*, e somente três animais apresentaram anemia. *Babesia* sp. mostrou correlação positiva com anisocitose, policromasia e presença de metarrubricitos, indicando que a presença do parasita estimulou os processos de regeneração da medula óssea dos indivíduos afetados.

*Didelphis aurita* podem ser considerados hospedeiros de *Babesia* sp. na Serra dos Órgãos. Ambientes naturais preservados e fragmentados apresentam diferenças que influenciam parâmetros bioquímicos como albumina, globulina e GGT em *Didelphis aurita*, além da massa corporal.

## REFERÊNCIAS

- Abel IS, Almeida Jr DE, Fonseca AH, Soares CO, Ishikawa MM. *Borrelia* sp. in naturally infected *Didelphis aurita* (Wied, 1826) (Marsupialia: Didelphidae). Braz Arch Biol Technol [periódico na internet]. 2000 [acesso em 2012 Nov 26]; 43 (3): [aproximadamente 6 p.]. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151689132000000300010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151689132000000300010&lng=en&nrm=iso)
- Adnet FAO, Anjos DHS, Menezes-Oliveira A, Lanfredi RM. Further description of *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917 (Nematoda: Cruzidae) by light and scanning electron microscopy. Parasitol Res. 2009; 104: 1207–11.
- Aguiar MS, Ferigolo J, Gioso MA, Rossi Jr JL. Atrição dental em *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (Marsupialia, Didelphimorphia, Didelphidae) do Sul do Brasil. CiRural. 2004; 34 (4).
- Allen JA. A preliminary study of the south american opossums of the genus *Didelphis*. Bull Am Mus Nat Hist. 1902; 16: 249-79.
- Alexander KA, Appel MJG. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. J Wildl Dis. 1994; 30: 481-5.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis. 2008; 8: 191–9 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009; 136 (14): 1915-34.
- Arias JR, Naif RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981; 76 (3): 279-86.
- Balarin MRS, Lopes RS, Kohayagawa A, Laposy CB, Fonteque JH. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamyltransferase e lactato desidrogenase em equinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. Semina: Ciências Agrárias. 2005; 26 (2): 211-8.
- Barbosa WGA. Detecção de *Borrelia* sp. em gambás (*Didelphis aurita*) imunossuprimidos com ciclofosfamida. [dissertação]. Rio de Janeiro: Editora da UFRRJ: 1997.
- Barretto MP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p. 89-151 *apud* Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2004; 46 (6): 323-30.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Linardi PM, Botelho JR, Sbalqueiro IJ. Interrelationship between ectoparasites and wild rodents from Tijucas do Sul, State of Paraná, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 719-25.
- Bergallo HG, Uzêda MC, Fidalgo ECC, Alves MAS, Rocha CFD, Van Sluys M, Costa TCC, Costa MB, Santos MA, Cozzolino ACR, Alencar RS. Conservação da biodiversidade da Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro: uma nova abordagem. In: Bergallo HG et al., organizadores. Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; Instituto Biomas: 2009a. 344 p.

- Bergallo HG, Esbérard CEL, Geise L, Grelle CEV, Vieira MV, Gonçalves PR, Paglia A, Attias N. Mamíferos endêmicos e ameaçados do Estado do Rio de Janeiro: diagnóstico e estratégias para a conservação. In: Bergallo HG et al., organizadores. Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; Instituto Biomas: 2009b. 344 p.
- Bertozzo D, Freitas RE, Reis F, Reis R, Santos DS, Souza WA. Contenção química em animais silvestres: Revisão de literatura. Rev Cient Eletr Med Vet. [periódico na internet] 2008 [acesso em 2010 Ago 20] 11: [aproximadamente 6 p.] Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/artigos/edic-vi-n11-Art01.pdf>.
- Bjornsson TD. Use of Serum Creatinine Concentrations to Determine Renal Function 1. Clinical Pharmacokinetics. 1979; 4(3): 200-22.
- Blitvich BJ, Juarez LI, Tucker BJ, Rowley WA, Platt KB. Antibodies to west nile virus in raccoons and other peridomestic mammals in Iowa. J Wildl Dis. 2009; 45 (4): 1163-8.
- Borsa A, Kohayagawa A, Boretti LP, Saito ME, Kuibida K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006; 58 (4): 675-7.
- Boyce W, Kjemtrup A. Wildlife health and the urban-wildlife interface. JAVMA. 1993; 202 (7): 1082-4.
- Brown CC. Endogenous lipid pneumonia in opossums from Louisiana. J Wildl Dis. 1988; 24 (2): 214-9.
- Cáceres NC. Use of the space by the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brazil. Rev Brasil Zool. 2003; 20(2): 315-22.
- Cáceres NC. Comparative lengths of digestive tracts of seven didelphids marsupials (Mammalia) in relation to diet. Rev Brasil Zool. 2005; 22 (1): 181-5.
- Capobianco JPR. Introdução In: Capobianco JPR et al., organizadores. Biodiversidade na Amazônia Brasileira. São Paulo; Instituto Socioambiental: 2001.
- Carneiro AS, Teixeira MN, Rêgo EW, Oliveira JB. Parâmetros hematológicos de *Didelphis albiventris* (Linnaeus, 1847) de vida livre provenientes do município de Igarassú- Pernambuco- Brasil. Medicina Veterinária. 2010; 4(2): 9-15.
- Casagrande RA, Cesar MO, Horta MC, Rossi S, Teixeira RH, Matushima ER. Perfil hematológico de gambás *Didelphis aurita* e *D. albiventris* do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2009; 31 (2): 185-9.
- Cerqueira R, Lemos B. Morphometric differentiation between neotropical Black-eared opossums *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). Mammalia. 2000; 64 (3): 319-27.
- Cerqueira R, Tribe CJ. Genus *Didelphis*, Linnaeus 1758. In: Gardner AL, editor. Mammals of South America, v. 1. Chicago: The University of Chicago Press; 2007. p. 17-25.
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais. Manual de utilização de animais/Fiocruz. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008.

Chagas-Moutinho VA, Oliveira-Menezes A, Cárdenas MQ, Lanfredi RM. Further description of *Aspidodera raillieti* (Nematoda: Aspidoderidae) from *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphidae) by light and scanning electron microscopy. *Parasitol Res.* 2007; 101: 1331–6.

Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Alandrin LM. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* [disponível na internet] 2009 Mar/Abr [acesso em 2012Nov 26]; 40 (37); [aproximadamente 18 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695028/>.

Comens P. Racial variation in serum globulins. *Am J Med Scienc.* 1957; 233 (3): 275-9.

Corrêa SHR, Passos EC. Wild animals and public health. In: Fowler ME, Cubas ZS, editores. *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Ames: Iowa University Press; 2001. p. 493-9.

Croft DB. Behaviour of carnivorous marsupials. In: Jones M, Dickman C, Archer M., editores. *Predators with pouches: The biology of carnivorous marsupials*. Collingwood (Australia): CSIRO Publishing; 2003. p 332-46.

Cuba CA, Pacheco RS, Cupolillo E, Tavares CC, Machado GMC, Momen H, Grimaldi Jr G. Description of *Leishmania (Leishmania) forattini* sp. N., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88 (3): 397-406.

Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Doenças Comuns a vários Taxa: Leptospirose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Editora Roca; 2007. p.736-41.

Cunha AA, Vieira MV. Support diameter, incline, and vertical movements of four didelphid marsupials in the Atlantic forest of Brazil. *J Zool.* 2002; 258: 419-26.

Cunha AA, Vieira MV. Age, season and arboreal movements of the opossum *Didelphis aurita* in an Atlantic rain forest of Brazil. *Acta Theriologica.* 2005; 50: 551-60.

Da Cãs EL, Rosauo AC, Brass KE, Silva CAM. Concentração sérica das enzimas creatinoquinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em equinos da raça crioula. *Ciência rural.* 2000; 30 (1): 625-9.

Da Cãs EL, Brass KE, Greig CR, Deprá NM, Silva CAM. Concentrações de creatinoquinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em potros do nascimento até os seis meses de idade. *Ciência rural.* 2001; 31 (6): 1003-6.

Daloz MF. Estrutura populacional de um pequeno mamífero em uma área de mata contínua e em três fragmentos de Mata Atlântica: um teste do modelo fonte-sumidouro [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2013.

D'Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R, Cerqueira R. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Braz J Biol.* 2007; 67 (1): 179-86.

Daszak P, Cunningham AA. Emerging infectious diseases: a key role for Conservation Medicine. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. *Conservation Medicine: Ecological health in practice*. Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 40-61.



- Dawson TJ, Denny MJS. Influence of the spleen on blood volume and haematocrit in the brush-tailed possum (*Trichosurus vulpecula*). *Austral J Zool.* 1968; 16 (4): 603-8.
- Deane LM, Deane MP. Sobre dois hemocitozoários encontrados em mamíferos silvestres da região amazônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1961; 3 (8): 107-10.
- Delciellos AC, Loretto D, Antunes VZ. Marsupiais na Mata Atlântica. *Ciência Hoje.* 2006; 38 (223): 66-9.
- Diaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F, Willms K, Cruz-Otero MC, Rendon-Maldonado JG, Robert L, Antuna S, Nawa Y. Intrahepatic growth and maturation of *Gnathostoma turgidum* in the natural definitive opossum host, *Didelphis virginiana*. *ParasitInternat.* 2010; 59: 338-43.
- Diegel KL, Fitzgerald SD, Berry DE, Church SV, Reed WM, Sikarskie JG, Kaneene JB. Experimental inoculation of north American opossums (*Didelphis virginiana*) with *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis.* 2002; 38 (2): 275-81.
- Dietch SL, McCulloch WF, Braun JL, Davis Jr. Detection and ecology of leptospirosis in Iowa wildlife. *J Wildl Dis.* 1970; 6: 275-88.
- Dinucci KL, Silva HS, Geise L. Preferência de microhabitat de quatro espécies de marsupiais (Mammalia, Didelphimorphia) da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro e considerações sobre a metodologia. In: Reis NR, Peracchi AL, Santos GASD. *Ecologia de mamíferos.* São Paulo: Technical Books; 2008.p.19-32.
- Dobson AP, May RM. Disease and conservation. In: Soulé ME, editor. *Conservation biology: The science of scarcity and diversity.* Massachusetts; Sinauer Associates Publishers: 1986. 198 p.
- Dubey JP, Lindsay DS, Rezende PCB, Costa AJ. Characterization of an unidentified *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the south american opossum *Didelphis albiventris* from Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47 (6): 538-44.(A)
- Dubey JP, Kerber CE, Lindsay DS, Kasai N, Pena HFJ. The south american opossum, *Didelphis marsupialis*, from Brazil as another definitive host for *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999. *Parasitology.* 2000; 121: 589-94. (B)
- Dubey JP, Rosenthal BM, Speer CA. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the south american opossum, *D. albiventris* from Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; 48 (5): 595-603.
- Epstein PR. Biodiversity, Climate Change, and Emerging Infectious Diseases. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. *Conservation Medicine: Ecological health in practice.* Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 27-39.
- Farias NA. Tristeza parasitária bovina In: Correa FR, Schild AL, Mendez MC, Lemos RAA, editores. *Doenças de ruminantes e eqüinos.* 2ªed., v. 2. São Paulo: Livraria Varela; 2001.
- Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology.* 5ªed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 787p.
- Ferraroni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1980; 75 (1-2): 99-109.

- Ferreira MS, Kajin M, Vieira MV, Cerqueira R, D'Andrea PS, Gentile R. Análises de sensibilidade e elasticidade do marsupial *Didelphis aurita* (Didelphimorphia; Didelphidae) em Mata Atlântica: comparação entre área florestada e rural; Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil; 2007 Set 23-28; Caxambu (MG): 2007.
- Fitzgerald SD, Zwick LS, Diegel KL, Berry DE, Church SV, Sikarskie JG, Kaneene B, Reed WM. Experimental aerosol inoculation of *Mycobacterium bovis* in North American Opossums (*Didelphis virginiana*). J Wildl Dis. 2003; 39 (2): 418-23.
- Fonseca GAB *et al.* Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occasional Paper n° 4. Washington; Conservation International: 1996. 38 p.
- Fonseca CC, Nogueira JC, Barbosa AJA. Histometria do pâncreas do gambá sul-americano. Revista Ceres. 2004; 51 (297): 565-74.
- Forattini OP, Silva EOR, Rabello EX, Andrade JCR, Rodrigues VLCC. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XIII – Potencial enzoótico doméstico em área de ocorrência de *Panstrongylus megistus*, sob vigilância epidemiológica. Revista de Saúde Pública. 1978; 12: 417-24.
- Forero-Medina G, Vieira MV. Perception of a fragmented landscape by neotropical marsupials: effects of body mass and environmental variables. J Trop Ecol. 2009; 25: 53–62.
- Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of *Toxoplasma gondii* among Brazilian white eared opossums (*Didelphis albiventris*). Vet Parasitol. 2011; 179 (1-3): 238-41.
- Fowler ME. Order Marsupialia (Opossums) In: Fowler ME, Cubas ZS., editores. Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals. Iowa: Iowa State University Press: 2001. 536 p.
- Franciscato C, Lopes STA, Veiga APM, Martins DB, Emanuelli MP, Oliveira LSS. Atividade sérica das enzimas AST, CK e GGT em cavalos Crioulos. Pesq Agropec Bras. 2006; 41 (10): 1561-5.
- Finnie EP. Monotremes and marsupials (anatomy). In: Fowler ME., editor. Zoo and wild animal medicine. 2ª ed. Philadelphia: Saunders Company; 1986. p. 558-60.
- Freitas, SR, Moraes DA, Santori Rt, Cerqueira R. Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a resting forest at Rio de Janeiro. Rev Brasil Biol. 1997; 57 (1): 93-8.
- Freitas SR, Mello MCS, Cruz CBM. Relationships between forest structure and vegetation indices in Atlantic Rainforest. Forest Ecology and Management. 2005; 218: 353–62.
- Gardner AL. Class Mammalia Linnaeus 1758. In: Gardner AL, editor. Mammals of South America, v. 1. Chicago: The University of Chicago Press; 2007. p 1-3.
- Gardner AL. Order Didelphimorphia. In: Wilson DE, Reeder DM., editores. Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3ª ed. Baltimore; The John Hopkins University Press: 2005. 743 p.
- Gazeta GS, Carvalho RW, Avelar RF, Amorim M, Aboud-Dutra AE. Ocorrência de *Babesia* sp. em pequenos roedores no Brasil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56 (6): 741-4.
- Gentile R, Fernandez FAS. A field comparison of two capture-mark-recapture estimators of small mammal populations. Rev Brasil Zool. 1999; 16 (4): 1109-14.

- Gentile R, Finotti R, Rademaker V, Cerqueira R. Population dynamics of four marsupials and its relation to resource production in the Atlantic forest in southeastern Brazil. *Mammalia*. 2004; 68 (2-3): 109-19.
- Giacometti L, Berntzen AK, Bliss ML. Hematologic parameters of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Comp Biochem Physiol. A Comp Physiol*. 1972; 43 (2): 287-92. Resumo.
- Gomes DC, Cruz RP, Vicente JJ, Pinto RM. Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Brasil Zoologia*. 2003; 20 (4): 699-707.
- Gonçalves NN, Maçaneres CAF, Miglino MA, Samoto VY, Martins DS, Ambrosio CE, Ferraz RHS, Carvalho AF. Aspectos morfológicos dos órgãos genitais femininos do gambá (*Didelphis* sp.). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2009; 46 (4): 332-8.
- Gordus AG, Theis JH. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of a bush-tailed wood rat in California. *J Wildl Dis*. 1993; 29 (3): 478-80.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 41: 687-725 *apud* Yoshida ELA, Cuba
- Gross T, Johnston S, Barber CV. A convenção sobre diversidade biológica: entendendo e influenciando o processo. Novembro de 2005.
- Grundy SM. Gamma-glutamyl transferase another biomarker for metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 2007; 27: 4-7.
- Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MG, Paes GP. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2006; 22 (11): 2319-27 *apud* Guerra JAO, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa MG, Guerra MVF. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta amazônica*. 2007; 37 (1): 133-8.
- Guerra JAO, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa MG, Guerra MVF. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta amazônica*. 2007; 37(1): 133-8.
- Guimarães FN, Jansen G. Novo transmissor silvestre do “*Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*”. (Chagas 1909). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1943; 38(3): 437-43.
- Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004; 46(6):323-30.
- Hayes TG. Studies of a primitive mammalian spleen, the opossum (*Didelphis virginiana*). *J Morphol*. 1968; 124: 445-50.
- Hersh MH, Tibbetts M, Strauss M, Ostfeld RS, Keesing F. Reservoir competence of wildlife species for *Babesia microti*. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 1951-7.

Hidalgo JL, Sulzer KR. Six new leptospiral serovars isolated from wild animals in Peru. J Clin Microbiol. 1984; 19 (6): 944-5 *apud* Jorge S, Stark CB, Recuero ALC, Hentges A, Minello LF, Seixas FK, Dellagostin AO, Fernandes CPH, Brod CS. Sorologia e caracterização molecular de *Leptospira* spp. isolada de gambás de orelha branca (*Didelphis albiventris*). XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós Graduação da Universidade federal de Pelotas; 2008 Nov 11-14; Pelotas. Pelotas: 2008.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. Clinical Microbiol Rev. 2000; 13 (3): 451-69.

Honma A, Oku S, Nishida T. Adaptive significance of death feigning posture as a specialized inducible defence against gape-limited predators. Proc R Soc B. 2006; 273: 1631-6.

Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Shumaker TTS. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (7): 793-801.

Houk AE, Goodwin DG, Zajac AM, Barr SC, Dubey JP, Lindsay DS. Prevalence of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, *Besnoitia darlingi*, and *Neospora caninum* in North American Opossums, *Didelphis virginiana*, from Southern Louisiana. J Parasitol. 2010; 96 (6): 1119-22.

Howell JM, Dalsey WC. Aerobic bacteria cultured from the mouth of the american opossum (*Didelphis virginiana*) with reference to bacteria associated with bite infections. J Clin Microbiol. 1990; 28 (10): 2360-61.

Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasites & Vectors [periódico na internet] 2009 [acesso em 2012 Nov 26]; 2(1): [aproximadamente 9 p]. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S4>.

James GD, Sealey JE, Alderman M, Ljungman S, Mueller FB, Pecker MS, Laragh JH. A longitudinal study of urinary creatinine and creatinine clearance in normal subjects. Race, sex, and age differences. Am J Hypertens. 1988; 1(2): 124-31.

Jones CA, McQuillan GM, Kusek JW, Eberhardt MS, Herman WH, Coresh J, Salive M, Jones CP, Agodoa LY. Serum creatinine levels in the US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Kidney Dis. 1998; 32 (6): 992-9.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 2008; 451(21): 990-4.

Jorge S, Stark CB, Recuero ALC, Hentges A, Minello LF, Seixas FK, Dellagostin AO, Fernandes CPH, Brod CS. Sorologia e caracterização molecular de *Leptospira* spp. isolada de gambás de orelha branca (*Didelphis albiventris*). XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós Graduação da Universidade federal de Pelotas; 2008 Nov 11-14; Pelotas. Pelotas: 2008.

Jurd RD. "Not proper mammals": Immunity in monotremes and marsupials. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1994; 17: 41-52.

Kajin M, Cerqueira R, Vieira MV, Gentile R. Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. Rev Brasil Zool. 2008; 25 (2): 206-13.

Kerr MG, editor. Exames laboratoriais em medicina veterinária. Bioquímica clínica e hematologia. São Paulo: Roca; 2003. 436 p.

Krupp MA, Schroeder AS, Tierney Jr. LM. Apêndice. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, organizadores. Harper: Bioquímica, 7ª ed. São Paulo; Atheneu editora: 1994. p. 722-37.

Lainson R. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77: 169-96 *apud* Guerra JAO, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa MG, Guerra MVF. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. Acta amazônica. 2007; 37 (1): 133-8.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAI. The dermal Leishmaniasis of Brazil with special reference to the eco-epidemiology of the disease in the Amazonian. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 89 (3): 435-43.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniasis in biology and medicine. Londres; Academic Press; 1987. p. 1-120 *apud* Yoshida ELA, Cuba Cuba CA, Pacheco RS, Cupolillo E, Tavares CC, Machado GMC, Momen H, Grimaldi Jr G. Description of *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp. N., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88 (3): 397-406.

Lainson R, Shaw JJ, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89 (3): 435-43.

Lallo MA, Pereira A, Araújo R, Favorito SE, Bertolla P, Bondan EF. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. Ciência Rural. 2009; 39 (5).

Lee DH, Blomhoff L, Jacobs Jr. DR. Is serum gamma-glutamyl transferase a marker of oxidative stress? Free Radical Research. 2004; 38 (6): 535-9.

Leonard TB, Neptun DA, Popp JA. Serum gamma glutamyl transferase as a specific indicator of bile duct lesions in the rat liver. Am J Pathol. 1984; 116 (2): 262-9.

Lessa L, Geise L. Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros: análise do estado de conhecimento atual. Oecologia Australis. 2010; 14 (4): 918-27.

Levin J. The evolution of mammalian platelets. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2ª ed. San Diego (CA): Academic Press; 2007. p 3-22.

Lewis JH. Comparative hematology: studies on opossum *Didelphis marsupialis (virginianus)*. Comp Biochem Physiol. 1975; 51 A: 275-80. (Resumo)

Lindsay DS, Hendrix CM, Blagburn BL. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in opossums (*Didelphis virginiana*). J Wildl Dis. 1988; 24 (1): 157-9.

Linhares H. Possibilidades de transmissão e vias de inoculação da lepra murina em ratos e outros animais. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1943; 38 (1): 321-51.

Lins LA, Feijo LS, Frey Jr. F, Zambrano CG, Berne MEA, Nogueira CEW. Presença de *Sarcocystis* spp. em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. R Bras Ci Vet. 2011; 18 (2/3): 126-8.

- Lipps BV. Anti-lethal factor from opossum serum is a potent antidote for animal, plant and bacterial toxins. *J Venemous Animals and Toxins*. 1999; 5 (1): 56-66.
- Long GG, Stookey JL, Terrel TG, Whitney GD. Fibrous osteodystrophy in an opossum. *J Wildl Dis*. 1975; 11: 221-3.
- Loretto D, Vieira MV. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* wied-neuwied, 1826). 2005; 86 (2): 287-93.
- Loretto D. Ecologia de pequenos mamíferos arborícolas: estado do conhecimento, métodos de amostragem e estudo populacional, com ênfase no bioma da Mata Atlântica [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
- Lucheis SB, Hernandez GS, Lenharo DK, Santiago MEB, Baldini-Peruca LC. Are opossums capable of transmitting leptospirosis in urban áreas? *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2009; 15 (3): 370-3.
- Macedo L, Fernandez F. Ecologia alimentar de *Philander frenata* e *Didelphis aurita* em uma paisagem fragmentada no sudeste do Brasil. [CD-room]. São Paulo: Sociedade de Ecologia do Brasil; 2005.
- Macedo J, Loretto D, Vieira MV, Cerqueira R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: Um método para animais vivos. *Mastozoología Neotropical*. 2006; 13: 133-6.
- Macedo J, Loretto D, Mello MCS, Freitas SR, Vieira MV, Cerqueira R. História natural dos mamíferos de uma área perturbada do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Ciência e conservação na Serra dos Órgãos. In: Cronemberger C, Viveiros de Castro EB, organizadores. *Ciência e Conservação na Serra dos Órgãos*. Brasília; IBAMA: 2007. p. 166-81.
- Magalhaes AFA. Estudo comparado do sistema imunológico em marsupiais e primatas: aspectos funcionais e metabólicos. 2001. 112f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)--Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- Marquez LJG, Mayagoitia AL, Crespo RAL, Rebolledo OFP. Neumonía lipídica endógena en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) capturados en El estado de Colima, México. *Vet Mex*. 2012; 43 (2): 241-6.
- Martan J, Allen JM. The cytological and chemical organization of the prostatic epithelium of *Didelphis virginiana* Kerr. *J Exp Zool*. 1965; 159 (2): 209-30.
- Mason JE, Starke RD, Kirk JEV. Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. *Prev Cardiol*. 2010; 13 (1): 36-41.
- McClellan RG, Francy DB, Campos EG. Experimental studies of St. Louis encephalitis virus in vertebrates. *J Wildl Dis*. 1985; 21 (2): 85-93.
- MacNider WD. Occurrence of Atypical Glomeruli in the Kidney of Opossum (*Didelphis Virginiana*). *Exp Biol Med*. 1927; 25: 2130-2.
- Mead AJ, Patterson DB. Skeleton lesions in a population of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*) from Baldwin County, Georgia. *J Wildl Dis*. 2009; 45 (2): 325-32.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (kala azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*. 1999; 104: 65 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009; 136 (14): 1915-34.

- Mendel SM, Vieira MV, Cerqueira R. Precipitation, litterfall, and the dynamics of density and biomass in the black-eared opossum, *Didelphis aurita*. *Journal of Mammalogy*. 2008; 89 (1):159–67.
- Mendes JF, Albano APN, Santin R, Meireles MCA, Coimbra MAA, Leite ATM, Minello LF, Nascente PS. Ocorrência de *Malassezia paquydermatis* em gambás de orelha branca (*Didelphis albiventris*). [CD-room]. Pelotas: Editora Universitária; 2009.
- Messick JB, Berent LM, Ehrhart EJ, Wasmer CC. Light and electron microscopic features of an eperythrozoon-like parasites identified in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). *J Zoo Wildl Med*. 2000; 31: 240-3.
- Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas A. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Brit Med J*. 2003; 326: 1444-8 *apud* Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004; 46 (6): 323-30.
- Ministério da Saúde. Guia de vigilância Epidemiológica. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
- Miyatake T, Katayama K, Takeda Y, Nakashima A, Sugita A, Mizumoto M. Is death-feigning adaptative? Heritable variation in fitness difference of death- feigning behavior. *Proc R Soc Lond B*. 2004; 271: 2293-6.
- Moreira CA. Notas sobre a evolução do vírus vacínico em animais silvestres da fauna brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1955; 54 (1): 93-4.
- Muller G, Brum JGW, Langone PK, Michels GH, Sinkoc AL, Ruas JL, Berne MEA. *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* Newmann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (ACARI: IXODIDAE) no Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biologia*. 2005; 72: 319-24.
- Munson L, Karesh WB. Disease monitoring for the conservation of terrestrial animals. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. *Conservation Medicine: Ecological health in practice*. Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 95-103.
- Naiff RD, Arias JR. *Besnoitia* (Protozoa: Toxoplasmatinae) isolado de mucuras *Didelphis marsupialis* na região amazônica Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983; 78 (4): 431-5.
- Nava S, Venzal JM, Labruna MB, Mastropaolo M, Gonzalez EM, Mangold AJ, Gugliemone AA. Hosts, distribution and genetic divergence (16 rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2010; 51: 335-51.
- Nelder MP, Reeves WK, Adler PH, Wozniak A, Wills W. Ectoparasites and associated pathogens of free-roaming and captive animals in Zoos of South Carolina. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 2009; 9 (5): 469-77.
- Nemesánszki E, Lott JA. Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: progress and problems. *Clin Chem*. 1985; 31 (6): 797-803.
- Neto RAF. Morfologia externa do fígado e principais ramificações da veia porta intra-hepática no gambá (*Didelphis albiventris*). *Salusvita*. 2000; 19 (2): 53-61.
- Nimer E. *Climatologia do Brasil*. Rio de Janeiro; IBGE: 1989. 421p.

- Noronha D, Pinto R. Status of two nematode type species from the Bacteriological Institute of São Paulo included in the Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CHIOC). *Rev Bras Zool.* 2006; 23: 899–900.
- Old JM, Deane EM. Development of the immune system and immunological protection in marsupial pouch young. *Developmental & Comparative Immunology.* 2000; 24 (5): 445–54.
- Olifiers N, Vieira MV, Grelle CEV. Geographic range and body size in neotropical marsupials. *Global Ecol Biogeogr.* 2004; 13: 439-44.
- Olifiers N, Cunha AA, Grelle CEV, Bonvicino CR, Geise L, Pereira LG, Vieira MV, D'Andrea PS, Cerqueira R. Lista de espécies de pequenos mamíferos não-voadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. In: Cronemberger C, Viveiros de Castro EB, organizadores. *Ciência e Conservação na Serra dos Órgãos.* Brasília; IBAMA: 2007. p.184-92.
- Orlandini O, Sass-Kortsak A, Ebbs JH. Serum gamma globulin levels in normal infants. *Pediatrics.* 1955; 16: 575–83.
- Ostfeld RS, Meffe GK, Pearl MC. Conservation Medicine: The birth of another crisis discipline. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. *Conservation Medicine: Ecological health in practice.* Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 17-26.
- Otero ACS, Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, Palatnik CB. Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 128–31 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136 (14): 1915-34.
- Pachaly JR. Principais drogas empregadas na contenção farmacológica de animais selvagens. *Arq Cienc Vet Zool UNIPAR.* 2000;3 (1): 87-94.
- Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, Gaeta GB. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 2005; 55: 229–33 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136 (14): 1915-34.
- Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araujo FAP, Silva NRS. Identificação do *Didelphis marsupialis* como hospedeiro experimental de *Babesia bovis*. *Pesq Agropec Brasil.* 1991; 26(4): 511-3.
- Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araujo FAP, Silva NRS. Infecção experimental de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em *Didelphis marsupialis* esplenectomizados. *Pesq Agropec Brasil.* 1992a; 27(1): 61-4.
- Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araujo FAP, Silva NRS. Utilização do *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. *Pesq Agropec Brasil.* 1992b; 27(1): 213-6.
- Patton JL, Costa LP. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: *Predators with pouches; the biology of carnivorous marsupials.* Jones M, Archer M, Dickman C, editores. Tasmania: CSIRO Publishing; 2003. p. 63-81.
- Patton S, Funk RS. Serologic response of the opossum *Didelphis virginiana* to a temperature-sensitive mutant (ts-4) of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1992; 78: 741–3 *apud* Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of *Toxoplasma gondii* among Brazilian white eared opossums (*Didelphis albiventris*). *Vet Parasitol.* 2011; 179 (1-3): 238-41.



- Pedersen K, Manning EJB, Corn JL. Distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the lower Florida keys. *J Wildl Dis.* 2008; 44 (3): 578-84.
- Pena HFJ, Marvulo MFV, Horta MC, Silva MA, Silva JCR, Siqueira DB, Lima PACP, Vitaliano SN, Gennari SM. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 175: 377–81.
- Penn R, Worthington DJ. Is serum  $\gamma$ -glutamyltransferase a misleading test? *British Medical Journal.* 1983; 286: 531-5.
- Persson J, Magnusson PH. Causes of elevated serum gamma-glutamyltransferase in patients attending outpatient somatic clinics and district health centres. *Scand J Prim Health Care.* 1987; 5: 13-23.
- Petrides GA. Sex and age determination in the opossum. *J Mammal.* 1949; 30: 364-78 *apud* Ruiz-Piña HA, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 (5): 613-20.
- Pinard CL, Brightman AH, Yeary TJ, Everson TD, Cox LK, Chengappa MM, Davidson HJ. Normal Conjunctival Flora in the North American Opossum (*Didelphis virginiana*) and Raccoon (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis.* 2002; 38(4): 851–5.
- Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol.* 2006; 92 (6): 1251-5.
- Prevedello JA, Mendonça AF, Vieira MV. Uso do espaço por pequenos mamíferos: uma análise dos estudos realizados no Brasil. *Oecol Bras.* 2008; 12 (4): 610-25.
- Primack RB, Rodrigues E. *Biologia da Conservação.* Londrina; Efraim Rodrigues: 2001. 328 p.
- Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009; 136(14): 1915-34.
- Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009; 136: 1915-1934.
- Rademaker V, Cerqueira R. Variation in the latitudinal reproductive patterns of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Austral Ecology.* 2006; 31: 337-42.
- Regendanz P, Kikuth W. Sur un parasite du sang des “quica” (*Metachirus quica*) *Nuttalia brasiliensis* n. sp. et influence de la rate sur les infections latentes du sang. *C R Soc Biol.* 1928; 98: 1567-9 *apud*
- Rejmanek D, Vanwormer E, Miller MA, Mazet JAK, Nichelason AE, Melli AC, Packham AE, Jessup DA, Conrad PA. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in the opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. *Vet Parasitol.* 2009; 166: 8-14.
- Ribeiro RD, Garcia TAR, Bonomo WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da Doença de Chagas. *Revista de Saúde Pública.* 1987; 21(1): 51-4.
- Ribeiro EEA, Batista MCS, Carvalho MAM, Silva JAL. Níveis iônicos e enzimáticos de cutias (*Dasyproctasp.*) hípidas, criadas em cativeiro, influência do sexo e da idade. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008; 60 (3): 651-5.

- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. 2009; 142: 1141–53.
- Ribicich M, Gamble HR, Bolpe J, Scialfa E, Krivokapich S, Cardillo N, Betti A, Holzmann MLC, Pasqualetti M, Fariña F, Rosa A. Trichinella infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res*. 2010; 107: 377-80.
- Richardson DJ, Campo JD. Gastrointestinal Helminths of the Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) in South-Central Connecticut, U.S.A. *Comp Parasitol*. 2005; 72 (2): 183-5.
- Rodwell VW. Enzimas: propriedades gerais. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, organizadores. Harper: Bioquímica, 7ª ed. São Paulo; Atheneu editora: 1994. p. 61-71.
- Rowlands Jr DT, Dudley MA. The development of serum proteins and humoral immunity in opossum “embryos”. *Immunology*. 1969; 17: 969-75.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*. 2005; 91: 970–2 apud Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009; 136 (14): 1915-34.
- Ruiz-Piña HA, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5): 613-20.
- Ruiz-Piña HA, Puc-Franco MA, Flores-Abuxapqui J, Vado-Solís I, Cárdenas-Marrufo MF. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002; 44(4): 235-7.
- Ruoff KL. Streptococcus. In: Murray PR et al., editores. *Manual of Clinical Microbiology*, 6ª ed. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1995. p.299-314 apud Rurangirwa FR, Teitzel CA, Cui J, French DM, McDonough PL, Besser T. *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. *Int J Syst Evol Microb*. 2000;50: 759–65.
- Rurangirwa FR, Teitzel CA, Cui J, French DM, McDonough PL, Besser T. *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. *Int J Syst Evol Microb*. 2000;50: 759–65.
- Ruttmann E, Brant LJ, Concini H, Diem G, Rapp K, Ulmer H. Gamma- glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality- an epidemiological investigation in a cohort of 163.944 Austrian adults. *Circulation*. 2005; 112 (14): 2130-7.
- Salvador CH, Carvalho-Pinto C, Carvalho R, Graipel ME, Simões-Lopes PC. Interação parasito-hospedeiro entre ectoparasitos (Ixodida & Siphonaptera) e gambás *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphimorphia), no continente e em ilhas do litoral de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas*. 2007; 20 (4): 81-90.
- Salvador CH, Graipel ME, Simões-Lopes PC. Body size of commom opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) on southern brazilian islands. *Braz J Biol*. 2009; 69 (2): 311-7.

Samoto VY, Miglino MA, Ambrosio CE, Pereira FTV, Lima MC, Carvalho AF. Morfologia da glândula mamária de gambás da espécie *Didelphis* sp. associada ao modelo marsupial. *Biota Neotropica*. 2006; 6 (2).

Sampaio MX, Massard CL. *Nuttallia brasiliensis* e *Theileria brasiliensis*, sinónimas de *Babesia brasiliensis* (Piroplasmida: Babesiidae) hemoparasito de marsupiais didelphidae. *Parasitol Latinoam*. 2003; 58: 89-91.

Sanderson GC. Estimating opossum populations by marking young. *Journal of wildlife management*. 1961; 25 (1).

Santori RT, Astúa de Moraes DA, Cerqueira R. Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphoidea) in southeastern Brazil. *Mammalia*. 1995; 59 (4): 511-6.

Santori RT, Astúa de Moraes DA, Cerqueira R. Comparative Gross morphology of the digestive tract in tem Didelphidae marsupial species. *Mammalia*. 2004; 68 (1): 27-36.

Santos LC. Laboratório ambiental. Cascavel; Edunioeste: 1999.

Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A. Peridomiciliary colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100 (5): 471-3.

Schenk MAM, Mendonça CL, Madruga CR, Kohayagawa A, Araújo FR. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesq Vet Bras*. 2001; 21 (4): 157-61.

Schnurremberger PR, Brown RR, Hill EP, Scanlan CM, Altieri JA, Wykoff JT. *Brucella abortus* in wildlife on selected cattle farms in Alabama. *J Wildl Dis*. 1985; 21 (2): 132-6.

Sealander JA. The influence of body size, season, sex, age and other factors upon some blood parameters in small mammals. *Journal of Mammalogy*. 1964; 45 (4): 598-616.

Shaw S, Grasperge B, Nevarez J, Reed S, Long L, Rademacher N, Guzmán DSM. *Besnoitia darlingi* infection in a virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *J Z Wildl Med*. 2009; 40 (1): 220-3.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984; 79 (4): 511.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Experimental infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988; 83 (1): 141.

Sillanawkee P. Laboratory markers of alcohol abuse. *Alcohol & Alcoholism*. 1996; 31 (6): 613-6.

Silva OD, Arantes JB. Sobre uma hemogregarina da gambá. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1916; 8: 61-3.

Silva-Vergara ML, Martinez R, Malta MEB, Ramirez LE, Franco FA. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic área of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 1-2.

SilvaJRCP, Martin MRFB, Guazelli Filho J. Estudo da anatomia do baço do gambá (*Didelphis albiventris*). Veterinária Notícias. 2005; 11 (2): 19-21.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009; 160: 55–9 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136 (14): 1915-34.

Silva FJ, Mathias LA, Magajevski FS, Werther K, Assis NA, Girio RJS. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais domésticos e silvestres presentes no campus universitário da FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP. Ars Veterinaria. 2010; 26 (1): 17-25.

Skotarczak B. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review. Veterinarni Medicina. 2008; 53 (5): 229–35.

Smith DD, Frenkel JK. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and East Central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. J Wildl Dis. 1995; 31 (1): 15-21.

Souza RM, Birgel Jr. EH, Ayres MCC, Birgel EH. Influência dos fatores raciais na função hepática de bovinos da raça Holandesa e Jersey. Braz J Vet Res Anim Sci. 2004; 41: 306-12.

Spalding MG, Forrester DJ. Disease monitoring of free-ranging and released wildlife. J Z Wildl Med. 1993; 24(3): 271-80.

Svartman M. American marsupials chromosomes: Why study them? Genet Mol Biol. 2009; 32 (4): 675-87.

Symmers WS. Leishmaniasis acquired by contagion – a case of marital infection in Britain. Lancet. 1960; 1: 127–32 *apud* Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136 (14): 1915-34.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota MM, Bedê LC. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na mata atlântica brasileira. Revista Megadiversidade. 2005; 1(1).

Tabarelli M, Gascon C. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. Revista Megadiversidade. 2005; 1 (1): 181-8.

Tabor GM. Defining Conservation Medicine. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. Conservation Medicine: Ecological health in practice. Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 8-16.

Tarragona EL, Zurvera D, Manzoli DE, Correa AI, Delgado AR, Mastropaolo M, Barengo E, Beldomenico PM. Parâmetros hematológicos de la comadreja overa, *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), de poblaciones silvestres del centro de la Argentina. In Vet. 2011; 13: 97-105.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. Int J Parasitol. 2000; 30: 1217–58 *apud* Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of *Toxoplasma gondii* among brazilian white eared opossums (*Didelphis albiventris*). Vet Parasitol. 2011; 179 (1-3): 238-41.

Thoisly B, Demar M, Aznar C, Carme B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. J Wildl Dis. 2003; 39: 456–9.

- Toledo MJO, Kühl JB, Silva SV, Gasperi MV, Araújo SM. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, sul do Brasil. Resultados preliminares. Rev Soc Brasil Med Trop. 1997; 30 (3): 197-203.
- Travassos L. *Dracunculus fuelleborni* n. sp., parasito de *Didelphis aurita* Wied. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1934; 28: 235-41.
- Trujillo CM, Rodriguez L, Rodas JD, Arboleda JJ. Experimental infection of *Didelphis marsupialis* with vesicular stomatitis New Jersey vírus. J Wildl Dis. 2010; 46 (1): 209-17.
- Urdaneta-Morales S, Nironi I. *Trypanosoma cruzi* in the Anal Glands of Urban Opossums. I- Isolation and Experimental Infections. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91: 399-403.
- Vieira MV. Body size and form in two neotropical marsupials, *Didelphis aurita* and *Philander opossum* (Marsupialia: Didelphidae). Mammalia. 1997; 61 (2): 245-54.
- Vieira MV, Cunha AA. Scaling body mass and use of space in three species of marsupials in the Atlantic Forest of Brazil. Austral Ecology. 2008; 33: 872-9.
- Voss RS, Jansa SA. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world Metatherian mammals. Bulletin of the American Museum of Natural History. 2009; 322: 1-177.
- Wallach JD, Boever WJ. Marsupialia and Monotremes. In: Sauderi WB. Med. surgical management: Disease of exotic animals. 1983: 575-611 *apud* Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araujo FAP, Silva NRS. Identificação do *Didelphis marsupialis* como hospedeiro experimental de *Babesia bovis*. Pesq Agropec Brasil. 1991; 26(4): 511-3.
- Wasser SK, Hunt KE, Clarke CM. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editores. Conservation Medicine: Ecological health in practice. Nova Iorque; Oxford University Press: 2002. p. 130-44.
- Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. Crit Rev Clin Lab. 2001; 38: 263-355.
- WHO-World Health Organization. Control of Chagas Disease, Technical Report Series No. 811, Geneva: World Health Organization; 1991. p. 95 *apud* Ruiz-Piña HA, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 (5): 613-20.
- Wilson DE, Reeder DM, editores. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3<sup>a</sup> ed. Maryland: John Hopkins University Press; 2005.
- Witmer G, Fine AE, Gionfriddo J, Pipas M, Shively K, Piccolo K, Burke P. Epizootiologic survey of *Mycobacterium bovis* in wildlife and farm environments in Northern Michigan. J Wildl Dis. 2010; 46 (2): 368-78.
- Woodford MH *et al.* Habituating the great apes: the disease risks. Oryx. 2002; 36 (2): 153-60.
- Yabsley MJ, Shock BC. Natural history of zoonotic Babesia: role of wildlife reservoirs. Int J Parasitology: Parasites and Wildlife. [periódico na internet]. 2012 [acesso em 2012 Nov 22][aproximadamente 14 p.]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224412000077>

Yai LEO, Cañon-Franco WA, Geraldi VC, Summa MEL, Camargo MCGO, Dubey JP, Gennari SM. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. *J Parasitol.* 2003; 89: 870–1 *apud* Pena HFJ, Marvulo MFV, Horta MC, Silva MA, Silva JCR, Siqueira DB, Lima PACP, Vitaliano SN, Gennari SM. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 175: 377–81.

Yoshida ELA, Cuba Cuba CA, Pacheco RS, Cupolillo E, Tavares CC, Machado GMC, Momen H, Grimaldi Jr G. Description of *Leishmania (Leishmania) forattini* sp. N., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88 (3): 397-406.

Zanette RA, Silva AS, Lunardi F, Santurio JM, Monteiro SG. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. *Parasitol Internat.* 2008; 57: 217-8.

Zeledón R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chaga's disease. Ciba Foundation Symposium 20. Amsterdam: Elsevier: 1974. p. 51-85 *apud* Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol.* 2006; 92 (6): 1251-5.