



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DOUGLAS APARECIDO DA SILVA

***Sarcocystis* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES MORTOS POR
ATROPELAMENTO NO ESTADO DO PARANÁ**

DOUGLAS APARECIDO DA SILVA

***SARCOCYSTIS* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES MORTOS POR
ATROPELAMENTO NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Paula F. R. L. Bracarense

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva , Douglas Aparecido da.

SARCOCYSTIS spp. EM ANIMAIS SILVESTRES MORTOS POR ATROPELAMENTO NO ESTADO DO PARANÁ / Douglas Aparecido da Silva. - Londrina, 2025.

80 f.

Orientador: Profª Drª. Ana Paula F. R. L. Bracarense.

Coorientador: Luiz Daniel de Barros.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Estradas. - Tese. 2. Meio Ambiente. - Tese. 3. Protozoários - Tese. 4. Sinantrópicos - Tese. I. Bracarense, Ana Paula F. R. L. II. Barros, Luiz Daniel de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

DOUGLAS APARECIDO DA SILVA

***Sarcocystis* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES MORTOS POR ATROPELAMENTO
NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Prof.^a Dr^a Ana Paula F. R. L.
Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. João Luís Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por me guiar e dar forças todos os dias e principalmente nos momentos difíceis.

Agradeço a minha esposa Elaine por estar ao meu lado todos os dias durante esse período e sem ela nada poderia ter acontecido.

Aos meus pais e irmã pelo apoio durante toda a minha vida.

À professora Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense pelos ensinamentos e compreensão.

Ao Professor Luiz Daniel de Barros, meu co-orientador sendo parceiro desde os tempos de graduação.

Ao Professor Italmir Teodoro Navarro, um dos grandes mestres que encontrei na vida.

À Professora Roberta Lemos Freire, uma das inspirações de vida e profissão.

Aos professores que conheci e pude ter o privilégio de trabalhar durante os anos que estive na UEL, principalmente à professora Regina Mitsuka-Breganó; professora Fernanda Pinto Ferreira; professora Eloiza Teles Caldart; Professor Fernando de Souza Rodrigues e Professor João Luiz Garcia.

Aos colegas de dia a dia e trabalhos no laboratório, em especial ao Felipe Danyel Cardoso Martins e Winni Alves Ladeia, duas das pessoas mais me ensinaram.

Aos funcionários dos laboratórios e Hospital veterinário e todos os colegas de profissão e amigos que tiveram participação direta ou indireta durante esse ciclo.

“Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias”.

Salmo 23:6

RESUMO

SILVA, DOUGLAS APARECIDO. ***Sarcocystis* spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado do Paraná**. 2024. 61 f. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A crescente urbanização tem intensificado a interação entre a fauna silvestre e os ambientes urbanos. As modificações nos ecossistemas podem alterar a dinâmica de transmissão de patógenos e favorecer a disseminação de agentes infecciosos. Dentre os parasitos, o gênero *Sarcocystis* é composto por protozoários apicomplexos de grande relevância veterinária, conhecidos por infectarem uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. Este estudo teve como objetivo detectar a presença de *Sarcocystis* spp. em animais atropelados, utilizando diagnóstico molecular e análises anatomopatológicas. Entre 2020 e 2022, carcaças de animais mortos por atropelamento foram submetidas a necropsia, com coleta de fragmentos de órgãos para avaliação histológica e molecular. Na análise histológica, os tecidos foram fixados, processados e corados com hematoxilina-eosina. Para a detecção molecular, realizou-se a extração de DNA e amplificação por nested-PCR, utilizando primers específicos para a região 18S rRNA. Os produtos amplificados foram submetidos à clivagem enzimática (*DdeI*, *HPY188III* e *MspI*) e sequenciados. Foram analisadas 128 amostras provenientes de 23 quatis e gambás, com amplificação de DNA de *Sarcocystis* em 10 animais pela n-PCR e em 5 pela RFLP. Em 3 deles, o sequenciamento confirmou similaridade com *Sarcocystis* spp. e no exame microscópico não foram detectados cistos teciduais. Além disso, duas aves da espécie *Guiraguira* apresentaram amostras amplificadas para *Sarcocystis* spp. após a clivagem enzimática e esquizontes compatíveis com *Sarcocystis* spp. foram visualizados em músculos esqueléticos e tecido pulmonar das aves. A presença de *Sarcocystis* em diferentes hospedeiros reforça a necessidade de estudos adicionais sobre a diversidade e patogenicidade desse parasita em animais silvestres. A caracterização molecular e a análise histopatológica são essenciais para compreender a dinâmica da infecção e seus impactos na fauna. Estudos futuros devem explorar não apenas a identificação de do parasita, mas também os possíveis efeitos da infecção na saúde dos hospedeiros e seu papel na transmissão do protozoário em ecossistemas naturais e antrópicos.

Palavras-chave: Diagnóstico. Estradas. Meio Ambiente. Protozoários. Sinantrópicos.

ABSTRACT

SILVA, DOUGLAS APARECIDO. **SARCOCYSTIS** spp. IN WILD ANIMALS KILLED BY RUN OVER IN THE STATE OF PARANÁ. 2024. 61 f. Dissertation - (Master's degree in 2024) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Increasing urbanization has intensified the interaction between wildlife and urban environments. Changes in ecosystems can alter the dynamics of pathogen transmission and favor the spread of infectious agents. Among the parasites, the genus *Sarcocystis* is composed of apicomplexan protozoa of great veterinary relevance, known to infect a wide variety of hosts, including mammals, birds, and reptiles. This study aimed to detect the presence of *Sarcocystis* spp. in roadkill animals, using molecular diagnosis and anatomopathological analyses. Between 2020 and 2022, carcasses of animals killed by roadkill were subjected to necropsy, with collection of organ fragments for histological and molecular evaluation. In the histological analysis, the tissues were fixed, processed, and stained with hematoxylin-eosin. For molecular detection, DNA extraction and amplification by nested-PCR were performed using primers specific for the 18S rRNA region. The amplified products were subjected to enzymatic cleavage (DdeI, HPY188III and MspI) and sequenced. A total of 128 samples from 23 coatis and opossums were analyzed, with *Sarcocystis* DNA amplification in 10 animals by n-PCR and in 5 by RFLP. In 3 of them, sequencing confirmed similarity with *Sarcocystis* spp. and no tissue cysts were detected in the microscopic examination. In addition, two birds of the species *Guirra guirra* presented amplified samples for *Sarcocystis* spp. after enzymatic cleavage and schizonts compatible with *Sarcocystis* spp. were visualized in skeletal muscles and lung tissue of the birds. The presence of *Sarcocystis* in different hosts reinforces the need for additional studies on the diversity and pathogenicity of this parasite in wild animals. Molecular characterization and histopathological analysis are essential to understand the dynamics of the infection and its impacts on fauna. Future studies should explore not only the identification of new strains of the parasite, but also the possible effects of the infection on the health of the hosts and their role in the transmission of the protozoan in natural and anthropogenic ecosystems.

Key-words: Diagnosis. Roads. Environment. Protozoa. Synanthropic

Sumário

1	- INTRODUÇÃO	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Histórico	9
2.2	Ciclo Biológico	10
2.3	Hospedeiros	12
2.4	Patogenicidade	14
2.5	Estudos moleculares	15
2.5.1	RNA Ribossômico - 18s	16
2.5.2	Espaçador transcrito interno - ITS	17
2.5.3	Citocromo C oxidase I	17
2.5.4	Técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)	18
3	REFERÊNCIAS	19
4	HIPÓTESE	31
5	OBJETIVO GERAL	32
5.1	Objetivos específicos	32
6	ARTIGO 1:	33
7	ARTIGO 2	44
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
8	ANEXOS	64
8.1	ANEXO A – Autorização SISBIO. Autorização de Pesquisa nas Unidades de Conservação Federal. ...	64

1 - INTRODUÇÃO

Segundo o Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas (CBEE) são estimados cerca de 2 milhões de animais atropelados por ano. A construção de rodovias causa interferência humana no meio ambiente e essas alterações favorecem a fuga de animais silvestres para locais urbanizados (CBEE, 2019; UFLA, 2019).

Além disso, as modificações antropogênicas na natureza, principalmente pela expansão metropolitana e avanço da agricultura e pecuária, têm ocasionado um desequilíbrio ecológico que culmina na busca de abrigo e alimento pela fauna em regiões diferentes do seu habitat (BARBOSA et al., 2011). Portanto, isso torna plausível a infecção ao homem por agentes etiológicos que circulam no meio selvagem muito provável, principalmente quando se trata de doenças com múltiplos hospedeiros (WOOLHOUSE et al., 2001).

Devido as alterações ambientais, há cada vez mais fugas e busca de refúgios de animais selvagens com adaptação ao meio urbano (CUNNINGHAM et al., 2017.; ADAMS et al., 2005, JONES et al., 2008). Essa introdução de espécies e, conseqüentemente, colonização traz impactos negativos, pois é amplamente relatado que diversas doenças zoonóticas se originaram no ambiente silvestre (HASSEL et al., 2017.; CHABER, 2018). Nesse contexto, podem ser discutidas questões como a transmissão de patógenos entre animais domésticos e silvestres que, até então, não haviam tido contato entre si, o que pode representar sérios riscos para diferentes populações. Além disso, destaca-se o potencial de mutação dos agentes patogênicos e as alterações no ciclo epidemiológico (THOMPSON et al., 2009; TORGENSON & MACPHERSON, 2011).

Entre as principais espécies que apresentam maior facilidade de adaptação ao meio urbano no Brasil estão o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e o quati (*Nasua nasua*) (BEZERRA-SANTOS, et al. 2021.; LEMOS & CERQUEIRA, 2002). Estas espécies podem tornar-se animais sinantrópicos, com habilidade de frequentar locais de habitação humana e circular entre os ambientes metropolitanos, silvestres e rurais. Esses animais constituem um papel crucial na cadeia epidemiológica de diversas doenças, uma vez que podem agir como reservatórios e carrear patógenos para populações urbanas e silvestres (BITENCOURT & BEZERRA, 2022., MEHRKENS et al., 2013.; ZITELLI et al. 2021.; FORNAZARI et al., 2018., SOUSA et al., 2017)

Entre os diversos patógenos conhecidos, se destacam os parasitos do Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae, que possuem grande interesse veterinário devido as suas características biológicas, variabilidade genética e múltiplos hospedeiros que podem ser acometidos (DUBEY et al., 2015.; FAYER et al., 2015).

Espécies do gênero *Sarcocystis* são parasitas de ciclo heteroxeno que afetam diversos animais, incluindo seres humanos (DUBEY et al., 2015). Atualmente, são consideradas aproximadamente 200 espécies de *Sarcocystis*, sendo conhecido o ciclo completo de cerca de 25 % (ODENING, 1998). Os hospedeiros intermediários, normalmente presa, se infectam pela ingestão de esporocistos no ambiente, e o desenvolvimento acontece de forma assexuada em músculos e tecido nervoso. Os hospedeiros definitivos (predador) se infectam pela ingestão de tecido contendo sarcocistos de sua presa e a multiplicação sexual e formação de oocistos ocorre no intestino delgado (DUBEY et al., 2015; FAYER et al., 2015).

As principais espécies causadoras de doenças nos animais são *Sarcocystis neurona* causadora de mieloencefalite protozoária equina (MPE), *S. calchasi* e *S. falcatula* em aves. Os animais silvestres desempenham papel fundamental na disseminação e manutenção do agente, pois podem participar como hospedeiros definitivos e/ou intermediários dependendo da espécie animal e assim constitui um importante elo na cadeia epidemiológica da doença (FRENKEL, 1990).

O homem pode desempenhar o papel de hospedeiros definitivos para duas espécies de *Sarcocystis*, desenvolvendo sarcocistose intestinal ao ingerirem carne mal-passada, sendo *S. hominis* proveniente de carne bovina e *S. suis hominis* oriunda de carne suína (FAYER et al., 2015, ROSENTHAL, 2021). Os sintomas, como náusea, dor de estômago e diarreia, variam significativamente com base no número de cistos ingeridos, sendo mais pronunciados no caso da carne suína em comparação com a carne bovina.

Os quatis e gambás são importantes na disseminação de *Sarcocystis* spp. no meio ambiente, sendo a espécie *S. neurona* a mais conhecida por ser o agente causador da MPE, uma grave doença neurológica em equinos (DUBEY et al., 2015., GONDIM et al., 2017).

Este trabalho busca detectar a presença de *Sarcocystis* spp. a partir de amostras oriundas de animais silvestres mortos por atropelamento. Para isso, foram utilizados métodos direcionados ao hospedeiro vertebrado e a espécie do parasito, com a combinação de diagnóstico histológico e testes moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO

Sarcocystis spp. são protozoários unicelulares do filo Apicomplexa com ampla distribuição mundial. O primeiro relato foi realizado por Miescher, em 1843, ao observar "fios brancos leitosos" na musculatura de um rato doméstico na Suíça (MIESCHER, 1843). Por duas décadas, essa estrutura ficou conhecida simplesmente como "Túbulos de Miescher" (LANKESTER, 1882; LEVINE, 1977, 1986). Em 1865, Kuhn identificou um parasita semelhante em suínos e o denominou *Synchytrium miescherianum*. No entanto, esse nome já estava em uso, levando Lankester a introduzir o gênero *Sarcocystis*, cujo termo deriva do grego *sarkos* (músculo) e *kystis* (vesícula ou bolsa), referindo-se à fase assexuada do estágio final do ciclo biológico do parasita, que são os cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; LEVINE; JAMES, 1987; LEVINE, 1988).

Em 1899, Labbé modificou o nome *Synchytrium miescherianum* para *Sarcocystis miescheriana*. Dessa forma, o parasita *S. miescherianum*, descrito por Kuhn em 1865 e renomeado por Labbé em 1899, tornou-se a espécie-tipo do gênero. O parasita originalmente encontrado por Miescher em camundongos foi descrito por Blanchard em 1885 e nomeado *Sarcocystis muris* por Railliet em 1886 (DUBEY, 2022; LEVINE; JAMES, 1987).

Nos anos 1970, descobriu-se a necessidade do ciclo heteroxeno (com dois hospedeiros) para o ciclo biológico do parasita, envolvendo um vertebrado carnívoro como hospedeiro definitivo. Esse hospedeiro geralmente se infecta ao ingerir cistos presentes nos tecidos musculares de hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros, que, por sua vez, adquirem o parasita ao ingerirem esporocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos no solo ou na água (JANITSCHKE et al., 1976; MUNDAY et al., 1975).

Houve muita controvérsia quanto à classificação taxonômica de *Sarcocystis*. Somente a partir da década de 1960, com o uso da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível a identificação e diferenciação das espécies (HEYDORN et al., 1975; ROMMEL et al., 1978). Atualmente, considera-se a seguinte classificação taxonômica (LEVINE, 1986, 1988; ODENING, 1998):

Filo – Apicomplexa; Levine, 1979

Classe- Sporozoasida; Leuckart, 1879

Subclasee- Coccidiasina; Leuckart, 1879

Ordem- Eucoccidiorida; Leger and Duboseq, 1910

Sub ordem-Eimeriorina; Leger; 1911

Familia- Sarcocystidae; Poche; 1913

Subfamilia- Sarcocystinae; Poche; 1913

Gênero – *Sarcocystis*; Lankaster; 1882.

A caracterização e o diagnóstico moleculares, tornam-se cada vez mais relevantes, possibilitando a confirmação dos ciclos HI/HD já identificados, a definição de novos ciclos, a descrição de novas espécies do gênero *Sarcocystis* e o aprofundamento do conhecimento sobre sua evolução filogenética.

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Atualmente, são descritas aproximadamente 200 espécies de *Sarcocystis*, sendo que, em 25% dos casos, o ciclo biológico já foi completamente elucidado (ODENING, 1998). Esses parasitas possuem um ciclo heteroxeno e afetam diversas espécies de animais, incluindo seres humanos (DUBEY et al., 2015; FAYER, 1972). Os hospedeiros intermediários, normalmente presas, se infectam pela ingestão de esporocistos presentes no ambiente, e o desenvolvimento ocorre de forma assexuada nos músculos e no tecido nervoso. Já os hospedeiros definitivos (predadores) se infectam ao ingerir tecidos contendo sarcocistos da presa, onde ocorre a multiplicação sexual no intestino delgado, resultando na formação de oocistos (DUBEY et al., 2015; FAYER et al., 2015).

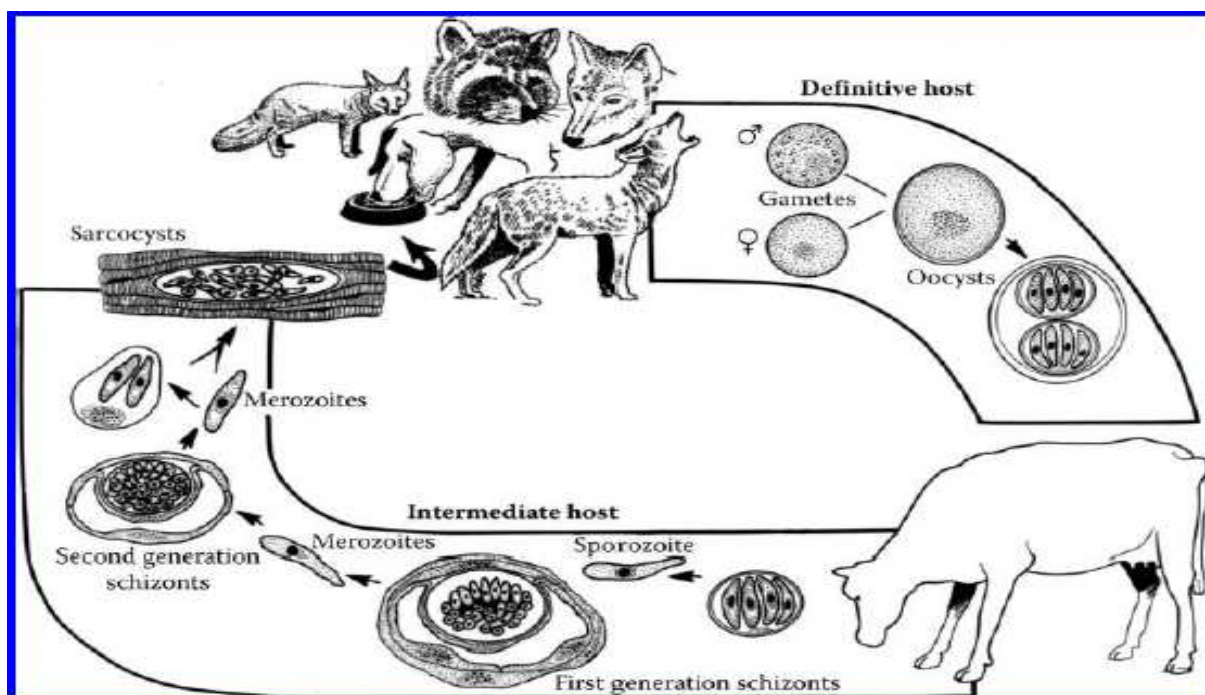
A infecção do hospedeiro definitivo ocorre após a ingestão de tecidos contendo sarcocistos maduros com bradizoítos em seu interior. No estômago e intestinos, os bradizoítos são liberados e rapidamente se movimentam, penetrando na mucosa intestinal. Nesse local, formam-se os microgamontes masculinos e os macrogamontes femininos, sendo estes últimos quase 100 vezes mais numerosos. Após a maturação, os gametócitos se transformam em gametas masculinos móveis e flagelados (microgametas) e em gametas femininos, que são maiores e imóveis (macrogametas), iniciando assim o processo de gametogonia (DUBEY et al., 1977, 1982).

O zigoto resultante da gametogonia se desenvolve dentro do epitélio, produzindo oocistos não esporulados na lâmina própria do intestino. Esses oocistos esporulam na lâmina própria, formando dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. A parede do oocisto que envolve os esporocistos é delgada e frágil,

frequentemente rompendo-se e liberando os esporocistos na lâmina própria (Figura 1). Assim, os esporocistos são lançados no lúmen intestinal e, posteriormente, excretados nas fezes (DUBEY, 2022; BANERJEE, 1998; BARROWS et al., 1977).

O período pré-patente varia entre o sétimo e o décimo quarto dia após a ingestão de sarcocistos (DUBEY et al., 2015; FAYER et al., 1979; O'TOOLE, 1987; POWELL et al., 1986; SHEFFIELD, 1980; SMITH et al., 1987).

Figura 1. Ciclo biológico de *Sarcocystis cruzi*



Fonte: DUBEY et al., 2015.

Nos hospedeiros intermediários, a infecção ocorre por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com esporocistos presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos. No intestino delgado, os esporozoítos são liberados dos esporocistos, atravessam a mucosa intestinal e migram para as células endoteliais dos linfonodos mesentéricos e artérias. Nessas células, ocorrem as primeiras gerações de multiplicação assexuada, conhecidas como esquizogonia ou merogonia. As gerações subsequentes podem causar doenças graves devido à disseminação do parasito por diferentes órgãos, levando à ruptura das células infectadas, inflamação, edema e liberação de toxinas (PAPERNA, 1996; SHEFFIELD, 1980; FAYER; JOHNSON, 1973).

A quantidade e a distribuição de sarcocistos variam consideravelmente de acordo com o tipo de hospedeiro. Entre os fatores que influenciam essa variação estão a quantidade de esporocistos ingeridos, a espécie de *Sarcocystis* envolvida, além da espécie e do estado imunológico do hospedeiro. A maioria dos sarcocistos se desenvolve em músculos estriados esqueléticos; no entanto, alguns também podem ser encontrados em músculos lisos e no sistema nervoso central (SMITH et al., 1987; ROMMEL et al., 1972; FAYER, 1972).

O desenvolvimento intracelular ocorre por um complexo processo de divisão celular denominado endopoligenia. Nesse processo, os merozoítos presentes no interior das células iniciam uma forma de esquizogonia, na qual aumentam de tamanho e apresentam núcleo lobulado, resultando na formação de esquizontes. O material nuclear eventualmente se divide de forma simultânea à citocinese, produzindo múltiplos merozoítos. Alguns merozoítos escapam de suas células hospedeiras, penetram em outras células e sofrem novas gerações de esquizogonia. Em outros casos, os merozoítos permanecem dentro da célula hospedeira onde se desenvolveram e iniciam outra geração de esquizogonia (FAYER, 1972; FAYER; THOMPSON, 1975).

Merozoítos liberados da esquizogonia podem ser observados na corrente sanguínea, em células mononucleadas como macrófagos, e nos tecidos dos animais infectados, onde formam os sarcocistos. A formação e maturação dos sarcocistos iniciam-se quando o merozoíto é recoberto pelo vacúolo parasitóforo, formando metrócitos imaturos. Esses metrócitos sofrem divisão por endodiogenia, produzindo inúmeros bradizoítos dentro dos sarcocistos. Essa é a fase final da reprodução assexuada e representa o estágio infectante para o hospedeiro definitivo (FAYER et al., 1976; DUBEY, 1981; SPEER; DUBEY, 1986).

2.3 HOSPEDEIROS

Algumas espécies de *Sarcocystis* apresentam especificidade em relação aos hospedeiros intermediários e definitivos. Por exemplo, no caso de *S. cruzi*, o ciclo do parasito envolve bovinos e bubalinos como hospedeiros intermediários, enquanto os canídeos atuam como hospedeiros definitivos (FAYER et al., 1976; SMITH et al., 1987). No entanto, essa especificidade não se aplica a outras espécies, como *S. falcatula* e *S. neurona*, que utilizam gambás como hospedeiros definitivos, mas

apresentam ampla diversidade de aves e mamíferos entre seus hospedeiros intermediários (FAYER; THOMPSON, 1975; DUBEY et al., 2015).

As principais espécies de *Sarcocystis* e seus respectivos hospedeiros estão dispostos no quadro 1.

Sarcocystis neurona e *S. falcatula* são geneticamente muito próximas e utilizam marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiros definitivos. Além disso, esses animais participam do ciclo de outros *Sarcocystis*, como *S. speeri* e *S. lindsayi* (DUBEY et al., 2015).

Entre as principais espécies de animais que apresentam grande facilidade de adaptação ao meio urbano no Brasil estão o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e o quati (*Nasua nasua*) (BEZERRA-SANTOS et al., 2021; LEMOS; CERQUEIRA, 2002). Esses animais desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica de muitas doenças, pois podem atuar como reservatórios e disseminadores de patógenos para populações urbanas e silvestres (BITENCOURT; BEZERRA, 2022; MEHRKENS et al., 2013; ZITELLI et al., 2021; FORNAZARI et al., 2018; SOUZA et al., 2017).

No Brasil, as espécies *S. falcatula*, *S. neurona*, *S. speeri* e *S. lindsayi* já foram descritas em esporocistos no gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*), no gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) e no gambá-americano (*D. marsupialis*) (DUBEY et al., 2015).

Os seres humanos podem desempenhar o papel de hospedeiros definitivos para duas espécies de *Sarcocystis*, desenvolvendo sarcocistose intestinal ao ingerirem carne mal passada. *Sarcocystis hominis* é proveniente da carne bovina, enquanto *S. suis hominis* tem origem na carne suína (FAYER et al., 2015). Os sintomas, como náusea, dor de estômago e diarreia, variam significativamente conforme o número de cistos ingeridos, sendo mais pronunciados no caso da carne suína em comparação com a carne bovina (ABUBAKAR et al., 2013; LAU et al., 2014). O homem também pode atuar como hospedeiro intermediário para *Sarcocystis nesbitti*, uma espécie que tem as cobras como hospedeiros definitivos (LATIF; MUSLIN, 2016; TIAN et al., 2012). Essa doença é de difícil diagnóstico devido aos sintomas inespecíficos, e a investigação epidemiológica deve considerar viagens a regiões onde há risco de infecção (ROSENTHAL, 2021).

A participação de hospedeiros paratênicos no ciclo de *Sarcocystis* tem sido discutida em diversos estudos, tanto de forma experimental quanto por meio de

diagnósticos sorológicos (TILLMANN; KAMINO; MOHR, 1999; SMITH; FRENKEL, 1978; RUIZ; FRENKEL, 1976; CLUBB; FRENKEL, 1992).

Devido à grande diversidade genética, à complexidade do ciclo biológico, à ampla gama de hospedeiros e ao papel ainda incerto de muitos desses no ciclo de *Sarcocystis* spp., é essencial considerar todas as hipóteses e possibilidades para um melhor entendimento desse protozoário.

As principais espécies de *Sarcocystis* e seus respectivos hospedeiros estão dispostos no quadro 1.

Espécie de <i>Sarcocystis</i>	Hospedeiro intermediário	Hospedeiro definitivo
<i>Sarcocystis cruzi</i>	Bovinos	Cães
<i>Sarcocystis hirsuta</i>	Bovinos	Felinos
<i>Sarcocystis hominis</i>	Bovinos	Homem
<i>Sarcocystis bovifelis</i>	Bovinos	Felinos
<i>Sarcocystis tenella</i>	Ovinos	Cães
<i>Sarcocystis arieticanis</i>	Ovinos	Cães
<i>Sarcocystis capracanis</i>	Caprinos	Cães
<i>Sarcocystis sui hominis</i>	Suínos	Homem
<i>Sarcocystis porcifelis</i>	Suínos	Felinos
<i>Sarcocystis neurona</i>	Equinos, roedores e outros mamíferos	Gambás
<i>Sarcocystis falcatula</i>	Aves	Gambás
<i>Sarcocystis calchasi</i>	Aves	Aves de rapina
<i>Sarcocystis nesbitti</i>	Homem	Répteis

Quadro 1: Espécies de *Sarcocystis* na primeira coluna; seus hospedeiros intermediários na coluna do centro e os hospedeiros definitivos na coluna da direita.

2.4 PATOGENICIDADE

Algumas espécies de *Sarcocystis* podem causar sintomatologia grave nos hospedeiros intermediários infectados. Em contrapartida, nos hospedeiros definitivos, a infecção geralmente apresenta um curso brando. A patogenicidade da infecção por *Sarcocystis* depende de diversos fatores, como a espécie do parasita, a intensidade

da infecção e a região do corpo afetada, além de fatores estressantes e condições de baixa imunidade, incluindo prenhez, desnutrição e desidratação (DUBEY et al., 1989; FAYER, 2004).

A sarcocistose, em geral, manifesta-se de forma branda em animais saudáveis e de vida livre, com sinais clínicos normalmente imperceptíveis. Não há um sintoma específico que caracterize a doença. O quadro clínico pode variar de sintomas leves a moderados, como fraqueza, perda de peso, febre, anemia, tremores, hipersalivação e redução na produção, até manifestações graves, incluindo encefalite, encefalomielite e hepatite. Em casos de infecção em fêmeas prenhas, a doença pode levar ao aborto (DUBEY et al., 2015; DUBEY, 2022; BLEDSOE, 1979).

Casos de sarcocistose pulmonar em aves são relatados, mas os sinais neurológicos causados são pouco estudados, principalmente em animais de vida livre (GODOY et al, 2009; KONRADT et al, 2017; LLANO et al, 2022).

Embora a infecção por *Sarcocystis* em quatis e gambás seja comum e normalmente não ocorra manifestações clínicas, existe a possibilidade de doença fatal devido a miocardite e encefalite (DUBEY et al., 2017.; HAMIR & DUBEY, 2001, WENDTE et al., 2010). Além disso, é importante frisar que as aves podem atuar como reservatórios do parasita, aumentando o risco de transmissão para outros animais (FAYER et al., 2015).

2.5 ESTUDOS MOLECULARES

O DNA de *Sarcocystis* pode ser extraído diretamente de tecidos infectados para PCR e o isolamento prévio dos sarcocistos pode ser necessário para evitar contaminação com DNA do hospedeiro.

Os avanços na genética molecular possibilitaram novas abordagens experimentais e estudos de regulação gênica. O sequenciamento do genoma de *S. neurona* recentemente forneceu um cariótipo molecular, impulsionando estudos genéticos e genômicos comparativos sobre o patógeno.

As espécies *S. neurona* e *S. falcatula* possuem grande proximidade genotípica devido à semelhança na sequência codificadora da fração 18S do DNA ribossomal (18S rDNA). A diferenciação entre ambas pode ser realizada através de ensaios biológicos, uma vez que *S. falcatula* provoca doença em algumas aves suscetíveis à infecção por essa espécie, enquanto isso não ocorre em infecções por *S. neurona*. Em termos moleculares, a distinção entre *S. neurona* e *S. falcatula* é feita utilizando

RAPD (DNA polimórfico amplificado rapidamente), marcadores moleculares e sequências transcritas internas do locus codificador de RNA ribossômico (ITS) (TANHAUSER et al., 1999).

O gene 18S rDNA foi sequenciado em diversas espécies de *Sarcocystis*, como relatado por Dubey et al. (2015). Essa região apresenta alta conservação, o que torna viável a utilização de primers para organismos relacionados. Contudo, espécies intimamente relacionadas, apesar de diferenças fenotípicas, podem apresentar pouca ou nenhuma variação nesse *locus*. Um exemplo é a relação entre *S. falcatula* e *S. neurona*, que foram consideradas sinônimas durante certo período devido às mínimas diferenças nessa sequência (FENGER et al., 1995). O gene 18S rDNA não demonstrou variabilidade suficiente para separar espécies de *Sarcocystis* que possuem aves como hospedeiros intermediários (OLIAS et al., 2010; PRAKAS et al., 2013). Apesar disso, recomenda-se que descrições de novas espécies incluam essa sequência para possibilitar comparações futuras (DUBEY et al., 2015).

2.5.1 RNA Ribossômico - 18s

O gene responsável pela codificação do RNA ribossomal desempenha um papel essencial na célula, pois está envolvido diretamente na formação das subunidades do ribossomo e no processo de síntese de proteínas. Por ser altamente conservado entre diferentes organismos, é amplamente utilizado como marcador genético para identificar e diferenciar entre vários grupos taxonômicos. Ele é constituído por sequências codificadoras que incluem as regiões 18S, 5.8S e 28S, separadas pelos espaçadores internos ITS-1 e ITS-2. Essas regiões ITS são altamente variáveis e conservadas, o que as torna úteis em estudos filogenéticos e de identificação específica de organismos dentro de um mesmo gênero ou espécie (ELLIS et al., 1995; ELLIS; MORRISON, 1995; JEFFRIES et al., 1997; HOLMDAHL et al., 1993).

As sequências do genoma nuclear que codificam produtos de RNA ribossomal, assim como os genes responsáveis pelos produtos mitocondriais no genoma dessa organela, são amplamente reconhecidos como os marcadores moleculares mais comuns para identificar espécies do gênero *Sarcocystis* (GJERDE, 2013; 2016). Em particular, o gene que codifica a subunidade ribossômica pequena (18S rDNA) foi amplamente estudado e identificado na maioria das espécies do gênero (DUBEY et al., 2015).

Esses marcadores são valorizados por alternarem regiões altamente conservadas e altamente variáveis, como observado no estudo de Ogedengbe et al. (2016).

Embora o gene 18S rDNA seja amplamente empregado na identificação molecular de espécies de *Sarcocystis*, ele apresenta limitações em diferenciar espécies intimamente relacionadas. Por exemplo, *S. falcatula* e *S. neurona* foram, por um tempo, erroneamente consideradas a mesma espécie (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995). Isso ocorre porque o 18S rDNA não possui variabilidade suficiente para distinguir entre algumas espécies de *Sarcocystis* (OLIAS et al., 2010; PRAKAS et al., 2013).

2.5.2 Espaçador transcrito interno - ITS

O gene ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) é amplamente utilizado para diferenciar espécies e grupos taxonômicos próximos devido à sua alta sensibilidade, proporcionada pela presença de múltiplas cópias no genoma. Contudo, um dos principais desafios desse marcador é o grande número de gaps observados durante o alinhamento das sequências, o que torna o processo de comparação genômica mais complexo (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003; PRAKAS et al., 2013).

A principal vantagem do uso de ITS1 e ITS2 é sua universalidade e sensibilidade, visto que os loci ribossômicos estão presentes em várias cópias nos genomas eucarióticos (ÁLVAREZ & WENDEL, 2003). No entanto, devido às taxas evolutivas significativamente mais altas dos loci ITS em comparação aos genes 18S rDNA, COI e 28S rDNA, estudos filogenéticos baseados nesses marcadores devem ser restritos a espécies estreitamente relacionadas e não comparadas diretamente a gêneros (ELLIS et al., 1999). Isso se deve ao fato de que inserções e deleções frequentes nas sequências ITS dificultam o alinhamento preciso entre organismos distantes, diminuindo a confiabilidade dos resultados filogenéticos (PRAKAS et al., 2013).

2.5.3 Citocromo C oxidase I

O gene *CytB* destaca-se como um marcador molecular relevante devido à sua capacidade de diferenciar espécies, graças à sua conservação e resistência às alterações nucleotídicas provocadas por pressões evolutivas (PENTINSAARI et al., 2016). Esse gene é especialmente eficaz para identificar espécies de *Sarcocystis* em

situações onde ruminantes são os hospedeiros intermediários (GJERDE, 2013; GJERDE et al., 2017). No entanto, sua aplicação é limitada em casos que envolvem aves ou mamíferos carnívoros, uma vez que as variações detectadas com esse marcador são pouco significativas, dificultando a distinção entre espécies (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018). Assim, o *CytB* é uma ferramenta útil para diferenciar espécies dentro do gênero *Sarcocystis*, principalmente em cenários envolvendo ruminantes, mas apresenta limitações quando aplicado a outros grupos de hospedeiros, onde a identificação de espécies pode ser inviável.

É importante ressaltar que os estudos sobre genes mitocondriais em espécies de *Sarcocystis* ainda são escassos.

2.5.4 Técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

O método RFLP baseia-se na digestão dos produtos obtidos por PCR ou nested-PCR utilizando enzimas específicas. Essas enzimas cortam o DNA em fragmentos com tamanhos específicos, cuja análise gera diferentes padrões de fragmentos, dependendo da espécie analisada, permitindo sua identificação (GUO; JOHNSON, 1995; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; YANG et al., 2002).

A utilização de enzimas de restrição é uma opção de escolha para diferenciação de protozoários apicomplexa e uma forma de triagem entre *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia* sp. e *Sarcocystis* spp (SILVA et al., 2009). Além disso, dependendo dos marcadores utilizados, podemos diferenciar entre as espécies *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula* (RICHINI-PEREIRA et al., 2016; SNEIDERIS. 2022, TANHAUSER et al., 1999).

3 REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, S. et al. Outbreak of human infection with *Sarcocystis nesbitti*, Malaysia, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 1989-1991, 2013. DOI: 10.3201/eid1912.120530.

ADAMS, R. et al. Managing urban habitats and wildlife. In: Techniques for wildlife investigations and management. 6. ed. **The Wildlife Society**, [s.d.], 2005. https://www.researchgate.net/publication/261834561_Managing_urban_habitats_and_wildlife.

ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003. DOI: 10.1016/S1055-7903(03)00208-2.

BANERJEE, P.S. Studies on pathogenesis of *Sarcocystis tenella* in sheep. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 65, 1998.

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. da S.; MAGALHÃES, D. F. D. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 14, n. 1-2-3, p. 1-9, 2011.

BARROWS, P.L.; PRESTWOOD, A.K.; ADAMS, D.D.; DYKSTRA, M.J. Development of *Sarcocystis suicanis* Erber, 1977 in the pig. **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 674–680, 1982. PMID: 6811716.

BEZERRA-SANTOS, M. A. et al. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. **Parasite Research**, v. 120, n. 12, p. 4091-4111, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07072-4.

BITENCOURT, M. M.; BEZERRA, A. M. R. Infection agents of Didelphidae (Didelphimorphia) of Brazil: An underestimated matter in zoonoses research. **Mammalia**, v. 86, n. 2, p. 105–122, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/mammalia-2021-0134>.

BLANCHARD, R. Note sur les sarcosporidies et sur un essai de classification de ces sporozoaires. **Bulletin de la Société Zoologique de France**, v. 10, p. 244–276, 1885.

BLEDSON, B. *Sarcocystis idahoensis* sp. n. in deer mice *Peromyscus maniculatus* (Wagner) and gopher snakes *Pituophis melanoleucus* (Daudin). **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 93–102, 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04235.x>

CBEE. **Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas**. Acesso em: em 08 de janeiro de 2024. Disponível em < <https://ecoestradas.com.br/2milhoes/>>.

CHABER, A. L. The era of human-induced diseases. **EcoHealth**, v. 15, p. 8-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1299-9>

CLUBB, S. L.; FRENKEL, J. K. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 116-124, 1992. DOI: 10.2307/3283697.

CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1725, p. 20160167, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>.

DAME, J. B. et al. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 930-935, 1995. DOI: 10.2307/3284044.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 1ª edição.

DUBEY, J. P.; STREITEL, R. H.; STROMBERG, P. C.; TOUSSAINT, M. J. *Sarcocystis fayeri* sp. n. from the horse. **Journal of Parasitology**, v. 63, p. 443–447, 1977.

DUBEY, J.P. Development of the ox-cat cycle of *Sarcocystis hirsuta*. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 49, p. 295–304, 1982.

DUBEY, J.P.; KISTNER, T.P.; CALLIS, G. Development of *Sarcocystis* in mule deer transmitted through dogs and coyotes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 2904–2912, 1983.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; KWOK, O.C.H.; SAVILLE, W.J.A. *Sarcocystis neurona* infection in gamma interferon gene knockout (KO) mice: Comparative infectivity of sporocysts in two strains of KO mice, effect of trypsin digestion on merozoite viability, and infectivity of bradyzoites to KO mice and cell culture. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 212–215, 2013.

DUBEY, J. P. et al. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with *sarcocysts*, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 3-4, p. 117-129, 2001. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00500-3.

DUBEY, J. P. J. et al. **Sarcocystosis of Animals and Humans**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 2ª edição.

DUBEY, J. P. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1-2, p. 1-42, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.01.026.

DUBEY, J. P. et al. Atypical fatal sarcocystosis associated with *Sarcocystis neurona* in a White-nosed coati (*Nasua narica mularis*). **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 80-84, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.10.003.

DUBEY, J. P. *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* infections in horses and equine protozoal myeloencephalitis (EPM): five decades of personal experience, perspectives and update. **Parasitology**, v. 149, n. 6, p. 717-728, 2022.

DOI: 10.1017/S0031182021002055.

ELLIS, T. J. et al. Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. **Parasitology**, v. 110, pt. 5, p. 521-528, jun. 1995. DOI: 10.1017/s0031182000065239.

ELLIS, J.; MORRISON, D. Effects of sequence alignment on the phylogeny of *Sarcocystis* deduced from 18S rDNA sequences. **Parasitology Research**, v. 81, n. 8, p. 696-699, 1995. DOI: 10.1007/BF00931849.

FAYER, R. Gametogony of *Sarcocystis* sp. in cell culture. **Science**, v. 175, p. 65, 1972.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LEEK, R.G. Infectivity of *Sarcocystis* spp. from bison, elk, moose, and cattle for cattle via sporocysts from coyotes. **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 681–685, 1982.

FAYER, R. Multiplication of *Sarcocystis bovicanis* in the bovine bloodstream. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 980–982, 1979.

FAYER, R.; ESPOSITO, D. H.; DUBEY, J. P. Human infections with *Sarcocystis* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 295-311, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14>.

FENGER, C. K. et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995. DOI: 10.2307/3284040.

FORNAZARI, F. et al. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205–212, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>.

FRENKEL, J. K. Sarcocystosis of animals and man. **Parasitology Today**, v. 6, n. 11, p. 367, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90421-y](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90421-y).

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle, and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 7, p. 579-591, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.02.004.

GJERDE, B. Molecular characterisation of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasite Research**, v. 115, n. 4, p. 1473-1492, 2016. DOI: 10.1007/s00436-015-4881-5.

GJERDE, Bjørn; VIKØREN, Turid; HAMNES, Inger Sofie. Molecular identification of *Sarcocystis halioti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018. ISSN 2213-2244. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.12.001).

GODOY, S. N.; DE PAULA, C. D.; CUBAS, Z. S.; MATUSHIMA, E. R.; CATAO-DIAS, J. L. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 18–23, 2009. DOI: [10.1647/2008-006R.1](https://doi.org/10.1647/2008-006R.1).

GONDIM, L. S. Q. et al. *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* in Brazilian opossums (*Didelphis* spp.): Molecular investigation and in vitro isolation of *Sarcocystis* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 192–198, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.002>.

GUO, Z. G.; JOHNSON, A. M. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 81, n. 5, p. 365-370, 1995. DOI: 10.1007/BF00931495.

JEFFRIES, A. C. et al. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis* based on 18S rDNA sequence comparison. **Journal of Eukaryotic**

Microbiology, v. 44, n. 5, p. 388-392, 1997. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1997.tb05713.x.

HAMIR, A. N.; DUBEY, J. P. Myocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neurona* infection in raccoons (*Procyon lotor*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 335–340, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00400-3).

HASSELL, James M.; et al. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 1, p. 55–67, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>.

HOLMDAHL, O. J. et al. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from *Sarcocystis* species. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, n. 6, p. 481–486, dez. 1993. DOI: 10.1006/mcpr.1993.1071.

HOWE, D. K.; MACKAY, R. J.; REED, S. M. Equine Protozoal Myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 659–675, 2014. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.08.012.

JONES, K.; et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990–993, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

KONRADT, G. et al. Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus infuscatus*). **Parasitology Research**, v. 116, p. 809–812, 2017. DOI: 10.1007/s00436-016-5341-6.

LANKESTER, E.R. On *Drepanidium Ranarum*, the cell-parasite of the frog's blood and spleen. **Journal of Cell Science**, v. S2-22, p. 53–65, 1882.

LATIF, B.; MUSLIM, A. Human and animal sarcocystosis in Malaysia: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 982–988, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.003>.

LLANO, A. B. et al. Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggests a plethora of intermediate hosts for *Sarcocystis falcatula*. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 230-238, 2022. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2022.03.002.

LAU, Y. L. et al. *Sarcocystis nesbitti* infection in human skeletal muscle: possible transmission from snakes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 361-364. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0678.

LEMOES, B.; CERQUEIRA, R. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae: *Didelphis*). **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 2, p. 354–369, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)).

LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. **Journal of Parasitology**, v. 63, p. 36–51, 1977.

LEVINE, N.D.; BAKER, J.R. The *Isospora–Toxoplasma–Sarcocystis* confusion. **Parasitology Today**, v. 3, p. 101, 1987.

LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 1**. 1st ed. CRC Press, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781351076104>

MARSH, A. E. et al. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 4, p. 750-757, 1999. DOI: 10.2307/3285758.

MEHRKENS, L. R. et al. White-nosed coatis (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *Trypanosoma cruzi* and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 4, p. 1014–1018, 2013. DOI: <https://doi.org/10.7589/2013-01-005>.

MIESCHER, F. Über eigentümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. *Berichte der Naturforschenden Gesellschaft Basel*, v. 5, p. 198–202, 1843.

MORRISON, D. A. et al. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 501-514, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.11.006.

O'DONOGHUE, P.J.; OBENDORF, D.L.; O'CALLAGHAN, M.G.; MOORE, E.; DIXON, B.R. *Sarcocystis mucosa* (Blanchard 1885) Labbé 1889 in unadorned rock wallabies (*Petrogale assimilis*) and Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*). **Parasite Research**, v. 73, p. 113–120, 1987.

O'TOOLE, D. Experimental ovine *Sarcocystis*: Sequential ultrastructural pathology in skeletal muscle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 97, p. 51–60, 1987.

ODENING, K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, v. 41, p. 209-233, 1998. DOI:10.1023/A:1006090232343.

OGEDENGBE, M. E. et al. Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (*Sarcocystidae*; *Apicomplexa*) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia*. **Parasitology Open**, v. 2, p. e2, 2016. DOI: 10.1017/pao.2015.7.

OLIAS, P. et al. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 7-14, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.03.021.

PAPERNA, I.; FINKELMAN, S. Early generation merogonies of *Sarcocystis muriviperae* in liver and muscles of white mice. **Folia Parasitologica (Praha)**, v. 43, p. 91–99, 1996.

PENTINSAARI, M. et al. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35275, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1038/srep35275>.

POWELL, E.C.; PEZESHKPOUR, G.; DUBEY, J.P.; FAYER, R. Types of myofibers parasitized in experimentally induced infections with *Sarcocystis cruzi* and *Sarcocystis capracanis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 514–517, 1986.

PRAKAS, P. et al. Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov. from the jackdaw (*Corvus monedula*). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1163-1167, 2013. DOI: 10.1007/s00436-012-3247-5.

REED, S. M. et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 491-502, 2016. DOI: 10.1111/jvim.13834.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 602-607, 2016. DOI: 10.1590/0037-8682-0270-2016.

ROSENTHAL, B. M. *Zoonotic Sarcocystis*. **Research in Veterinary Science**, 2021. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.02.008.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. **Journal of Infectious Diseases**, v. 133, n. 4, p. 409-418, 1976. DOI: 10.1093/infdis/133.4.409.

SHEFFIELD, H.G.; FAYER, R. Fertilization in the coccidia: Fusion of *Sarcocystis bovicanis* gametes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 47, p. 118–121, 1980.

SILVA, R. C. et al. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moule, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Journal of**

Veterinary Science, v. 165, p. p. 332–336, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.016>.

SILVA, T. M. V. et al. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*-like in horses from Southeastern and Midwestern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 3, p. e007623, 2023. DOI: 10.1590/S1984-29612023031.

SMITH, D.; FRENKEL, J. K. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and of other coccidia in the laboratory. **The Journal of Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 315-319, 1978. PMID: 417163

SMITH, J.H.; MEIER, J.L.; NEILL, P.J.G.; BOX, E.D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. I. Early pulmonary schizogony. **Laboratory Investigation**, v. 56, p. 60–71, 1987.

SNEIDERIS, D.; STALPES, M.; BUTKAUSKAS, D. et al. A novel RFLP method for identification of morphologically similar avian *Sarcocystis* species. **Parasitology Research**, v. 121, p. 2161–2166, 2022. DOI: 10.1007/s00436-022-07553-0.

SOUSA, K. C. M. et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 237, p. 37–46, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.023>.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>.

TANHAUSER, S. M.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; et al. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 221-228, abr. 1999. DOI: 10.2307/3285623.

TIAN, M. et al. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis nesbitti* (Coccidia: Sarcocystidae) suggests a snake as its probable definitive host. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 373-376, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.034.

TILLMANN, T.; KAMINO, K.; MOHR, U. *Sarcocystis muris* – a rare case in laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 4, p. 390-392, 1999. DOI: 10.1258/002367799780487869.

THOMPSON, R. C. A.; KUTZ, S. J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 2, p. 678-693, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph6020678>.

TORGERSON, P. R.; MACPHERSON, C. N. L. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 79–95, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.01>.

UFLA. Universidade Estadual de Lavras. Portal UFLA. **Expedição Urubu na Estrada**. Disponível em: <https://ufla.br/noticias/pesquisa/13137-mais-de-2-milhoes-de-animais-morrem-atropelados-todos-os-anos-no-pais>.

WENDTE, J. M. et al. Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1–2, p. 37–44, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.020>.

WOOLHOUSE, M. E. J.; TAYLOR, L. H.; HAYDON, D. T. Population biology of multihost pathogens. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1109-1112, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1059026>.

YANG, Z. et al. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 3–4, p. 212-217, 2002. DOI: 10.1016/S0014-4894(03)00033-X.

ZITELLI, L. C. et al. Serological investigation of protozoan pathogens (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*) in opossums from southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100546>.

4 HIPÓTESE

Existe a infecção de animais silvestres da região Norte do Paraná por *Sarcocystis* spp.

5 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de *Sarcocystis* spp. em animais silvestres atropelados na Região Norte do Paraná.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações histológicas em animais infectados por *Sarcocystis* spp
- Diferenciar as espécies de *Sarcocystis* spp. encontradas nas amostras positivas.

6 ARTIGO 1:

Histopathological identification and molecular detection of *Sarcocystis* spp. causing encephalitis in free-living guira cuckoo (*Guira guira*)

Douglas Aparecido Silva^a, Maria Izabel Pedra Sogari^a, Ana Angelita Sampaio Baptista^b, Itamar Teodorico Navarro^c, João Luis Garcia^c, Luiz Daniel de Barros^d, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense^a

^a Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Pathological Anatomy, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^b Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Avian Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^c Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Animal Protozoology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^d Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 37203-202, Brazil

* Corresponding author: Tel: +. Email address:

Abstract

Sarcocystis are protozoa that require an intermediate and a definitive host to complete their cycle, usually prey and predator, respectively. Several species of *Sarcocystis* can infect birds, and some, such as *S. falcatula* and *S. calchasi*, can cause serious lesions. The objective of this study is to report the anatomopathological and molecular findings compatible with *Sarcocystis* spp. in two guira cuckoo (*Guira guira*). Two guira cuckoo were found dead and submitted to autopsy. Organ fragments were collected for histological and molecular evaluation. For histology, the fragments fixed in 10% buffered formalin solution were processed according to the routine and the sections stained with hematoxylin and eosin. For molecular detection of *Sarcocystis* spp., tissue extraction was performed with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. DNA detection was performed by nested PCR using primers from the target region 18S rRNA of the Apicomplexa family. The n-PCR products were cleaved with restriction enzymes DdeI,

HPY188III and Mspl. Results: Macroscopically, the lungs were edematous and dark red. One of the animals had partially digested cockroaches in the gizzard. Microscopically, diffuse pulmonary hemorrhage was observed associated with schizonts compatible with *Sarcocystis* spp. Schizonts associated with lymphocytic infiltrate were detected in the liver, skeletal muscle and muscle layer of the proventriculus. Encephalitis and gliosis were observed in the brain in one animal. DNA amplification was detected in the tongue, heart, liver, brain and esophagus. Histological and molecular findings confirm systemic sarcocystosis. Guira cuckoo have carnivorous habits and may participate in the maintenance and dissemination of *Sarcocystis* spp. in the environment, in addition to serving as food for other predators. **Keywords:** Sarcocystosis; wild bird; histopathology; PCR-RFLP.

1 Introduction

Sarcocystis spp. are protozoan parasites with heteroxenous life cycles and affect several animal species, including humans (1–3). Currently, approximately 200 species of *Sarcocystis* are confirmed, and 25% have the life cycle completely described (3). Intermediate hosts, usually prey, become infected by ingesting sporocysts in the environment, and the development of cysts occurs mainly in muscles and nervous tissue. Definitive hosts (predators) become infected by ingesting tissue containing sarcocysts from their prey, and sexual multiplication occurs in the small intestine by forming oocysts (1).

Birds play a fundamental role in the dissemination and maintenance of *Sarcocystis*, as they can participate as definitive and/or intermediate hosts depending on the animal species and thus constitute an important link in the epidemiological chain of the disease (4–6). Different species of *Sarcocysts* can infect birds; however, studies have shown that *S. neurona*, *S. calchasi*, and *Sarcocysts falcatula* are considered the main species, which *S. falcatula* is one of the most prevalent in birds from different avian orders (5–7).

Pulmonary sarcocystosis in birds has been widely reported; however, recent studies described encephalitis in many avian species associated with *S. calchasi* and *S. falcatula* (8–11). Other relevant changes in *Sarcocystis* infection in birds are meningoencephalitis due to infiltration of macrophages and lymphocytes, perivascular cuffs and gliosis and schizonts. (13, 14, 15).

One of the points that deserve attention is the difficulty in differentiating between

the species of *Sarcocystis*, mainly due to the genetic similarity between *S. neurona* and *S. falcatula*. Furthermore, there is a gap in understanding the correlation between the isolated species of opossums and the infection of birds by certain species of *Sarcocystis* (8 - 11).

The present study aimed to report a sarcocystosis case causing encephalitis in two free-living guira cuckoo (*Guira guira*) from Brazil.

2 Material and methods

2.1 Ethics Committee

The project was approved by the Animal Use Ethics Committee of the State University of Londrina (CEUA/UEL) under number 038.2020 and by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) under number 75997-1.

2.2 Sample collection

Two free-living guira cuckoos (*G. guira*; order Cuculiformes; Gmelin, 1788) were found dead near the campus of the State University of Londrina and underwent autopsy. Multiple tissue fragments were collected for histological and molecular evaluation.

2.3 Histopathology

The tissue samples were fixed in 10% buffered formalin solution for 24 h, then transferred to 70% ethyl alcohol solution and embedded in paraffin. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues were sectioned with 5 µm thickness and stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathologic analysis.

2.4 DNA extraction and molecular analysis

The DNA extraction was performed with phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol, as previously described (12). The DNA samples were stored at -20 °C until molecular analysis.

The amplification of the 18s ribosomal RNA gene (18s RNA) was performed for molecular detection of *Sarcocystis* DNA and other apicomplexans (13). Nested-PCR was performed using 25 mM of the outer primers Tg18s48F and Tg18s359R and 50 mM of the inner primers Tg18s58F and Tg18s348. The amplicons' expected size was 290 base pairs (bp) for *S. neurona*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, and

Toxoplasma gondii and 310 bp for other *Sarcocystis* species.

Then, the enzymatic digestion using the enzymes DdeI, HPY188III, and MspI was performed to analyze restriction fragment length polymorphism (RLFP) and differentiate *T. gondii*, *N. caninum*, and *Sarcocystis* species. The amplified products were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3 Results

3.1 Gross finding

Gross examination revealed one male and one female in good nutritional condition (Figure 1) and moderate carcass preservation. The internal evaluation of the female animal showed preserved visceral topography and a discrete accumulation of blood and clots in the coelomic cavity. In both animals the lungs were expanded, moist, and had significant blood upon cut. In the female, several partially digested cockroaches were found in the gizzard (Figure 2).

3.2 Histological findings

Histological evaluation of the lung revealed marked diffuse hemorrhage, while in the skeletal muscle, a discrete multifocal lymphocytic myositis was shown. Furthermore, in both tissues, it was observed the presence of intralesional schizonts compatible with *Sarcocystis* spp. (Figure 3). Schizonts associated with lymphocytic infiltration were detected in the liver, and muscular layer of the proventriculus. In the brain, multifocal lymphocytic encephalitis and multifocal gliosis were observed in one animal (Figure 3).

3.3 Molecular detection

Amplified products compatible with *Sarcocystis* spp. at the 300 base pair level were detected in tongue, heart, liver, brain and esophagus (Figure 3).

4 Discussion

Reports of the detection of *Sarcocystis* spp. in wild birds are limited due to factors such as the difficulty in obtaining samples and the lack of detailed clinical history. The objective of this study was to integrate different diagnostic methods from two animals found in good condition, which were free-ranging. *Sarcocystis* infection in

birds occurs when they ingest sporocysts present in contaminated water or food, excreted by definitive hosts, which in Brazil include the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) (14). In the intermediate host, the disease is associated with tissue destruction caused by the rapid asexual reproduction of the protozoan, also known as schizogony, which occurs after oral infection (15). In birds, one of the most characteristic clinical manifestations of *Sarcocystis falcatula* infection is severe interstitial pneumonia, which results from the rupture of infected endothelial cells in the lungs (16). In our study, the main alterations observed in affected animals were recorded in the lungs and nervous system. This observation is in agreement with previous studies that documented pulmonary and neurological manifestations associated with *S. falcatula* infection.

A recent study by Llano et al. (2022) identified a new species of *Sarcocystis* in *Guira guira* (Cuculiformes: Cuculidae), demonstrating a genetic relationship of 92.65% with *S. falcatula* and 93.55% with *S. lindsayi* (AF387164), which reinforces the importance of this bird in maintaining the parasite in the environment (17). Based on the research, our work is one of the few reports on the detection of *Sarcocystis* spp. in guira cuckoo (*Guira guira*), obtained through histological findings in various tissues, conventional PCR and restriction enzymes, highlighting the relevance of accurate diagnosis by multiple methods. Another noteworthy point was the presence of cockroaches in the stomach contents of the birds analyzed, a factor that may be indicative of paratenic hosts for *Sarcocystis muris*. Although infection by *S. muris* in birds is rare, it has been experimentally documented by serological diagnosis and microscopic visualization (19). In a classic study, Clubb and Frenkel (1992) investigated the death of psittacines in an aviary and concluded that cockroaches played a role in the transmission of *S. falcatula* from opossums to birds, being an etiological agent responsible for pulmonary sarcocystosis in birds (22). Since insects are part of the natural diet of many birds, the presence of cockroaches should be considered a relevant factor in the epidemiology of the disease, as it may facilitate the transmission of the protozoan to new populations of birds. Furthermore, the genetic similarity between *S. falcatula* and *S. neurona* was demonstrated by analyses of the 18S ribosomal RNA gene sequences, which improves our understanding of the evolution and transmission of these parasites (23, 24). Although they share genetic similarities, the two species can be differentiated by their biological characteristics, a crucial distinction for the diagnosis and control of infections (25, 26). Finally, the

transmission dynamics of sarcocystosis in birds is influenced by the diversity of intermediate and definitive hosts, which makes the biological cycle of *Sarcocystis* complex and illustrates the wide range of hosts that can participate in the biological cycle of these parasites, complicating the understanding and control of this parasitosis (26, 27).

This study reflects the complexity of sarcocystosis in birds and emphasizes the importance of complementary diagnosis and understanding the hosts and species involved. The increase in the number of diagnosed cases and the diversification of research methods are essential for advancing knowledge about the epidemiology of *Sarcocystis* in free-living animals.

5 Conclusions

The histological and molecular findings confirm systemic sarcocystosis. Guira cuckoo have carnivorous habits and can participate in the maintenance and dissemination of *Sarcocystis* spp. in the environment, in addition to serving as food for other predators. The presence of digested cockroaches draws attention to possible paratenic hosts. In view of this report, we reinforce the importance of using complementary diagnostic methods and researching pathogens in wild animals.

Acknowledgments

References

1. Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R. *Sarcocystosis of animals and humans*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.
2. Fayer R. *Sarcocystis* spp. in human infections. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 894-902.
3. Rosenthal BM. Zoonotic *Sarcocystis*. Res Vet Sci 2021; 136: 151-161.
4. Máca O, González-Solís D. Role of three bird species in the life cycle of two *Sarcocystis* spp. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the Czech Republic. Int J Parasitol Parasites Wildl 2022; 17: 290-298.

5. Llano HAB, Polato HZ, Keid LB, Oliveira TMS, Zwarg T, Oliveira AS, et al. *Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggests a plethora of intermediate hosts for Sarcocystis falcatula*. Int J Parasitol Parasites Wildl 2022; 18: 50-57.
6. Rogers KH, Arranz-Solís D, Saeij JPJ, Lewis S, Mete A. *Sarcocystis calchasi and other Sarcocystidae detected in predatory birds in California, USA*. Int J Parasitol Parasites Wildl 2022; 18: 38-49.
7. Gondim LFP, Soares RM, Tavares AS, Borges-Silva W, Jesus RF, Llano HAB, et al. *Sarcocystis falcatula-like derived from opossum in Northeastern Brazil: In vitro propagation in avian cells, molecular characterization and bioassay in birds*. Int J Parasitol Parasites Wildl 2019; 9: 153-160.
8. Ushio N, Watanabe KI, Chambers JK, Shibato T, Nakayama H, Uchida K. *Sarcocystis calchasi encephalitis in a rock pigeon*. J Vet Med Sci 2015; 77(7): 899-902.
9. Bamac OE, Rogers KH, Arranz-Solís D, Saeij JPJ, Lewis S, Duerr R, et al. *Protozoal encephalitis associated with Sarcocystis calchasi and S. falcatula during an epizootic involving Brandt's cormorants (Phalacrocorax penicillatus) in coastal Southern California, USA*. Int J Parasitol Parasites Wildl 2020; 12: 185-191.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.iippaw.2020.06.005>.
10. Wilson TM, Sousa SKH, Paludo GR, Melo CB, Llano HAB, Soares RM, et al. *An undescribed species of Sarcocystis associated with necrotizing meningoencephalitis in naturally infected backyard chickens in the Midwest of Brazil*. Parasitol Int 2020; 78: 102-110.
11. Maier K, Olias P, Enderlein D, Klopffleisch R, Mayr SL, Gruber AD, et al. *Parasite distribution and early-stage encephalitis in Sarcocystis calchasi infections in domestic pigeons (Columba livia f. domestica)*. Avian Pathol 2015; 44(1): 1-9.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

13. Silva RC, Su C, Langoni H. *First identification of Sarcocystis tenella (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil.* Vet Parasitol 2009; 165(3-4): 332-336.
14. Olson EJ, Wunschmann A, Dubey JP. *Sarcocystis sp.-associated meningoencephalitis in a bald eagle (Haliaeetus leucocephalus).* J Vet Diagn Invest 2007; 19(5): 564-568.
15. Wunschmann A, Rejmanek D, Conrad PA, Hall N, Cruz-Martinez L, Vaughn SB, et al. *Natural fatal Sarcocystis falcatula infections in free-ranging eagles in North America.* J Vet Diagn Invest 2010; 22(2): 282-289. <http://dx.doi.org/10.1177/104063871002200222>.
16. Suedmeyer K, Bermudez AJ, Barr BC. *Acute pulmonary Sarcocystis falcatula-like infection in three Victoria crowned pigeons (Goura victoria) housed indoors.* J Zoo Wildl Med 2001; 32(2): 252-256. [http://dx.doi.org/10.1638/1042-7260\(2001\)032\[0252:APSFLI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1638/1042-7260(2001)032[0252:APSFLI]2.0.CO;2).
17. Olias P, Maier K, Wunschmann A, Reed L, Armién AG, Shaw DP, et al. *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columbia livia f. dom.*). Vet Parasitol 2014; 200(1-2): 59-65.
18. Hodo CL, Whitley DB, Hamer SA, Corapi WV, Snowden K, Heatley JJ, et al. *Histopathologic and molecular characterization of Sarcocystis calchasi encephalitis in white-winged doves (Zenaida asiatica) and Eurasian collared doves (Streptopelia decaocto), East-central Texas, USA, 2010–13.* J Wildl Dis 2016; 52(2): 395-399.
19. Tillmann T, Kamino K, Mohr U. *Sarcocystis muris: a rare case in laboratory mice.* Hannover: Institut für Experimentelle Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover; [s.d.].
20. Smith DD, Frenkel JK. *Cockroaches as vectors of Sarcocystis muris and of other coccidia in the laboratory.* J Parasitol 1978; 64(2): 315-319.
21. Ruiz A, Frenkel JK. *Recognition of cyclic transmission of Sarcocystis muris by cats.* J Infect Dis 1976; 133(4): 409-418. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/133.4.409>.

22. Clubb SL, Frenkel JK. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. [s.l.]: [s.n.]; [s.d.]. PMID: 1738053.
23. Smith J, Hillyer EV, Clubb SL, Frenkel JK, Page CD, Dubey JP, et al. *Sarcocystis falcatula* causes severe disease in a vast diversity of avian species among Passeriformes, Psittaciformes, Columbiformes, Strigiformes, and Falconiformes and is commonly associated with outbreaks of acute pulmonary sarcocystosis in zoos. J Vet Diagn Invest 1990; 2(3): 223-234.
24. Dame JB, MacKay RJ, Yowell CA, Cutler TJ, Marsh AE, Greiner EC. The close relationship between *S. neurona* and *S. falcatula* demonstrated by sequence analysis of the 18S ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol 1995; 70(1-2): 99-112.
25. Fenger CK, Granstrom DE, Gajadhar AA, Williams NM, McCrillis SA, Stamper S, et al. Sequence analysis of the 18S ribosomal RNA gene differentiates *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. J Parasitol 1995; 81(4): 530-535.
26. Marsh AE, Barr BC, Lakritz J, Nordhausen R, Madigan JE, Conrad PA. Biological traits distinguishing *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. J Parasitol 1997; 83(5): 700-705.
27. Dubey JP, Lindsay DS. Biological characteristics of *Sarcocystis falcatula* and its differentiation from *Sarcocystis neurona*. J Parasitol 1999; 85(4): 800-804.

Figures



Figure 1.



Figure 2.

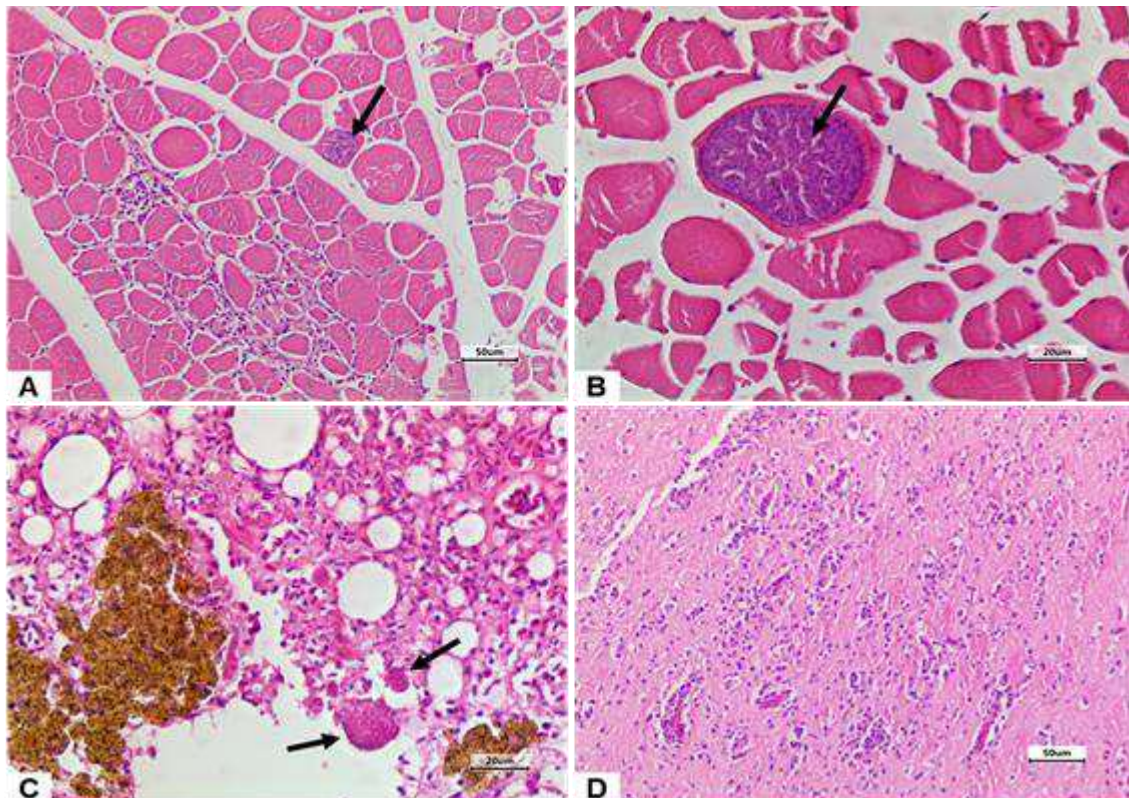


Figure 3 : Systemic sarcocystosis in a Anu-branco (*Guira guira*). A and B. Chronic myositis accompanied by intramyocytic cysts containing numerous bradyzoites (arrow) with morphology consistent with *Sarcocystis* spp. C. Pulmonary hemosiderosis accompanied by extracellular cysts (arrows). D. Increased number of glial cells (gliosis) with discrete inflammatory infiltrate composed of lymphocytes and plasma cells expanding the perivascular region.

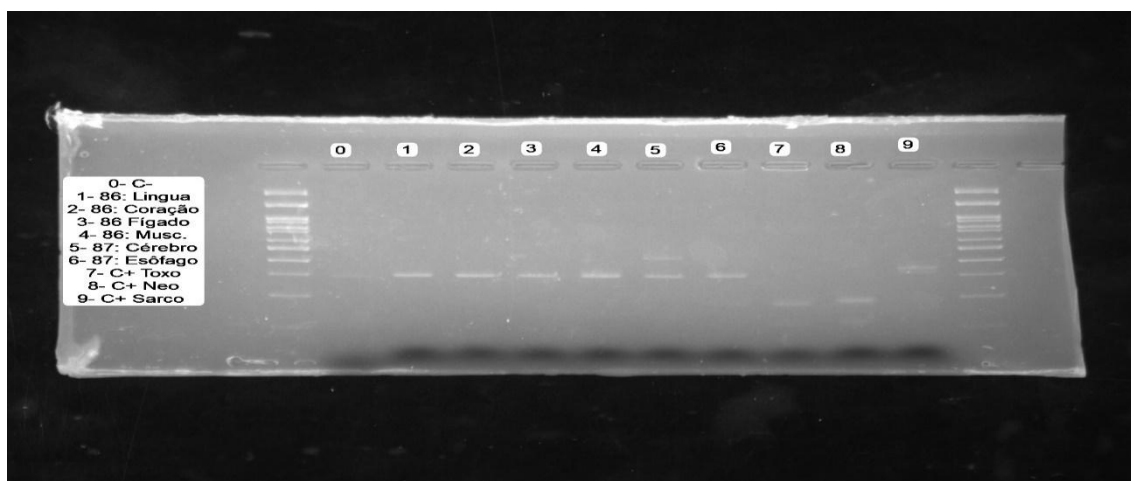


Figure 4 : Agarose gel of Anu-branco samples after RFLP for differentiation between *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.. In lanes 1 and 12, molecular weight of 100 bp is indicated. Arrows indicate expected height of 300 bp compatible with *Sarcocystis* spp.. DNA extracted from tongue, heart, liver and musculature of Animal 1 follow in lanes 3, 4, 5 and 6. In lanes 7 and 8, brain and esophagus of Animal 2. Positive controls of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. in lanes 9, 10 and 11, respectively. Negative control in lane 2.

7 ARTIGO 2

Detection of *Sarcocystis* spp. in opossums and coatis killed by roadkill in Paraná

¹*SILVA, D. A.; ²NAVOLAR, F. M. N.; ¹NAVARRO, I. T.; ¹GARCIA, J. L.; ¹BARROS, L. D.; ²BRACARENSE, A. P. F. R. L.

¹ Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, PR, Brasil.

² Laboratório de Anatomia Patológica, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, PR, Brasil.

*E-mail: apsilva.douglas@gmail.com

Abstract: Increasing urbanization has intensified the proximity of wildlife to urban environments. Among the easily adaptable wild species that are frequently found in urban areas are coatis (*Nasua nasua*) and opossums (*Didelphis albiventris*). Infection by *Sarcocystis* spp. has been reported in several animals and may facilitate its dissemination. In this context, the objective of this study is to detect the presence of *Sarcocystis* spp. in coatis and opossums that were run over by molecular diagnosis and anatomopathological findings. Between 2020 and 2022, carcasses of run-over animals were subjected to autopsy. Organ fragments were collected for histological and molecular evaluation. For histology, the fragments were fixed, processed according to routine and the sections stained with hematoxylin-eosin. For molecular detection of *Sarcocystis* spp. tissue extraction was performed and DNA detection was performed by nested PCR using primers from the 18s rRNA target region. The n-PCR products were subjected to cleavage with the restriction enzymes DdeI, HPY188III and MspI. From the evaluation of 23 animals, there was amplification in the n-PCR in ten and in four the cleavage was compatible with the target DNA studied. After sequencing the samples, three showed similarities to *Sarcocystis* spp. The results identified the presence of the DNA of the studied agent in the animals run over in the study region. Understanding the relationship between urbanization, environmental changes and the impacts on the ecology of wildlife is increasingly important and its study is challenging. The use of carcasses of run over animals is an alternative for research, bringing greater attention to the problem. In view of this work, we reinforce the importance of using

complementary diagnostic methods and the research of pathogens in wild animals.

Keywords: Diagnosis. Environment. Protozoa. Roads. Synanthropic

Resumo: A crescente urbanização tem intensificado a aproximação da fauna silvestre com ambientes urbanos. Entre as espécies silvestres com facilidade de adaptação e que são frequentemente encontradas no meio urbano estão os quatis (*Nasua nasua*) e os gambás (*Didelphis albiventris*). A infecção por *Sarcocystis* spp. é relatada em diversos animais e pode facilitar a sua disseminação. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é detectar a presença de *Sarcocystis* spp. em quatis em gambás atropelados por diagnóstico molecular e achados anatomopatológicos. Entre 2020 e 2022, carcaças de animais atropelados foram submetidas a autópsia. Fragmentos de órgãos foram colhidos para avaliação histológica e molecular. Para a histologia, os fragmentos foram fixados, processados de acordo com a rotina e os cortes corados com hematoxilina-eosina. Para detecção molecular de *Sarcocystis* spp. realizou-se a extração tecidual e a detecção de DNA foi feita por nested-PCR utilizando primers da região alvo 18s rRNA. Os produtos da n-PCR foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição Ddel, HPY188III e MspI. A partir da avaliação de 23 animais, em dez houve amplificação na n-PCR e em quatro a clivagem foi compatível com DNA alvo pesquisado. Após sequenciamento das amostras, três apresentaram similaridade com *Sarcocystis* spp. Os resultados identificaram a presença do DNA do agente pesquisado nos animais atropelados da região do estudo. Entender a relação entre urbanização, alterações ambientais e os impactos na ecologia da vida silvestre é cada vez mais importante e seu estudo é desafiador. A utilização de carcaças de animais atropelados é uma alternativa de pesquisa, trazendo maior atenção ao problema. Diante deste trabalho, reforçamos a importância da utilização de métodos diagnósticos complementares e a pesquisa de patógenos em animais silvestres.

Palavras-chave: Diagnóstico. Estradas. Meio ambiente. Protozoários. Sinantrópicos.

Introdução

O estudo da fauna selvagem e dos agentes patológicos circulantes nesse meio é desafiador devido à dificuldade de obtenção de amostras e por questões éticas de

manejo animal. As modificações antropogênicas na natureza como a expansão metropolitana, construção de rodovias e avanço da agricultura e pecuária, ocasionam um desequilíbrio ecológico importante que altera a interação do ecossistema e sua biodiversidade (HASSEL et al., 2017; JONES et al., 2008; RICHINI-PEREIRA et al., 2010).

No Brasil, o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e o quati (*Nasua nasua*) estão entre as espécies que mais facilmente se adaptam ao meio urbano (BEZERRA-SANTOS, et al. 2021.; RICHINI-PEREIRA et al., 2016). Essas espécies desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica de muitas doenças, incluindo zoonoses, uma vez que podem agir como reservatórios e carrear patógenos para populações urbanas e silvestres (BITENCOURT; BEZERRA, 2022.; MEHRKENS et al., 2013.; ZITELLI et al. 2021.; FORNAZARI et al., 2018).

O gênero *Sarcocystis* necessita de dois hospedeiros para completar o ciclo, de vida. Ele se desenvolve em musculatura de hospedeiros intermediários, enquanto a multiplicação ocorre no intestino de hospedeiros definitivos, que incluem aves de rapina ou carnívoros selvagens (DUBEY et al., 2015; FAYER et al., 2015). Quatis e gambás desempenham um papel relevante na disseminação de *Sarcocystis* spp., sendo a espécie *S. neurona* a mais conhecida por causar uma doença neurológica grave em equinos. Essa espécie já foi isolada de gambás no Brasil (DUBEY et al., 2001., GONDIM et al., 2017).

Embora a infecção por *Sarcocystis* em quatis e gambás seja geralmente assintomática, casos de doença fatal podem ocorrer, resultando em miocardite e encefalite (DUBEY et al., 2017.; HAMIR & DUBEY, 2001, WENDTE et al., 2010). Além disso, é importante frisar que esses animais podem atuar como reservatórios do parasita, aumentando o risco de transmissão para outros animais (FAYER et al., 2015).

Diante disso, este trabalho tem como objetivo detectar a presença de *Sarcocystis* spp. em animais silvestres atropelados na região sul do Brasil, contribuindo para o entendimento da cadeia epidemiológica do protozoário e sua circulação em ambientes impactados pela ação humana.

Material e métodos

Comitê de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 20/10/2020 sob o protocolo CEUA n° 038.2020 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) em 08.10.2020 sob número 75997-1.

Área do estudo

Entre os anos de 2020 à 2022 carcaças de gambás e quatis atropelados foram coletadas em cinco cidades da região Norte do Estado do Paraná. A avaliação do estado de decomposição da carcaça foi feita de acordo com Pugliares et al. (2007). Neste estudo foram utilizadas carcaças em condição de conservação fresca a moderadamente preservadas.

Avaliação macroscópica e microscópica

As carcaças foram submetidas a exame *post mortem* padrão. Fragmentos de cérebro, língua, masseter, coração, pulmão, fígado e baço foram colhidos e armazenados para posterior extração do material genético. Fragmentos dos mesmos órgãos também foram fixados por imersão em solução de formalina tamponada a 10 % e processadas para avaliação histopatológica. Os fragmentos foram submetidos ao processo de rotina histológica padrão. Os cortes com 5 µm de espessura foram corados pelo método de hematoxilina e eosina.

Análise molecular

A extração de DNA foi realizada com o protocolo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, conforme descrito anteriormente (12). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C até a análise molecular.

A amplificação do gene do RNA ribossômico 18s (RNA 18s) foi realizada para a detecção molecular de DNA de *Sarcocystis* e outros apicomplexos (13). A nested-PCR foi realizada utilizando 25 mM dos primers externos Tg18s48F e Tg18s359R e 50 mM dos primers internos Tg18s58F e Tg18s348. O tamanho esperado dos amplicons foi de 290 pares de bases (pb) para *S. neurona*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi* e *Toxoplasma gondii* e 310 pb para outras espécies de *Sarcocystis*.

Em seguida, foi realizada a digestão enzimática utilizando as enzimas Ddel,

HPY188III e MspI para analisar o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RLFP) e diferenciar as espécies *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis*. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Detecção de *Sarcocystis* spp.

Para detecção de DNA de organismos da família Sarcocystidae foi realizado nested PCR utilizando par de primers que amplifica uma região do gene 18s ribossomal (18S rRNA). Os primers externos e internos e suas respectivas alturas de amplificação de banda estão na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados e tamanho de produto amplificado esperado.

Gene alvo	Primers	Tamanho produto (pb)	Referência
Primary Apicomplexa 18s	Tg18s48F- FW: 5'CCA EiTGCATGTCTAAGTATAAGC3' Tg18s359R - RV: 5' 5'GTTACCCGTCAC TGCCAC3'	290	Da Silva et al. (2009)
Secondary Apicomplexa 18s	Tg18s58F - FW: 5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3'	310	
	Tg18s348R - RV: 5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3'		

Foi realizada PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) para diferenciação entre *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp., utilizando as enzimas de restrição DdeI, HPY188III e MspI. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com syBR safe DNA (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Sequenciamento Sanger

As amostras foram sequenciadas por Sequenciamento automático de eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) em kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio de acordo com protocolo sugerido

pelo fabricante. As amostras foram avaliadas em gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye 0,03% (v/v) e visualizado sob luz UV.

As sequências obtidas foram examinadas quanto à qualidade usando o software PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>). As sequências de consenso foram determinadas usando o software CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>). A identidade da sequência e informações sobre espécie foram obtidos por comparação com todas as sequências depositadas no GenBank usando o software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Resultados

Foram analisados um total de 23 animais, sendo 16 gambás e sete quatis. Entre os gambás, oito animais eram fêmeas e cinco eram machos, com o restante sem definição de sexo, com 13 animais adultos e três jovens. Dos quatis, quatro eram fêmeas, dois machos e um animal não houve identificação de sexo, sendo cinco adultos e dois jovens (Tabela 2).

Exame macroscópico e microscópico

Todos os animais apresentaram macroscopicamente lesões decorrentes do traumatismo. Os achados mais frequentes foram fraturas cominutivas de maxilar, mandíbula e ossos cranianos (Figura 1) acompanhadas de hemorragia do subcutâneo e musculatura adjacente. Lacerações pulmonares, hepáticas e esplênicas com hemorragias difusas e multifocais também foram frequentes (Figura 2).

Figura 1. Autópsia de quati atropelado com lesão em maxilar.



Figura 2. Rupturas hepáticas de quati atropelado.



Ao exame microscópico, os principais achados foram alterações circulatórias como hemorragia, congestão e edema. Os principais órgãos afetados foram pulmões, fígado, rins e sistema nervoso central. Adicionalmente, constatou-se processos inflamatórios predominantemente no sistema digestório associados a parasitas. Pneumonia intersticial foi um achado frequente variando de discreta a moderada intensidade em ambas as espécies.

Cistos de *Sarcocystis* spp. não foram observados nas amostras avaliadas.

Análise molecular

Dos 16 gambás, sete amostras teciduais apresentaram amplificação de DNA em coração, fígado, cérebro, língua, masseter e diafragma (Tabela 2). Em amostras de três dos sete quatis analisados houve amplificação de DNA no tecido cerebral, coração e diafragma (Tabela 3).

Tabela 2. Dados dos gambás analisados e resultados da reação da cadeia da polimerase para detecção do DNA de organismos da família Sarcocystidae por Nested-PCR com amplificação da região do gene 18S ribossomal (18S rRNA), sexo, estágio de vida, localização dos animais e os órgãos utilizados. Nas amostras 14, 46, 62 não foi possível a identificação de sexo do animal.

Código amostra	Sexo	Estágio	Localização	Órgãos	Amplificação
14	X	Jovem	23°28'41"S 51°7'56"W	Cérebro/Coração/Masseter/Pulmão/ Fígado/Diafragma	Positivo Coração Fígado
46	X	Adulto	23°19'16.32"S 51°12'33.444"W	Cérebro	Negativo
50	F	Adulto	23°21'8.212"S 51°11'29.656"W	Pulmão/Coração/Fígado	Positivo Coração
59	M	Adulto	23°19'38.294"S 51°12'20.905"W	Fígado	Negativo
62	X	Adulto	Sem localização	Cérebro/Fígado/Pulmão	Negativo
64	M	Jovem	23°21'14.5"S 51°11'31.3"W	Cérebro/Fígado/Coração	Negativo
68	M	Adulto	23°19'36.379"S 51°12'47.275"W	Coração/Masseter/Cérebro/Pulmão/ Fígado	Negativo
78	F	Jovem	23°19'40,95408'' S 51°12'0,072'W	Esôfago/Estômago/Pulmão/Coração Fígado/Masseter/Língua	Negativo
82	F	Adulto	23°21'42.4"S 51°11'56.2"W	Língua/Fígado/Cérebro/Diafragma/ Coração/Masseter/Pulmão	Negativo
83	F	Adulto	Sem localização	Coração/Língua	Positivo Coração
85	F	Adulto	23°29'0.67 "S 51°27'8.72 "W	Cérebro/Língua/Coração	Positivo Cérebro/Língua/ Coração
93	M	Adulto	23°19'02.9"S 51°11'49.0"W	Fígado/Pulmão/Estômago/Coração/ Língua	Positivo Coração

94	F	Adulto	Sem localização	Masseter/Língua/Coração/Traqueia/ Cérebro/Estômago/Diafragma/Pulmão	—
95	F	Adulto	-23.345 86 "S -51 13607 "W	Cérebro/Traqueia/Masseter/Diafragma Língua	Positivo Cérebro/Masseter Diafragma
97	F	Adulto	-23.32557 "S -5119764 "W	Coração/Pulmão/Masseter/Fígado/ Língua	Negativo
100	M	Adulto	-23.32070"S -5119400"W	Língua/Esôfago/Pulmão/Coração/ Masseter/	Positivo Masseter

Tabela 3. Dados dos quatis analisados e resultados da reação da cadeia da polimerase para detecção do DNA de organismos da família Sarcocystidae por Nested-PCR com amplificação da região do gene 18s ribossomal (18S rRNA), sexo, estágio de vida, localização dos animais e os órgãos utilizados. Não houve identificação do sexo do animal na amostra 45.

Código amostra	Sexo	Estágio	Localização	Órgãos	Amplificação
6	F	Adulto	23°29'36"S 51°7'55"W	Cérebro/Masseter/Coração/ Fígado	Negativo
45	X	Adulto	23°25'39,444"S 51°8'24,204"W	Fígado	Negativo
56	F	Adulto	23°21'19.055"N 51°11'36.265"E	Fígado/Diafragma/Coração/ Cérebro	Negativo
60	F	Adulto	23°45'31.154"S 51°8'19.558"W	Coração	Positivo Coração
66	M	Jovem	Sem localização	Fígado	Negativo
69	F	Jovem	23°21'19.055"S 51°11'36.265"W	Cérebro/Coração	Positivo Cérebro
91	M	Adulto	23°18'24.9"S 51°10'49.5"W	Pulmão/Diafragma/Traqueia /Estômago/ Cérebro/Coração/Língua	Positivo Diafragma

Houve amplificação por RFLP em amostras de quatro animais (Tabela 4) e posterior sequenciamento. Os trechos onde esses animais foram encontrados são visualizados na Figura 3.

Tabela 4. Identificação dos animais e amostras amplificadas na técnica RFPL utilizando as enzimas de restrição Ddel, HPY188III e MspI.

Código amostra	Nome científico	Nome Popular	Órgão
14	<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelha-branca	Coração Fígado
50	<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelha-branca	Coração
60	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Coração
69	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Cérebro

Sequenciamento

Cinco amostras foram sequenciadas e três apresentaram similaridade com *Sarcocystis* spp (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação dos animais e amostras sequenciadas

Amostra	Descrição agente	PHRED > 100 bases quality > 20	Query cover	Percent identity	E-value
Quati 60 Coração	<i>Sarcocystis</i> sp	50 %	34%	80.20 %	1e-10
Quati 69 Cérebro	<i>Sarcocystis felis</i>	OK	100 %	97.67 %	5e-144
Gambá 50 Coração	<i>Isospora picoflavae</i>	OK	98%	95.29 %	2e-132
Gambá 14 Coração	<i>Sarcocystis falcatula</i>	OK	99%	97,67 %	1e-144
Gambá 14- Fígado	X	X	X	X	X

Discussão

Os achados desse estudo confirmam a presença de infecção por *Sarcocystis* em gambás (*Didelphis* spp.) e quatis (*Nasua nasua*), corroborando a hipótese de que esses mamíferos desempenham um papel significativo no ciclo de vida do protozoário. A identificação de cistos teciduais e a detecção molecular do gênero *Sarcocystis* em tecidos desses hospedeiros sugerem sua possível atuação como reservatórios ou hospedeiros intermediários na transmissão do parasito. No entanto, fatores limitantes, como a condição das carcaças e a viabilidade dos tecidos, devem ser considerados,

assim como a escolha criteriosa dos primers utilizados para triagem e sequenciamento das amostras.

A complexidade biológica do parasito e sua ampla gama de hospedeiros representam desafios para o estudo e a detecção de *Sarcocystis* spp. O uso de animais selvagens atropelados como fonte de amostras para detecção molecular tem se mostrado uma estratégia eficiente em conjunto com exames histopatológicos (Richini-Pereira et al., 2016; Teixeira et al., 2020).

A diversidade genética entre as espécies de *Sarcocystis* que infectam gambás no Brasil é considerável (Dubey et al., 2015). Estudos indicam uma elevada variação nos antígenos de superfície dessas espécies, sugerindo que a recombinação sexual pode desempenhar um papel relevante na diversificação do parasito (Gondim et al., 2017). Essa diversidade genética possui implicações significativas para a compreensão epidemiológica das infecções causadas por esses protozoários e para a análise filogenética (Gallo et al., 2017).

Os gambás são amplamente reconhecidos como hospedeiros intermediários de diversas espécies de *Sarcocystis*. Estudos prévios documentaram a presença do parasito em tecidos musculares e neurológicos desses animais no Brasil (Konradt et al., 2017). Diversas espécies foram identificadas, incluindo *S. neurona*, cujo isolamento a partir de *Didelphis albiventris* representou o primeiro registro dessa espécie no país (Dubey et al., 2001). Outras espécies, como *S. falcatula* e *S. speeri*, também foram detectadas em gambás brasileiros, sendo *S. falcatula* encontrada em *D. marsupialis* e *D. albiventris* (Gondim et al., 2017; Valadas et al., 2016).

Em um estudo conduzido por Balbino et al. (2022), amostras de animais atropelados na região próxima ao do nosso estudo, revelaram a presença de *Sarcocystis* spp. em um pica-pau (*Colaptes melanochloros*) e em um veado (*Mazama gouazoubira*), por meio do sequenciamento de amostras previamente triadas pela PCR do gene 18S rDNA. De forma semelhante, Ludwig et al. (2021) empregaram a técnica de PCR do 18S rDNA para identificar *Sarcocystis* em primatas da espécie *Alouatta guariba clamitans*.

O presente estudo utilizou triagem molecular com primers direcionados à região do gene 18S rDNA, que apresenta regiões altamente conservadas e está presente na maioria das espécies do gênero (Dubey et al., 2015; Ogedengbe et al., 2016). No entanto, dada a ampla diversidade genética observada, recomenda-se a aplicação de múltiplos marcadores moleculares para maior precisão na identificação. A região ITS-

1, por exemplo, tem sido amplamente utilizada na análise da prevalência de infecções por *S. neurona* em gambás, permitindo a distinção entre *S. neurona* e *S. falcatula*, além da identificação de novos hospedeiros intermediários. Métodos complementares, como a análise de padrões de restrição enzimática, têm sido empregados para aprimorar essa diferenciação (Marsh et al., 1999; Tanhauser et al., 1999). Gjerde et al. (2013, 2016) sugeriram o uso de primers direcionados à região COX1 para a detecção de espécies, especialmente em bovinos.

A detecção de *Sarcocystis* em quatis ainda é pouco explorada na literatura, tornando-se relevante o registro de infecção nessa espécie no Brasil. Considerando seu hábito alimentar onívoro e sua presença em ambientes urbanos e florestais, os quatis podem estar expostos ao parasito por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados com esporocistos eliminados por hospedeiros definitivos. Evidências sugerem que mamíferos onívoros e carniceiros apresentam maior suscetibilidade à infecção devido à ingestão de tecidos contaminados (Hoeve-Bakker et al., 2019).

O papel dos quatis no ciclo epidemiológico do parasito ainda não está completamente elucidado. Dubey et al. (2001) demonstraram infecção natural e experimental do agente em guaxinins, enquanto Kirkpatrick (1987) identificou estruturas compatíveis com sarcocistos de *S. neurona* em 50% dos animais analisados (26/52).

A infecção por *S. neurona* em guaxinins tem sido associada a casos de encefalite granulomatosa e miocardite não supurativa, com manifestações clínicas como letargia e fraqueza progressiva. No entanto, a encefalite nem sempre é identificada como a principal causa dos sinais clínicos, especialmente em animais de cativeiro e de vida livre, uma vez que coinfeções com outros agentes etiológicos são frequentes (Dubey et al., 2017; Hamir & Dubey, 2001; Kubiski et al., 2016; Nakamura et al., 2010).

A compreensão das interações entre urbanização, alterações ambientais e seus impactos na ecologia da fauna silvestre é fundamental para o avanço do conhecimento epidemiológico sobre agentes infecciosos emergentes e reemergentes. A crescente proximidade entre humanos e ecossistemas anteriormente pouco explorados, aliada à expansão urbana, favorece a adaptação de espécies sinantrópicas e sua consequente colonização. Nesse contexto, o monitoramento de fatores de risco associados a patógenos emergentes torna-se essencial (Hassel et al., 2017; Chaber et al., 2018).

A inter-relação entre ecologia e epidemiologia de doenças parasitárias destaca a importância da fauna silvestre na dinâmica de transmissão de patógenos, sendo um elemento crucial para a prevenção e controle dessas enfermidades (UNEP, 2020). Alterações no comportamento e na distribuição de animais selvagens podem influenciar significativamente a disseminação de doenças, a dinâmica epidemiológica e a emergência de variantes mais adaptadas e virulentas, potencialmente contribuindo para o fenômeno conhecido como "spillover" de doenças (Plowright et al., 2017; UNEP, 2017).

Conclusão

Nosso trabalho detectou a presença de *Sarcocystis* spp. em amostras teciduais de quatis e gambás por meio da avaliação molecular, comprovando a presença do agente na região. O uso das carcaças de animais atropelados é uma ferramenta de pesquisa e lança luz a diversos problemas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, Kristian G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, p. 450–452, 2020. DOI: [10.1038/s41591-020-0820-9](https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9).
- BALBINO, L. S. *et al.* Parasitas apicomplexas em cérebro de animais silvestres mortos em estradas do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 3, p. 1365–1372, 2022. DOI: 10.5433/1679-0359.2022v43n3p1365.
- BEZERRA-SANTOS, M. A. *et al.* *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. **Parasite Research**, v. 120, n. 12, p. 4091–4111, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07072-4.
- BITENCOURT, M. M.; BEZERRA, A. M. R. Infection agents of Didelphidae (Didelphimorphia) of Brazil: An underestimated matter in zoonoses research. **Mammalia**, v. 86, n. 2, p. 105–122, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/mammalia-2021-0134>.
- CERQUEIRA, R. C. *et al.* Potential movement corridors and high road-kill likelihood do not spatially coincide for felids in Brazil: implications for road mitigation. **Environmental Management**, v. 67, p. 412–423, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00267-020-01411-4>.
- CHABER, A. L. The era of human-induced diseases. **EcoHealth**, v. 15, p. 8–11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1299-9>
- CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1725, p. 20160167, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>.
- DUBEY, J. P. *et al.* *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with *sarcocysts*, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons.

Veterinary Parasitology, v. 100, n. 3-4, p. 117-129, 2001. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00500-3.

DUBEY, J. P. J. et al. **Sarcocystosis of Animals and Humans**. Boca Raton: CRC Press, 2015. DOI: 10.1201/b19184.

DUBEY, J. P. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1-2, p. 1-42, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.01.026.

DUBEY, J. P. et al. A typical fatal sarcocystosis associated with *Sarcocystis neurona* in a White-nosed coati (*Nasua narica molaris*). **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 80–84, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.003>.

FAYER, R.; ESPOSITO, D. H.; DUBEY, J. P. Human infections with *Sarcocystis* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 295-311, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14>.

FORNAZARI, F. et al. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205–212, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>

GALLO, S. S. M. et al. Identification of opossums *Didelphis aurita* (Wied-Neuweid, 1826) as a definitive host of *Sarcocystis falcatula*-like sporocysts. *Parasite Research*, v. 117, n. 1, p. 213-223, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5695-4>.

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle, and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 7, p. 579-591, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.02.004.

GJERDE, B.; VIKØREN, T.; HAMNES, I. S. Molecular identification of *Sarcocystis haliyeti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **International Journal for Parasitology**:

Parasites and Wildlife, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018. ISSN 2213-2244. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.12.001).

GONDIM, L. S. Q. et al. *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* in Brazilian opossums (*Didelphis* spp.): Molecular investigation and in vitro isolation of *Sarcocystis* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 192–198, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.002>.

HAMIR, A. N.; DUBEY, J. P. Myocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neurona* infection in raccoons (*Procyon lotor*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 335–340, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00400-3).

HAIDER, Najmul et al. COVID-19—Zoonosis or Emerging Infectious Disease? **Frontiers in Public Health**, v. 8, 26 nov. 2020. DOI [10.3389/fpubh.2020.596944](https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.596944).

HASSELL, James M.; et al. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 1, p. 55–67, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>.

HWANG, J.-W.; JO, Y.-S. Wildlife–vehicle collisions and mitigation: current status and factor analysis in South Korea. **Animals**, v. 14, n. 20, p. 3012, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani14203012>.

JONES, K.; et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990–993, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

KIRKPATRICK, C. E.; HAMIR, A. N.; DUBEY, J. P.; RUPPRECHT, C. E. *Sarcocystis* in muscles of raccoons (*Procyon lotor* L.). **Journal of Protozoology**, v. 34, n. 4, p. 445–447, 1987. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1987.tb03211.x.

KUBISKI, S. et al. Unusual necrotizing encephalitis in raccoons and skunks concurrently infected with canine distemper virus and *Sarcocystis* sp. **Veterinary Pathology**, v. 53, p. 674–676, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985815603430>.

LIGNON, J. S.; PINTO, D. M.; MONTEIRO, S. G.; et al. New records of endoparasites and ectoparasites in free-living road-killed wild animals in the Pampa biome, Southern Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 49, p. 10, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10569-9>.

LORUSSO, A.; et al. Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic: a veterinary perspective. **Veterinaria italiana**, v. 56, n. 1, p. 5–10, 2020. DOI [10.12834/Vetlt.2173.11599.1](https://doi.org/10.12834/Vetlt.2173.11599.1).

LUDWIG, A. et al. Molecular detection of Apicomplexa protozoa in tissues from *Alouatta guariba clamitans*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, e06717, 2021. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6717.

MARSH, A. E. et al. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 4, p. 750-757, 1999. DOI: 10.2307/3285758.

MEHRKENS, L. R. et al. White-nosed coatis (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *Trypanosoma cruzi* and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 4, p. 1014–1018, 2013. DOI: <https://doi.org/10.7589/2013-01-005>.

NAKAMURA, S. et al. Meningoencephalitis associated with *Sarcocystis* spp. in a free-living Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 384-386, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/S0021997510000034>

OGEDENGBE, M. E. et al. Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (*Sarcocystidae*; *Apicomplexa*) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia*. **Parasitology Open**, v. 2, p. e2, 2016. DOI: 10.1017/pao.2015.7.

OTRANTO, D.; STRUBE, C.; XIAO, L. Zoonotic parasites: the One Health challenge. **Parasitology Research**, v. 120, p. 4073-4074, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-

07221-9.

PLOWRIGHT, R. K. *et al.* Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, 2017. DOI [10.1038/nrmicro.2017.45](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45).

PUGLIARES, K. R. *et al.* **Marine mammal necropsy: an introductory guide for stranding responders and field biologists**. Woods Hole, MA: Woods Hole Oceanographic Institution, 2007. 133 p. (WHO Technical Report 2007-06). DOI: 10.1575/1912/1823.

RÜEGG, S. R. *et al.* A Blueprint to Evaluate One Health. **Frontiers in Public Health**, v. 5, 16 fev. 2017. DOI [10.1016/j.onehlt.2021.100325](https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100325).

RICHINI-PEREIRA, V. B. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 602-607, 2016. DOI: 10.1590/0037-8682-0270-2016.

RICHINI-PEREIRA, V. *et al.* Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 607-613, 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000400011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, R. C. *et al.* First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moule, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Journal of Veterinary Science**, v. 165, p. 332–336, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.016>.

TANHAUSER, S. M.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; *et al.* Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 221-228, abr. 1999. DOI: 10.2307/3285623.

TEIXEIRA, F. Z.; RYTWINSKI, T.; FAHRIG, L. Inference in road ecology research: what we know versus what we think we know. **Biological Letters**, v. 16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0140>.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; INTERNATIONAL LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE. **Preventing the next pandemic: zoonotic diseases and how to break the chain of transmission**. Nairobi: UNEP, 2020.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Frontiers 2017: emerging issues of environmental concern**. Nairobi: UNEP, 2017.

VALADAS, Samantha Y. O. B. et al. Diversity of *Sarcocystis* spp. shed by opossums in Brazil inferred with phylogenetic analysis of DNA coding ITS1, cytochrome B, and surface antigens. **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 71-78, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.02.008.

WOOLHOUSE, M. E. J.; TAYLOR, L. H.; HAYDON, D. T. Population biology of multihost pathogens. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1109-1112, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1059026>.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, p. 265-269, 2020: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.

ZITELLI, L. C. et al. Serological investigation of protozoan pathogens (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*) in opossums from southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100546>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do gênero *Sarcocystis* é um desafio devido à sua alta variabilidade genética, diversidade de animais hospedeiros e grande número de espécies. As análises moleculares são ferramentas essenciais para chegar ao diagnóstico definitivo e diferenciação de espécies. A escolha dos primers direcionados a espécie de *Sarcocystis* e hospedeiros é crucial na pesquisa. Os achados de histopatologia complementam a investigação e devem ser utilizados em conjunto.

A interação entre animais domésticos e sinantrópicos e animais tem sido observada em várias regiões e essa interação pode facilitar a transmissão de parasitas que oferecem riscos à saúde única.

A utilização de carcaças dos animais atropelados é uma alternativa que deve ser trabalhada podendo auxiliar na descoberta de possíveis patógenos circulantes.

São necessários estudos voltados à prevenção para manter o elo de equilíbrio entre saúde ambiental, humana e animal e pela urgência global de doenças emergentes e reemergentes.

É essencial que esse tipo de estudo seja feito de forma contínua, pois os objetivos e resultados são atingidos a médio e longo prazo.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – AUTORIZAÇÃO SISBIO. AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA NAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAL.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Eloiza Teles Caldart

Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinelas de Zoonoses

Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina

CPF: [REDACTED]

CNPJ: 78.640.489/0001-53

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Busca ativa dos animais mortos por atropelamento em rodovias	03/2021	08/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS	Coleta, identificação e necropsia	[REDACTED]	Brasileira
2	WILLIAN LUIZ DA CUNHA	Identificação da espécie	[REDACTED]	Brasileira
3	Italmir Teodorico Navarro	Gestão de pessoal	[REDACTED]	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0759970120201008

Página 1/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Eloiza Teles Caldart	CPF: _____
Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinela de Zoonoses	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige do pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0759970120201008

Página 2/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Eloiza Teles Caldart	CPF: [REDACTED]
Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinelas de Zoonoses	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Outras ressalvas

1	Considerando a pandemia de COVID-19, o CPB recomenda que as atividades de pesquisa com primatas e xenarfas, em vida livre ou cativo, dentro ou fora de UCs federais devem adotar as medidas recomendadas nos comunicados disponíveis nos links: https://www.icmbio.gov.br/cpb/index.php/component/content/article?id=0 https://www.icmbio.gov.br/cpb/index.php/component/content/article?id=24	CPB João Pessoa-PB
---	---	--------------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Rodovias	Sertãozinho-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Rodovias	Cambé-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Rodovias	Londrina-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Rodovias	Uraí-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
5	Rodovias	Mandaguari-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
6	Rodovias	Jaguapitã-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
7	Rodovias	Astorga-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
8	Rodovias	Prado Ferreira-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
9	Rodovias	Rolândia-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
10	Rodovias	Jataizinho-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
11	Rodovias	Ibiporã-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
12	Rodovias	Califórnia-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
13	Rodovias	Mauá da Serra-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
14	Rodovias	Primeiro de Maio-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
15	Rodovias	Maringá-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
16	Rodovias	Bela Vista do Paraíso-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
17	Rodovias	Cornélio Procopio-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
18	Rodovias	Sertãozinho-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
19	Rodovias	Alvorada do Sul-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
20	Rodovias	Tamarana-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0759970120201008

Página 3/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Eloiza Teles Caldart	CPF: [REDACTED]
Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinela de Zoonoses	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lagomorpha	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Marsupialia	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Felidae	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tamandua	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Squamata	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Xenarthra	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rodentia	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Perissodactyla	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphimorphia	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Procyonidae	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Mustelidae	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Artiodactyla	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Canidae	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Sapajus	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dasypus	-
17	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Penas, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Sêmen, Urina

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0759970120201008

Página 4/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Eloiza Teles Caldart	CPF: [REDACTED]
Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinela de Zoonoses	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Urina, Sangue, Secreção, Sêmen, Regurgitação/conteúdo estomacal
4	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sêmen, Pêlo, Sangue, Urina
5	Amostras biológicas (Répteis)	Ecdise, Ectoparasita, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Escama, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal, Secreção
6	Amostras biológicas (Xenarthra)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Secreção, Sêmen, Urina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Estadual de Londrina	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0759970120201008

Página 5/6

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Número: 75997-1	Data da Emissão: 08/10/2020 08:03:40	Data da Revalidação*: 08/10/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Eloiza Teles Caldart	CPF: [REDACTED]
Título do Projeto: Fauna Silvestre Atropelada em Rodovias Como Sentinelas de Zoonoses	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 6/6