

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Raquel Cristina Tostes

MALÁRIA EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS
MANTIDAS EM CATIVEIRO: DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR, E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA

Juiz de Fora

2013

Raquel Cristina Tostes

MALÁRIA EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS
MANTIDAS EM CATIVEIRO: DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR, E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Marta Tavares D'Agosto (Departamento de Zoologia/ UFJF)
Co-orientadores: Prof. Dr. Erik Daemon (Departamento de Zoologia/ UFJF)
Prof^a Dra. Usha Vashist (IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho)

Juiz de Fora
2013

Tostes, Raquel Cristina.

Malária em aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais mantidas em cativeiro: diagnóstico parasitológico e molecular, e caracterização bioquímica e histopatológica / Raquel Cristina Tostes. – 2013.

101 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento animal)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

1. Aves silvestres. 2. Microscopia. 3. Biologia molecular. I. Título.

CDU 639.12

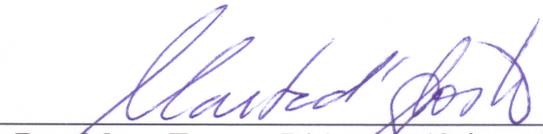
Raquel Cristina Tostes

MALÁRIA EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS
MANTIDAS EM CATIVEIRO: DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR, E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA

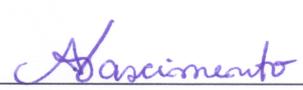
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dra. Marta Tavares D'Agosto (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof^ª. Dra. Aparecida Alves do Nascimento
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof^ª. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família que está ao meu lado me apoiando e incentivando em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, em primeiro lugar, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus queridos pais, **Edna e João**, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão **João** pela paciência.

Ao meu amigo, meu amor **Marcos**, por tudo. Por me apoiar nos momentos difíceis, quando eu quis desistir e por compartilhar os momentos felizes ao meu lado.

À professora **Marta D'Agosto**, pela confiança, e por sempre acreditar em meu potencial, dando apoio, incentivo e proporcionando grandes oportunidades.

À professora **Usha Vashist** pela imensa ajuda em todos os passos do mestrado.

Ao professor **Erik Daemon** pela ajuda.

Ao amigo **Roberto Dias** pela paciência, ajuda e incentivo durante a iniciação científica.

Aos amigos do laboratório de protozoologia **Alyssa Rossi, Bianca Sartini, Diego Marques, Franciane Cedrola, Luisa Oliveira, Mariana Rossi, Roberto Marchesini** por tudo, pela amizade, colaboração nas coletas e análises, apoio, conversas, risos e momentos de descontração.

Aos amigos **Ralph Maturano, Tatiane Souza e Fernanda Calmon** pelo apoio e ajuda nas coletas.

À professora **Christina Nogueira Castanõn** pela grande ajuda nas análises histopatológicas e ideias.

À professora **Kézia Scopel** pela ajuda nas análises e técnicas moleculares.

À professora **Priscila de Faria Pinto** pelo auxílio nas análises bioquímicas.

Ao colega **Gabriel Carvalho** pela imensa ajuda nas técnicas moleculares.

À **Rita Hasters e Rosângela**, pela amizade, carinho e bom-humor contagiantes!

A todos do IBAMA, principalmente ao **André** pelo apoio, ao **Dr. Rômulo** pela ajuda e ao **“Pinguim”** pela imensa ajuda nas coletas.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado e à CAPES/Programa Parasitologia Básica, pelo financiamento do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Desenho 1. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Plasmodium relictum</i>	20
Fotografia 1. Formas evolutivas de <i>Plasmodium</i> spp. encontradas nos esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, de aves silvestres mantidas no IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	45
Fotografia 2. Exemplar de microfilária observada nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa de aves da família Thraupidae, mantidas no IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	47
Fotografia 3. Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de amplificação das amostras de DNA por meio da amplificação do gene citocromo b de <i>Plasmodium</i> spp. por PCR.....	49
Fotografia 4. Exemplar de trofozoíto de <i>Plasmodium</i> sp. encontrado nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa da ave <i>Caracara plancus</i> eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	65
Fotografia 5. Cortes histológicos do fígado da ave <i>Caracara plancus</i> infectada por <i>Plasmodium</i> sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	67
Fotografia 6. Cortes histológicos do rim da ave <i>Caracara plancus</i> infectada por <i>Plasmodium</i> sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	69
Fotografia 7. Cortes histológicos do baço da ave <i>Caracara plancus</i> infectada por <i>Plasmodium</i> sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	71
Fotografia 8. Cortes histológicos do coração da ave <i>Asio stygius</i> infectada por <i>Plasmodium</i> sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais.....	73
Gráfico 1. Prevalência média para <i>Plasmodium</i> sp. encontrada nas análises microscópicas em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais e número de aves amostradas no presente estudo.....	48

Gráfico 2. Parasitemia média para <i>Plasmodium</i> sp. encontrada nas análises microscópicas em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais e número de aves amostradas no presente estudo.....	48
Gráfico 3. Atividade da alanina transaminase (ALT) e parasitemia de infecção por <i>Plasmodium</i> sp. em aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.....	75
Gráfico 4. Atividade da aspartato aminotransferase (AST) e parasitemia de infecção por <i>Plasmodium</i> sp. em aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.....	75
Gráfico 5. Concentrações de proteínas totais encontradas em aves silvestres infectadas por <i>Plasmodium</i> sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.....	76
Gráfico 6. Concentrações de albumina em aves silvestres infectadas por <i>Plasmodium</i> sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.....	76
Gráfico 7. Concentrações de uréia enzimática em aves silvestres infectadas por <i>Plasmodium</i> sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência e parasitemia de <i>Plasmodium</i> sp. encontradas nas análises microscópicas em espécies de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais amostradas no presente estudo.....	44
Tabela 2. Prevalência e parasitemia média para <i>Plasmodium</i> sp. em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica, mantidas em cativeiro, observadas em análise microscópica.....	47
Tabela 3. Prevalência de <i>Plasmodium</i> sp. encontradas nas análises moleculares em espécies de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais amostradas no presente estudo.....	50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
1. Malária aviária	13
1.1. Malária em aves silvestres brasileiras.....	15
1.2. Ciclo biológico.....	18
1.3. Gênero <i>Plasmodium</i>	20
1.4. Patologia e caracterização da malária.....	22
2. Técnicas de diagnóstico.....	25
2.1. Esfregaços sanguíneos.....	25
2.2. Biologia molecular.....	26
3. Análises bioquímicas.....	30
SEÇÃO I	34
INFECÇÃO MALÁRICA EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA MANTIDAS EM CATIVEIRO	34
RESUMO	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
1. Local de estudo.....	37
2. Análises microscópicas.....	37
3. Diagnóstico molecular.....	38
3.1. Extração de DNA.....	39
3.2. Amplificação do gene citocromo b.....	40
3.3. Eletroforese.....	40
RESULTADOS	42
1. Análises microscópicas	42

2. Diagnóstico molecular.....	49
DISCUSSÃO	51
SEÇÃO II	57
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DE AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA MANTIDAS EM CATIVEIRO INFECTADAS POR MALÁRIA.....	57
RESUMO	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
1. Local de coleta e aves estudadas.....	60
2. Análises de infecção.....	60
3. Análises histopatológicas.....	61
4. Análises bioquímicas	61
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO

A malária é uma das doenças mais comuns entre as aves e vem causando danos às espécies em todo o mundo, podendo em muitos casos ser fatal. Pode causar alterações fisiológicas em diferentes órgãos, as quais podem ser caracterizadas por análises bioquímicas e por análises histopatológicas. Assim, os objetivos do presente trabalho foram verificar a prevalência e parasitemia de parasitos maláricos em aves silvestres em cativeiro da Mata Atlântica em Minas Gerais e realizar a caracterização bioquímica sérica e histopatológica das aves infectadas. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 119 aves e feitos esfregaços sanguíneos para cálculo da prevalência e parasitemia. Foi utilizada ainda a biologia molecular para cálculo da prevalência, comparando os resultados à microscopia. Para as análises bioquímicas e histopatológicas foram utilizadas seis aves infectadas e eutanasiadas pelo IBAMA. A prevalência média nas análises microscópicas foi de 83,19% e a parasitemia de 1,51%, enquanto que na biologia molecular foi de 82,5%. Os cortes histológicos demonstraram alterações no fígado, rins, baço e coração, provavelmente secundárias à infecção malárica, destacando-se no fígado, baço e rins a presença de pigmentação acastanhada, sugestiva de pigmento malárico ou hemozoína. Os valores das análises bioquímicas, valores da enzima ALT e de proteínas totais foram aparentemente mais altos em aves com parasitemia maior, diferente dos valores da AST, que foram aparentemente normais. É necessário considerar que parâmetros bioquímicos podem ser alterados por fatores internos e externos, o que pode explicar a diferença dos valores das enzimas encontrados no presente estudo com valores para outras espécies relatados na literatura. Sugere-se estudos visando estabelecer valores de referência de análises bioquímicas, que podem ser utilizadas como ferramenta para caracterização da saúde das aves silvestres.

Palavras-chave: Aves silvestres. Malária aviária. Microscopia. Biologia molecular. Bioquímica sérica. Histopatologia.

ABSTRACT

Malaria is one of the most common diseases among birds and has caused damage to the species in all the world and can often be fatal. It can cause physiological changes, which can be characterized by biochemical and histopathological analysis. The aim of this study were to determine the prevalence and the parasitemias and malarial parasites in captive wild birds from Floresta Atlântica in Minas Gerais and to characterize serum biochemistry and histopathology of infected birds. For this, blood samples were collected from 119 birds, prepared blood smears for estimating the prevalence and the parasitemias. For biochemical analysis and histopathological features were analyzed six and infected birds. The mean prevalence in blood smears was 83.19% and mean parasitemia 1.51%, while in the molecular biology was 82,5%. Histological sections demonstrated alterations in liver, kidney, spleen and heart, probably by to malaria infection. In the liver, spleen and kidneys the presence of brownish pigmentation, suggestive of malarial pigment, the hemozoin. The values enzyme ALT and total proteins were apparently higher in birds with parasitemia greater than those of AST values that were apparently normal. You must consider that biochemical parameters can be changed by internal and external factors, which may explain the difference in the values of enzymes found in the present study with values for other species reported in the literature. It is suggested studies to establish reference values for biochemical analysis, which may be used as a tool to characterize the health of the birds.

Keywords: Wild birds. Avian malaria. Microscopy. Molecular biology. Serum biochemistry. Histopathology.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em relação à avifauna. Cerca de 2000 espécies de aves são conhecidas (CBRO, 2011), sendo que na Mata Atlântica podem ser encontradas mais de 600 espécies, das quais cerca de 160 são endêmicas (WWF, 2011).

Com o crescente comércio ilegal e risco de extinção de muitas espécies de aves silvestres brasileiras o estudo da presença de parasitos nas mesmas é de fundamental importância, já que esses podem influenciar em processos ecológicos, evolutivos e comportamentais de seus hospedeiros, incluindo modificações no voo, sucesso reprodutivo, migração e capacidades competitiva e de forrageamento (GARAMSZEGLI, 2005; MARINI & GARCIA, 2005; MARZAL *et al.*, 2005). Indivíduos parasitados podem ser mais susceptíveis à predação, sofrer redução na habilidade de estabelecer territórios, no consumo de alimentos e na massa corporal (ANDERSON & MAY, 1979; LAFERTY & MORRIS, 1996; MAKSIMOWICH & MATHIS, 2000; ATKINSON *et al.*, 2000).

Muito do que se sabe sobre hemoparasitos aviários no Brasil tem sido estudado em aves domésticas, sendo poucos os estudos que tem demonstrado o efeito desses parasitos em aves silvestres (SCHRADER, *et al.*, 2003), principalmente naquelas mantidas em cativeiro. Estudos tem mostrado que aves em cativeiro apresentam maior prevalência de infecção por parasitos do que outras aves (BELO *et al.*, 2009).

1. Malária aviária

A malária aviária foi diagnosticada pela primeira vez por Danilewsky, em 1885, quando observou o quadro clínico da doença. É causada por protozoários hemoparasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, da ordem Haemosporida.

O filo Apicomplexa agrupa protozoários sem organelas locomotoras e que possuem

um complexo apical característico, responsável pela penetração dos parasitos nas células hospedeiras (REMPLE, 2004). A ordem Haemosporida pode ser caracterizada por apresentar macrogametócitos e microgametócitos que se desenvolvem independentemente, zigoto móvel (ou oocineto), esporozoítos nús e ciclo biológico heteroxeno, onde a esquizogonia ocorre em um hospedeiro vertebrado e a gametogonia e esporogonia em um vetor invertebrado, geralmente artrópodes dípteros hematófagos (REMPLE, 2004).

Os gêneros que podem causar a malária aviária são *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Os quais, segundo VALKIÜNAS (2005), são classificados taxonomicamente como:

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)

Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família: Haemoproteidae

Gênero: *Haemoproteus* Kruse, 1890

Família: Plasmodiidae

Gênero: *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885

Família: Leucocytozoidae

Gênero: *Leucocytozoon* Berestneff, 1904

Estima-se que atualmente 206 espécies de hemosporídeos podem ser encontradas em aves de diferentes ordens. Esses protozoários apresentam ampla distribuição global, assim como seus vetores, insetos dípteros hematófagos, e já foram descritos parasitando diversos grupos de aves em praticamente todo mundo (VALKIÜNAS, 2005). Estudos relatando a prevalência de hemoparasitos em aves foram conduzidos na África (BEADELL *et al.*, 2009; LOISEAU *et al.*, 2010), Ásia (NAGATA, 2006) Europa (KRONE *et al.*, 2008), Américas do

Norte (JARVI, *et al.*, 2002; BARNARD *et al.*, 2010), Central (FALLON *et al.*, 2005) e do Sul (DURRANT *et al.*, 2006).

Segundo alguns autores, os plasmódios aviários tem causado extinção e declínio populacional de diversas espécies de aves em diferentes regiões do mundo (VAN RIPER *et al.*, 1986; ATKINSON *et al.*, 1995; 2000; MASSEY *et al.*, 1996). Outro aspecto que é destacado em alguns estudos é a importância de parasitos do gênero *Plasmodium* como fator de seleção de populações de aves, já que esses hemosporídeos podem influenciar na escolha de parceiros sexuais, no sucesso reprodutivo e na resposta imune dos hospedeiros (HAMILTON & ZUK, 1982; VAN RIPER III *et al.*, 1994; OPPLIGER *et al.*, 1996).

No trabalho realizado por RICKLEFS *et al.* (2005), os autores estudaram malária em 757 aves de 42 espécies em uma região de floresta no sul do Missouri, EUA, durante quatro anos, encontrando prevalência de 38,6% para os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Observaram ainda que a prevalência foi positivamente associada com a massa corporal do hospedeiro, mas não com o tipo de forrageamento, altura do ninho, tipo de ninho, brilho da plumagem ou dimorfismo sexual. Também não teve relação com o sexo das aves ou idade. Os autores acreditam que o número de linhagens de parasitos encontradas é próximo ao número de espécies de aves hospedeiras em um determinado local. No estudo foram encontradas 34 linhagens em 42 espécies de aves examinadas. A relação parasito-hospedeiro é complexa, pois estão envolvidos muitos fatores, incluindo o papel de parasitos na seleção sexual e a manutenção evolutiva do sexo, variando com a população e dinâmicas evolutivas.

1.1. Malária em aves silvestres brasileiras

No Brasil, apesar da grande biodiversidade, poucos estudos com aves silvestres foram realizados. BRAGA *et al.* (2011) fizeram uma revisão sobre a malária aviária no Brasil, destacando a importância de estudos para entendimento da relação parasito-hospedeiro por

sua relação filogenética com plasmódios humanos.

Um dos primeiros estudos realizados no Brasil foi o de BENNETT & LOPES (1980), onde os autores estudaram 3.449 aves de 195 espécies em três áreas no estado de São Paulo e encontraram prevalência de 1,8% para *Plasmodium* utilizando microscopia.

WOODWORTH-LYNAS *et al.* (1989), também utilizando análises microscópicas, estudaram 15.574 aves silvestres de 266 espécies também em três áreas do estado de São Paulo no sudeste do Brasil e encontraram prevalência de infecção de 7,5% para o gênero *Plasmodium*.

No estudo realizado por BELO *et al.* (2009) os autores analisaram a prevalência de malária entre 127 psitacídeos de 21 espécies viventes em zoológicos do Sudeste e do Nordeste e encontraram prevalência de 36% para o gênero *Plasmodium* na PCR, com baixas parasitemias. As espécies que apresentaram maior prevalência foram *Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758), *Ara ararauna* (Linnaeus, 1758) e *Amazona amazonica* (Linnaeus, 1766).

Outro trabalho realizado no Brasil foi o de BUENO *et al.* (2010), onde os autores verificaram a prevalência e parasitemia de malária entre pinguins de um zoológico localizado em São Paulo e encontraram prevalência de infecção por *Plasmodium relictum* (Grassi and Feletti, 1891) de 75% pela PCR e parasitemias que variaram de 0,4% a 11%.

Em LIMA *et al.* (2010) foram examinadas aves introduzidas da espécie *Passer domesticus* (Linnaeus, 1758), que são nativos da Europa e aves nativas brasileiras e encontraram que em aves nativas a prevalência de infecção por hemosporídeos foi maior que em aves introduzidas (34% e 6,1%, respectivamente encontrados na PCR). Os autores sugeriram que os resultados encontrados podem estar de acordo com a hipótese ERH (enemy release hypothesis), que sugere que o sucesso de espécies introduzidas pode ser devido à “fuga” de inimigos naturais, como patógenos e parasitos.

BELO *et al.* (2011) analisaram a influência de três diferentes habitats (ambiente intacto, alterado e em transição com a Floresta Amazônica) na prevalência de infecção por

hemosporídeos em 676 aves do cerrado do Brasil e não encontraram diferenças na prevalência de *Plasmodium* sp. e *Haemoproteus* sp. quanto ao tipo de ambiente (prevalência de 49% para um dos gêneros em ambas técnicas microscopia e PCR). Assim como no trabalho realizado por SEBAIO *et al.* (2010), que estudaram a influência do tamanho do fragmento e dependência do hábitat em 925 aves de 109 espécies de aves da Floresta Atlântica e não foram encontradas diferenças na prevalência por hemosporídeos utilizando microscopia. Entretanto prevalência de infecção por *Trypanosoma* sp. foi maior em aves dependentes de regiões de floresta.

Em outro estudo realizado por RIBEIRO *et al.* (2005), foi analisada a prevalência de hemoparasitos por PCR em 275 Passeriformes de pequenos e grandes fragmentos da Mata Atlântica em Minas Gerais, correlacionando ainda características biológicas e encontrou-se prevalência total para *Plasmodium* sp. de 39,6%. Aves de fragmentos maiores apresentaram prevalência maior do que aves de fragmentos menores (51,9% e 28,5%, respectivamente). E em aves insetívoras a prevalência foi maior do que em outros grupos, destacando a importância do estudo de características biológicas e comportamentais de aves, que podem estar diretamente relacionadas com a prevalência de parasitos.

Em LOBATO *et al.* (2011) os autores estudaram parâmetros hematológicos e parasitológicos em 31 aves da espécie *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 do cerrado brasileiro e encontraram prevalência para *Plasmodium* sp. de 58% (18 aves infectadas) utilizando microscopia e PCR. Observaram relação entre a presença do parasito e a diminuição de valores de CHGM (taxa de concentração de hemoglobina globular), que representa o volume ocupado pela hemoglobina em cada eritrócito. Esse índice é o mais exato na classificação de anemia, não necessitando de contagem de eritrócitos. Viram ainda que aves em período reprodutivo mostraram alterações em valores de hemoglobina e CHGM, sugerindo conexão com a saúde das aves e o estresse fisiológico associado à reprodução.

FECCHIO *et al.* (2007) também estudaram aves do cerrado brasileiro. Examinaram

508 aves de 26 espécies utilizando microscopia e encontraram 35 aves infectadas pelos gêneros *Plasmodium* sp. ou *Haemoproteus* sp. prevalência de 6,9%, sendo uma das menores já registradas para comunidades de aves silvestres na região Neotropical. Os autores não encontraram relação entre prevalência e estações seca e chuvosa e com período reprodutivo.

No trabalho de FECCHIO *et al.* (2011), onde também foram estudadas aves do cerrado do Brasil utilizando microscopia, foram analisados diferentes fatores que podem influenciar a acessibilidade de vetores e que podem influenciar a prevalência de infecção por hemoparasitos, como tamanho e tipo de ninho, massa corporal e socialização das aves. Destacaram que diferentes padrões de comportamento e reprodução podem influenciar na prevalência de alguns parasitos. Encontraram que aves que vivem em grupos e cooperam no cuidado parental apresentaram prevalência maior para *Haemoproteus* sp. e em aves com ninhos em cavidades ou lugares fechados apresentaram maior prevalência para *Plasmodium* sp.

1.2. Ciclo biológico

Segundo GARNHAM (1966), REMPLÉ (2004) e VALKIŪNAS (2005) o ciclo biológico geral dos hemosporídeos aviários pode ser descrito em três fases distintas, sendo que as fases exoritrocíticas e eritrocíticas ocorrem na ave e a fase esporogônica no mosquito transmissor (Desenho 1).

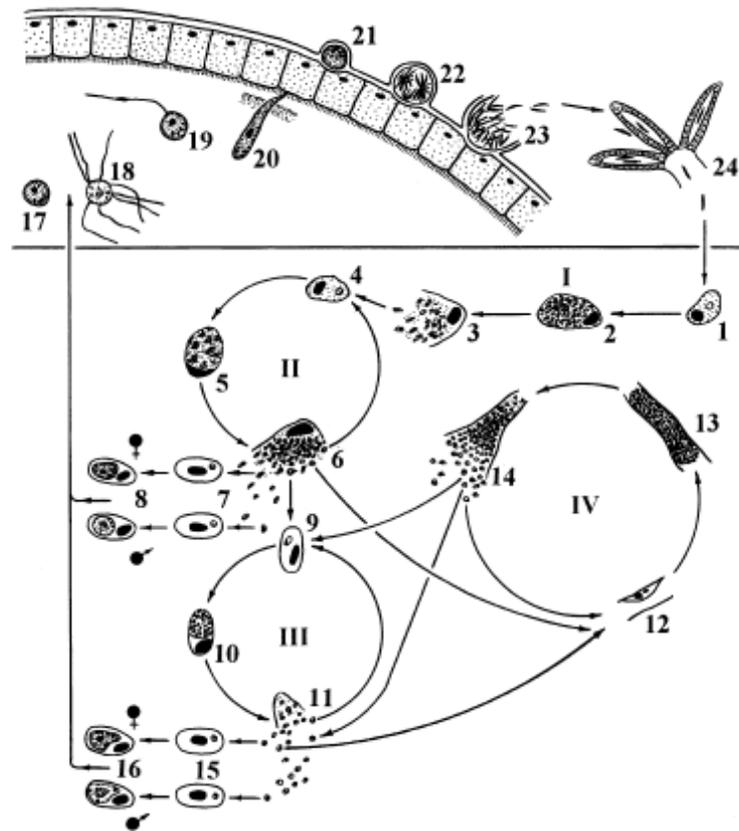
A fase exoeritrocítica inicia-se com a inoculação de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares dos mosquitos infectados, em aves durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos podem penetrar ou ser fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), originando nestas células por meio de esquizogonia a primeira geração de merozoítos. Estes são liberados por ruptura da célula e podem penetrar em outras células do SFM ou células endoteliais de vários órgãos como baço, fígado, cérebro, medula óssea e

outros, onde por meio de esquizogonias dão origem a novos merozoítos que penetram em hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico.

Na fase eritrocítica, os merozoítos que penetram em eritrócitos dividem-se assexuadamente por esquizogonia originando os esquizontes, os quais se rompem liberando outros merozoítos. Ao penetrar em outra célula, reiniciam seu desenvolvimento por meio de sucessivas esquizogonias ou diferenciam-se em formas sexuadas, denominadas gametócitos, os quais poderão ser ingeridos por mosquitos vetores. Essa fase é diferente entre os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, pois nos dois últimos gêneros a esquizogonia só ocorre nos órgãos e apenas gametócitos são encontrados nos eritrócitos.

Após a ingestão dos gametócitos pelos mosquitos hematófagos tem início a fase esporogônica. Os gametócitos se desenvolvem no estômago do mosquito após tornarem-se livres. Os microgametócitos produzem por exflagelação microgametas, que unem-se a macrogametas, produzidos a partir dos macrogametócitos, originando um zigoto, o qual se diferencia em uma forma móvel, denominada oocineto.

O oocineto ultrapassa a parede estomacal e encista-se na hemocele do mosquito, formando o oocisto esporulado. Por esquizogonia o oocisto produz grande número de esporozoítos e quando maduro se rompe liberando-os na hemocele. Por meio da hemolinfa os parasitos chegam à glândula salivar, onde permanecem até que o mosquito se alimente, inoculando os esporozoítos juntamente com a saliva.



Desenho 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*. Parte superior, no vetor; parte inferior, na ave: I,II - merogonia exo-eritrocítica primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 - esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoito em macrófago; 5, 6 - metacriptozoito; 7 - merozoítos no eritrócito; 8 - gametócitos; 9 - merozoito no eritrócito; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoito em célula endotelial de capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogameta; 18 - exflagelação de microgametas; 19 - fertilização de macrogameta; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrofica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos penetrando na glândula salivare do vetor (VALKIŪNAS, 2005).

1.3. Gênero *Plasmodium*

O gênero *Plasmodium* pode ser comumente encontrado em répteis, mamíferos e em

aves silvestres e domésticas. Pode ser transmitido por insetos dípteros hematófagos da família Culicidae. Em aves, atualmente, cerca de 40 espécies são descritas, as quais podem ser encontradas em diferentes espécies hospedeiras causando patogenicidade variada. As espécies do gênero apresentam ampla distribuição geográfica e distinguem-se de outros hemosporídeos pela presença de reprodução assexuada (merogonia) em eritrócitos na circulação sanguínea (ATKINSON *et al.*, 2008).

As espécies desse gênero produzem pigmentos que podem ser visualizados nos eritrócitos, denominados hemozoína. Os mesmos são resultantes do metabolismo da hemoglobina e podem auxiliar na identificação de espécies de parasitos quando realizada contagem, medida e localização desses pigmentos. Para identificação das espécies desse gênero ainda são usados fatores como a espécie da ave hospedeira, vetores e características de desenvolvimento de estágios exoeritrocíticos e eritrocíticos, como tamanho e forma de gametócitos, trofozoítos e esquizontes (ATKINSON *et al.*, 2008).

Segundo VALKIÜNAS (2005) e GARNHAM (1966), em aves, o gênero *Plasmodium* possui cinco subgêneros, que foram divididos com base em características morfológicas e biológicas de estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos. Os cinco subgêneros são: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Bennettinia*, *Huffia* e *Novyella*.

Em *Haemamoeba* a principal característica é a presença de gametócitos e esquizontes eritrocíticos grandes, que excedem o tamanho do núcleo do eritrócito infectado, com formas arredondadas e esquizogonia exo-eritrocítica no sistema fagocítico mononuclear. O subgênero *Giovannolaia* caracteriza-se por apresentar parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanhos moderados a grandes, podendo ultrapassar o tamanho do núcleo do eritrócito, e gametócitos alongados. A esquizogonia exo-eritrocítica também ocorre no sistema fagocítico mononuclear. O subgênero *Bennettinia* possui esquizontes pequenos e arredondados, com pouco citoplasma, ocupando posição próxima ao núcleo do eritrócito. Os gametócitos são pequenos e ovalados ou alongados, apresentava somente a espécie *Plasmodium juxtannucleare*,

entretanto alguns autores vem mostrando novas espécies como *P. lucens*, *P. multivacuolaris*, e *P. parahexamerium*, descritas no estudo de VALKIÜNAS *et al.* (2009-a). O subgênero *Huffia* pode ser diferenciado por apresentar esquizontes eritrocíticos pequenos, com dez ou menos merozoítos, gametócitos alongados, com esquizogonia exo-eritrocítica em células do sistema hematopoético. E em *Novyella*, os esquizontes são pequenos com no máximo oito merozoítos e os gametócitos são alongados e ainda nos estágios assexuados, o citoplasma é escasso (GARNHAM, 1966; VALKIÜNAS, 2005).

As infecções por *Plasmodium* spp. tem sido relatadas em aves de todas as ordens, com exceção de Struthioniformes, Coliiformes e Trogoniformes, entretanto poucos estudos ainda tem sido feitos. Estima-se que apenas metade de todas as espécies de aves foram estudadas à procura de hemoparasitos. A maior diversidade das espécies desse gênero é encontrada nas ordens Galliformes, Columbiformes e Passeriformes (VALKIÜNAS, 2005).

Entre as espécies do gênero, *P. relictum* tem sido relatada como uma das mais patogênicas, ocorrendo naturalmente em 70 famílias diferentes de aves (REMPLE, 2004; ATKINSON *et al.*, 2008; BUENO *et al.*, 2010).

1.4. Patologia e caracterização da malária

Em aves a malária pode se manifestar de diferentes modos, variando de assintomática a casos de óbito. Essa variação depende de fatores como as espécies de aves infectadas, virulência dos hemoparasitos, de variações em fatores ambientais, como a sazonalidade e fatores intrínsecos do hospedeiro, como a imunidade, idade, sexo e perfil nutricional (REMPLE, 2004, VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON, 2008).

Segundo VALKIÜNAS (2005) a patologia da malária é bem conhecida entre aves domésticas e de produção, podendo manifestar-se diferentemente em aves silvestres, devido ao processo de co-evolução. Em aves domésticas a malária pode se manifestar desde

infecções assintomáticas, passando por quadros de apatia, depressão, fraqueza, letargia, dispnéia, convulsões, febre, perda de peso, anemia, inapetência, diminuição do funcionamento de órgãos, hemorragia, distúrbios digestivos e neurológicos, paralisia e morte em alguns casos de alta parasitemia (GREINER & HARRISON, 1994; CAMPBELL, 1995; FOWLER & FOWLER, 2001; WILLIAMS, 2005; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; PEIRCE, 2008). O autor alerta ainda que em aves silvestres a malária não apresenta a mesma sintomatologia, sendo necessários mais estudos para o conhecimento da patologia nessas aves.

A gravidade da doença está diretamente relacionada com a parasitemia (GARNHAM, 1966). Segundo VALKIÜNAS (2005) a infecção malárica pode se apresentar em várias fases: pré-patente, onde os parasitos ainda estão se desenvolvendo fora da corrente sanguínea; aguda, caracterizada pelo aparecimento de parasitos na corrente sanguínea e pela crescente parasitemia, com aparecimento de sintomas clínicos; crise, onde a parasitemia atinge o pico; crônica ou latente, as quais apresentam queda nas taxas de parasitemia em consequência do desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro, apresentando pouco ou nenhum sinal de infecção. A fase crônica é a mais encontrada na maioria das espécies de aves, que podem permanecer infectadas por toda a vida. Infecções nessa fase são subclínicas, na maioria dos casos, podendo ocorrer recaídas periódicas em condições de estresse fisiológico e/ou ambiental, concomitantes com outras infecções e atividade hormonal (ATKINSON & VAN RIPER, 1991).

KILPATRICK *et al.* (2006) estudaram a relação da infecção crônica por *Plasmodium relictum* em aves da espécie *Hemignathus virens* (Gmelin, 1788) e sucesso reprodutivo em machos e fêmeas no Havaí. Os autores observaram que a malária não teve relação na redução do sucesso reprodutivo, que foi medido pelo tamanho da ninhada, sucesso de eclosão dos filhotes, peso e número de filhotes, o sucesso de nidificação (taxa de sobrevivência diária), e sobrevivência dos filhotes.

Uma das consequências mais graves da malária é a ocorrência de destruição de

hemácias e anemia, o que ocorre devido à remoção ativa de eritrócitos infectados da circulação pelas células do SFM no baço, fígado, medula óssea e outros órgãos. Anemia aguda acontece nos casos em que o processo de eritropoiese e liberação de eritroblastos na circulação não compensam a perda de hemácias (GARNHAM, 1966; VALKIÜNAS, 2005). Esse processo pode se acentuar com a alteração da composição química do plasma sanguíneo como a diminuição do pH e aumento da concentração de proteínas (SEED & MANWELL, 1977).

Quanto às alterações histopatológicas a malária pode causar comprometimento em diferentes órgãos. No fígado, as alterações ocorrem durante a fase eritrocítica do ciclo biológico do *Plasmodium*, causando hepatomegalia, podendo ocorrer acúmulo de eritrócitos parasitados nos sinusóides hepáticos, com fagocitose de parasitos e pigmento malárico (hemozoína) por células de Kupffer, causando hipertrofia e hiperplasia das mesmas, o que pode levar a retardo da circulação local, hipóxia, degeneração de hepatócitos e necrose centrolobular, além de congestão. O órgão pode apresentar coloração castanho-escura, devido à retenção de hemozoína nas células sinusoidais hepáticas e ainda infiltrados mononucleares. As trabéculas hepáticas podem apresentar desarranjo estrutural (BRASILEIRO-FILHO, 2011).

Nos rins há comprometimento de túbulos e glomérulos, com necrose tubular aguda e insuficiência renal, glomerulopatia, e ainda nefrite intersticial aguda e glomerulonefrite proliferativa aguda. Pode ocorrer ainda aumento da celularidade decorrente de acúmulo de macrófagos contendo hemozoína, alterações intersticiais com edema e infiltrado mononuclear (BRASILEIRO-FILHO, 2011).

O baço é um órgão importante durante a infecção malárica, pois é o principal local de retirada de eritrócitos alterados da circulação. Pode apresentar um aumento de seu volume, com aparência flácida, friável e sujeito à ruptura. A cápsula apresenta-se tensa, o parênquima é abundante, difluente, com coloração escura, devido a congestão e quantidade de hemozoína

retida. Apresenta hiperplasia de linfócitos na polpa branca e desorganização de sua estrutura normal. Na polpa vermelha, os macrófagos apresentam-se aumentados em número e tamanho, devido à intensa atividade fagocitária. Em alguns casos o baço pode apresentar hipotrofia da polpa branca, com folículos linfóides depletados ou transformados em blocos hialinos e na polpa vermelha pode haver hiperplasia de macrófagos, com neoformação conjuntiva. E ainda há acúmulo de hemozoína em macrófagos e trabéculas (BRASILEIRO-FILHO, 2011).

2. Técnicas de diagnóstico

2.1. Esfregaços sanguíneos

O método de diagnóstico por observação de esfregaços sanguíneos é utilizado na grande maioria dos estudos e busca quantificar, com estimativas de prevalência e intensidade de infecção, e identificar morfologicamente os estágios eritrocíticos dos hemoparasitos (trofozoítos, esquizontes e gametócitos). A detecção ocorre por observação de um determinado número de campos microscópicos e/ou determinado período de tempo, fornecendo uma estimativa do número de parasitos (VALKIÜNAS *et al.*, 2008). Entretanto durante as fases crônicas ou latentes de infecção, o que é encontrado na maioria das aves, a detecção de parasitos por meio dos esfregaços é mais complicada, já que nessas fases a parasitemia encontra-se reduzida na circulação.

A identificação por microscopia geralmente ocorre a partir de características morfológicas do parasito em um esfregaço de sangue periférico corado com colorações do tipo Romanowsky (Leishman e colorações Giemsa) (CAMPBELL, 1995; VALKIÜNAS, 2005). A detecção de *Plasmodium* sp. é baseada na presença de gametócitos intraeritrocíticos (pigmentados), trofozoítos e esquizontes. Em infecções em fase inicial, somente trofozoítos e esquizontes podem ocorrer nos eritrócitos, o que dificulta o diagnóstico específico. Entretanto

em infecções na fase crônica somente gametócitos podem estar presentes e em alguns casos, espécies com gametócitos grandes e alongados, podem ser facilmente confundidas com *Haemoproteus* sp. (CAMPBELL, 1995; PEIRCE, 2008).

Segundo VALKIÜNAS *et al.* (2008) os esfregaços podem oferecer vantagens sobre outros métodos, por ser uma técnica barata e que requer apenas material de rotina em laboratórios para sua preparação. Permite ainda a verificação da intensidade de infecção e a presença de co-infecções e pode ser base para identificação taxonômica morfológica das espécies de hemoparasitos. Contudo sua eficiência varia de acordo com a qualidade, tempo de observação e experiência do microscopista. Um bom esfregaço deve ser livre de poeira, umidade e calor, que podem danificá-lo; devem ser secos rapidamente após a confecção (cerca de 30 segundos), caso contrário pode haver mudanças na morfologia de gametócitos e assim interferir na identificação; a fixação deve ser correta com metanol absoluto; e a coloração deve ser feita logo após a preparação.

Uma limitação desse método de diagnóstico é a dificuldade de identificação de espécies, encontrada na maioria dos esfregaços, mesmo por especialistas experientes, podendo ser dificultada devido à baixa parasitemia que geralmente é observada em infecções por *Plasmodium* (VALKIÜNAS, 2005).

2.2. Biologia molecular

Nos últimos anos, ocorreram consideráveis avanços em estudos moleculares de hemoparasitos em aves, buscando desenvolver métodos de diagnóstico para detecção de infecções baseados na investigação do DNA do parasito, principalmente por ser um método mais rápido de diagnóstico, já que podem ser analisadas várias amostras ao mesmo tempo, e por conseguir detectar infecções de baixa prevalência, como infecções na fase crônica (JARVI *et al.*, 2002). Investigações moleculares vem adicionando à literatura aspectos importantes no

conhecimento a respeito da filogenia e especificidade de hospedeiros (RICKLEFS *et al.*, 2004; BENSCH *et al.*, 2007; KRONE *et al.*, 2008).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um desses métodos de diagnóstico, que utiliza a variação das sequências de DNA para detectar especificamente linhagens diferentes de parasitos.

Alguns estudos tem demonstrado que a PCR é mais sensível do que o exame microscópico de esfregaços sanguíneos para a detecção de parasitos no sangue de aves (JARVI *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005). Entretanto alguns autores recomendam a utilização da biologia molecular combinada com a observação microscópica de esfregaços sanguíneos, pois a análise microscópica permite a identificação de características morfológicas de diferentes estágios do ciclo biológico dos parasitos, o que é um parâmetro para identificação de hemoparasitos aviários (RIBEIRO *et al.*, 2005; VALKIŪNAS *et al.*, 2008; GARAMSZEGI, 2010).

VALKIŪNAS *et al.* (2006) mostraram que a microscopia ainda é uma ferramenta de extrema importância no diagnóstico de hemosporídeos, principalmente em infecções mistas, com mais de um gênero de parasito. O estudo realizado com 83 passeriformes com infecções simples por *Plasmodium* sp. ou *Haemoproteus* sp. mostrou que somente o diagnóstico por PCR, pode subestimar a ocorrência de infecções mistas por gêneros de parasitos hemosporídeos em aves naturalmente infectadas, recomendando-se a combinação de métodos de microscopia e PCR.

Outro estudo que mostra que a PCR pode subestimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* sp. foi o realizado por JARVI *et al.* (2002). Os autores compararam diagnósticos com esfregaços, técnicas moleculares e técnicas imunológicas e perceberam que o diagnóstico imunológico foi mais sensível do que os outros utilizados.

Diversos genes podem ser utilizados como alvos na PCR para identificação dos hemosporídeos, sendo que o gene codificador do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA), mais

especificamente da subunidade menor (SSU) e o ácido desoxirribonucléico mitocondrial (gene do citocromo b) são os mais utilizados, por serem estáveis e apresentarem regiões conservadas para construção de “primers” e com seções variáveis entre as regiões conservadas, sendo adequado para detecção e identificação de linhagens desses parasitos (LI *et al.*, 1995; BENSCH *et al.*, 2004; WALDENSTRÖM *et al.*, 2004).

No estudo realizado por RICHARD *et al.* (2002), os autores compararam quatro protocolos de PCR para detectar a presença de malária aviária no sangue de pássaros na África. Dois protocolos eram compostos por oligonucleotídeos para o citocromo b e os outros dois utilizam como alvo o gene 18SSU rRNA. Concluíram que o citocromo b mostrou ser mais confiável em relação ao gene ribossomal.

O primeiro estudo realizado por meio de PCR para hemosporídeos foi realizado por FELDMAN *et al.* (1995) com a finalidade de amplificar o DNA de *Plasmodium* de amostras de aves do Havaí. Os autores utilizaram oligonucleotídeos para amplificar o gene codificador do 18S rRNA. A PCR detectou maior prevalência em aves de regiões mais elevadas. A malária foi detectada em três espécies de pássaros nativos que vivem em regiões mais elevadas do Havaí e em quatro espécies de Maui.

BENSCH *et al.* (2000) desenvolveram um protocolo para detecção de dois gêneros de hemosporídeos na mesma reação (*Plasmodium* e *Haemoproteus*). Eles utilizaram sequência do gene citocromo b dos parasitos. Amplificaram amostras de 297 passeriformes de 12 espécies e encontraram 17 diferentes haplótipos mitocondriais de *Haemoproteus* sp. ou *Plasmodium* sp.

WALDENSTRÖM *et al.* (2004) publicaram um estudo propondo uma nova técnica de diagnóstico para *Plasmodium* e *Haemoproteus*, baseada em “Nested-PCR”, que consiste na realização de 2 amplificações do DNA alvo. Nesta pesquisa, os autores apresentaram uma nova abordagem de PCR, com base em uma técnica previamente publicada por BENSCH *et al.* (2000) e obtiveram desempenho significativamente melhor que o método descrito

anteriormente, com detecções superiores de infecções por *Plasmodium* spp.

HELLGREN *et al.* (2004), descreveram um protocolo de “Nested-PCR” para estudos simultâneos com *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. O protocolo modificado a partir do WALDENSTRÖM *et al.* (2004) envolve uma etapa de amplificação de DNA dos parasitos dos três gêneros. Então faz-se novo PCR com “primers” específicos para *Leucocytozoon* spp. isoladamente ou para *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. simultaneamente. Este método mostrou-se eficaz e confiável e fornece uma ferramenta importante para estudos simultâneos de espécies dos três gêneros. Esse protocolo vem sendo um dos mais utilizados na atualidade e foi modificado por BENSCH *et al.* (2009).

Vários autores tem descrito técnicas moleculares para estudos com hemoparasitos apicomplexos em aves. FALLON *et al.* (2003-b) descreveram uma técnica de PCR para detecção de infecções causadas por *Plasmodium* e *Haemoproteus*. O estudo utilizou “primers” para amplificar um fragmento do RNA ribossomal (rRNA) de 286-pb. Os autores sugeriram que a técnica baseada no rRNA é mais sensível que outros métodos de PCR, pois consegue detectar um mínimo de 1025 eritrócitos infectados.

SCHRENZEL *et al.* (2003), estudaram a malária em passeriformes em cativeiro utilizando técnicas de diagnóstico moleculares baseadas nos genes mitocondrial citocromo b e no RNA ribossômico (rRNA). Encontraram 7 aves infectadas por espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, entre as 28 aves estudadas. O estudo contribuiu para conhecimento de dados genéticos sobre hematozoários de passeriformes.

No trabalho realizado por RICKLEFS *et al.* (2005), os autores estudaram malária em 757 aves de 42 espécies em uma região de floresta no sul do Missouri, EUA, durante quatro anos. A prevalência encontrada foi de 38,6%, utilizando como método de diagnóstico a PCR. E em RICKLEFS & SHELDON (2007), os autores compararam a prevalência de infecção por hemosporídeos em diferentes regiões utilizando a PCR e encontraram prevalências de 41% no Panamá, 57% em Missouri e 63% em Michigan.

Apesar da PCR ainda apresentar algumas falhas, como a eficiência que pode variar dependendo do método utilizado na extração do DNA e que os produtos de cada etapa podem facilmente sofrer contaminação e comprometer os resultados encontrados, essa técnica pode ser considerada um grande avanço no diagnóstico da malária aviária, já que algumas desvantagens associadas à pesquisa do parasito por microscopia são amenizadas, pois a PCR é mais sensível, podendo se obter resultados mais rápidos (SINGH *et al.*, 1999; RICHARD *et al.*, 2002; WALDENSTRÖM *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005).

3. Análises bioquímicas

A determinação de parâmetros bioquímicos no sangue é uma ferramenta que pode auxiliar o diagnóstico de doenças metabólicas, definir o perfil nutricional de uma população homogênea e permitir uma avaliação clínica mais aprofundada de indivíduos. Entretanto, essa metodologia é pouco utilizada para estudos em aves silvestres, dificultando estudos comparativos em diferentes espécies e a interpretação de resultados obtidos (VALLE *et al.*, 2008; VASHIST *et al.*, 2011).

Para aves sugere-se a determinação de parâmetros de função renal como o ácido úrico; de indicadores do metabolismo protéico como as proteínas totais, uréia e albumina; indicador de glicemia e de estresse como a frutossamina; e indicadores de lesão hepática como GGT (gama glutamiltransferase) e as aminotransferases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina transaminase), as quais tem um importante papel na ligação entre o metabolismo dos aminoácidos e o de carboidratos, sendo um grupo de enzimas essenciais na via de glicogênese (PINHEIRO *et al.*, 2001; VALLE *et al.*, 2008; VASHIST *et al.*, 2011). A alteração nas atividades dessas enzimas pode refletir distúrbios hepatocelulares, e a sensibilidade e a especificidade das mesmas pode variar em função da espécie e do tipo de doença (HOCHLETHNER, 1994; CAMPBELL, 2006).

Altas atividades de ALT já foram observadas nas células do fígado, músculo esquelético, coração, cérebro e rins (LEWANDOWSKI *et al.*, 1986; CAMPBELL, 2006; LUMEIJ, 2008). A elevação da atividade dessa enzima acima de 275UI/L sugere injúria hepática ou muscular, apesar de falta de especificidade, sendo sua interpretação ainda mais dificultada pela variação interespecífica em sua distribuição nos tecidos das aves (MOTTA, 2011).

Níveis plasmáticos de ALT alterados podem estar relacionados com alterações patológicas em quase todos tecidos, principalmente em lesões graves no fígado e músculos (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2006). Na maioria das aves os valores normais de atividade dessa enzima variam de 19 a 50UI/L (MOTTA, 2011).

A análise de valores de proteínas totais plasmáticas (PPT) auxilia no diagnóstico de alterações gastrintestinais, hepáticas, renais ou de doenças infecciosas, podendo indicar ainda a causa de um quadro anêmico e a presença de processo inflamatório, sendo de grande importância na caracterização do estado da saúde de aves (HOCHLEITHNER, 1994; BARGER & GRINDEM, 2000; LUMEIJ, 2008). Em aves valores normais de PPT variam de 2,5 a 4,5 g/dL (THRALL *et al.*, 2004).

A albumina é sintetizada no fígado e pode ter seus valores alterados pela nutrição, balanço hormonal, estresse e doenças (THRALL *et al.*, 2004). Redução de seus valores no plasma geralmente está acompanhada de estados de má nutrição e enfermidades (KAWAI, 1973).

A mensuração da concentração sanguínea de uréia pode ajudar na avaliação da função renal. Pequenas quantidades deste metabólito já estão presentes no sangue das aves e sua concentração pode variar devido à ingestão de proteínas, taxa de excreção renal e condição hepática, sendo sensível indicador de azotemia pré-renal em algumas espécies, pois sua eliminação realizada pela filtração glomerular é dependente de estado de hidratação do animal. Assim o aumento de uréia pode indicar redução na perfusão arterial dos rins

(CAMPBELL, 2006; LUMEIJ, 2008).

Um dos primeiros estudos utilizando bioquímica sérica em aves silvestres foi o realizado por LUMEIJ & OVERDUIN (1990), onde os autores descreveram valores de referência para 17 variáveis do plasma em psitacídeos. Entre eles pode-se destacar os valores de referência do gênero *Amazona* para as enzimas AST (57-194 IU/L), ALT (19-98 IU/L), uréia (0,9-4,6 mmol/L), proteínas totais (33-50 g/L) e albumina (2,6-7 g/L).

SCHMIDT *et al.* (2007) estudaram a influência do sexo na variação de parâmetros bioquímicos plasmáticos na espécie *Phasianus colchicus* Linnaeus, 1758 em período reprodutivo e encontraram que em fêmeas adultas os valores de proteínas totais e albumina foram maiores. Já valores de uréia não variaram entre os sexos.

Outro estudo que avaliou a influência do sexo nesses parâmetros foi o realizado por VALLE *et al.* (2008), onde determinaram parâmetros de bioquímica sanguínea em araras canindé, *Ara ararauna* (Linnaeus, 1758), de sexo e faixa etária distintas mantidas em cativeiro, sendo analisados ácido úrico (AU), albumina (ALB), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), colesterol (Col), creatina quinase (CK), fosfatase alcalina (FA), fósforo inorgânico (Pi), frutosamina (Fru), gama glutamil transferase (GGT), proteínas totais (PT) e uréia (UR). Encontraram, entre as aves adultas, diferenças significativas nos valores de CK (superior nos machos), Ca e AU (superiores nas fêmeas). Entre aves adultas e filhotes foram constatadas diferenças significativas nos valores de AU, Ca, ALB, COL, FA, Pi e FRU. Os autores concluíram que a maioria das alterações detectadas podem estar relacionadas a diferenças na dieta fornecida e à condição fisiológica de cada categoria de aves.

Outro estudo foi o de MIRANDA *et al.* (2008), onde os autores utilizaram análises bioquímicas para verificação da variação do perfil de proteínas séricas, metabólitos, minerais e enzimas séricas, correlacionando com o sexo em avestruzes (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) e encontraram diferenças significativas para proteínas totais, globulinas, fosfatase alcalina, relação A:G e ácido úrico entre machos e fêmeas.

VASHIST *et al.* (2011), verificaram o perfil hepático em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 através de estudos histológicos e análises bioquímicas de enzimas aminotransferases (ALT e AST) e encontraram um aumento significativo na produção da enzima ALT nas aves infectadas, sendo considerada um bom parâmetro para tais estudos.

Portanto essa técnica pode ser uma ferramenta para uma caracterização mais aprofundada de infecções maláricas, auxiliando na análise clínica das aves, sendo necessários mais estudos para determinação de valores de referência.

SEÇÃO I

INFECÇÃO MALÁRICA EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA MANTIDAS EM CATIVEIRO

RESUMO

A malária pode ser causada por protozoários hemosporídeos do gênero *Plasmodium*, que vem causando extinção e declínio populacional de diversas espécies de aves no mundo todo; pode ainda reduzir o *fitness* de seus hospedeiros e atuar como forte força seletiva dentro de populações naturais. No Brasil, apesar da grande biodiversidade, poucos estudos tem sido feitos com aves silvestres, principalmente em cativeiro. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar prevalência e parasitemia de hemoparasitos de aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, mantidas em cativeiro, utilizando análises microscópicas e moleculares. Foram coletadas amostras de sangue de 119 aves, mantidas pelo IBAMA de Juiz de Fora, no período de um ano e feitos esfregaços sanguíneos e PCR para determinação da prevalência e densidade parasitária. A prevalência encontrada na microscopia foi de 83,19%, enquanto que na biologia molecular foi de 82,5%. A parasitemia média foi de 1,51%. Esses valores encontrados podem ser considerados altos quando comparados a outros estudos. Isso pode ter ocorrido devido às condições de cativeiro, que mantem as aves próximas, facilitando a transmissão desses parasitos e acesso de vetores. Os resultados de ambas as técnicas de diagnóstico foram similares, o que destaca a importância da combinação dos dois métodos.

Palavras-chave: Malária aviária. Aves silvestres. Biologia molecular. Microscopia.

INTRODUÇÃO

A malária pode ser causada por protozoários hemosporídeos do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885. Em aves, foi diagnosticada pela primeira vez por Danilewsky, em 1885, quando se observou o quadro clínico da doença. Esses protozoários apresentam ampla distribuição geográfica, assim como seus vetores, e já foram descritos parasitando diversos grupos de aves em praticamente todo mundo (GARNHAM, 1966; VALKIÜNAS, 2005).

Estudos relatando malária em aves silvestres já foram conduzidos na África (BEADELL *et al.*, 2009; LOISEAU *et al.*, 2010; KARAMBA *et al.*, 2012); Ásia (NAGATA, 2006; LIERZ *et al.*, 2008); Nova Zelândia (STURROCK & TOMPKINS, 2008; EWEN *et al.*, 2012); Europa (KRONE *et al.*, 2008; PALINAUSKAS *et al.*, 2011); Américas do Norte (JARVI, *et al.*, 2002; LACHISH *et al.*, 2011), Central (FALLON *et al.*, 2003-a; 2005) e do Sul (RIBEIRO *et al.*, 2005; DURRANT *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2010), demonstrando a extensa distribuição da infecção.

Alguns autores destacam que os plasmódios de aves tem causado a extinção e o declínio populacional de diversas espécies hospedeiras (VAN RIPER III *et al.*, 1986; ATKINSON *et al.*, 1995; 2000; MASSEY *et al.*, 1996). Além de reduzir o *fitness* de seus hospedeiros, pode ainda ser uma forte força seletiva dentro de populações naturais (LEFÈVRE *et al.*, 2008).

O Brasil possui um nível particularmente elevado de diversidade e riqueza de espécies de aves silvestres em comparação com outros países. Nas florestas brasileiras, algumas espécies de aves são consideradas prioridade para conservação por causa de seu alto grau de endemismo, ou o seu risco de extinção (BRAGA *et al.*, 2011). Apesar disso, poucos estudos tem sido realizados para avaliar a diversidade de hemoparasitos de espécies de aves silvestres, sejam elas nativas ou mantidas em cativeiro, ou mesmo para se verificar a influência do

parasitismo em ambientes alterados e intactos (BENNETT & LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS *et al.*, 1989; RIBEIRO *et al.*, 2005; FECCHIO *et al.*, 2007, 2011; BELO *et al.*, 2009, 2011; SEBAIO *et al.*, 2010).

A identificação de espécies de *Plasmodium* ocorre principalmente pela espécie de hospedeiro e por análises morfológicas de seus estágios eritrocíticos (gametócitos, merontes ou ambos) (GARNHAM, 1966; ELISEI *et al.*, 2001; VALKIUNAS, 2005), ou por meio de amplificação e sequenciamento de DNA dos hemoparasitos encontrados (RICKLEFS & FALLON, 2002; MARTINSEN *et al.*, 2006, 2008; HELLGREN *et al.*, 2004; WALDENSTRÖM *et al.*, 2004; BENSCH *et al.*, 2000, 2009).

Assim, os objetivos do presente estudo foram analisar prevalência da infecção e densidade parasitária para hemoparasitos de aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, mantidas em cativeiro, utilizando análises microscópicas e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local de estudo

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) foi criado em 1989, com a finalidade de integrar a gestão ambiental. O IBAMA tem como principais atribuições exercer o poder de polícia ambiental; executar ações das políticas nacionais de meio ambiente, referentes às atribuições federais, relativas ao licenciamento ambiental, ao controle da qualidade ambiental, à autorização de uso dos recursos naturais e à fiscalização, monitoramento e controle ambiental; e executar as ações supletivas de competência da União de conformidade com a legislação ambiental vigente (IBAMA, 2011).

O estudo foi realizado na sede do IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais, que se localiza na Avenida Prefeito Mello Reis, 1.500, bairro Aeroporto (23 K E 667368,991 N 7589073,595), onde são recebidas aves trazidas pela população ou apreendidas de cativeiros ilegais. Muitas dessas aves chegam machucadas, com asas e penas cortadas.

2. Análises microscópicas

Para observação dos hemoparasitos foram coletadas amostras de sangue de 119 aves, durante o período de um ano (julho de 2011 a julho de 2012), cujo volume de sangue retirado não ultrapassou 1% do peso vivo dos animais, segundo recomendação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). O volume de sangue que pode ser coletado de uma ave depende do seu peso e condição de saúde. Em aves saudáveis é possível se obter volume de sangue correspondente a, no máximo, 1% do seu peso corporal sem prejudicar a saúde do animal (CAMPBELL, 1995; SAMOUR & HOWLETT, 2008; CLARK

et al., 2009). Foi coletado volume médio de 50µL de sangue, utilizando-se seringas descartáveis para punção venosa nas asas.

Para cálculo da prevalência, parasitemia de infecção e para identificação e caracterização morfológica dos hemoparasitos encontrados foram feitos quatro esfregaços sanguíneos, no local de coleta. Estes foram secados ao ar e levados ao Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal – da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde foram fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos, secados ao ar e corados pelo Giemsa (Eosina e Azul de Metileno) por aproximadamente 40 minutos, na diluição de 1:9 em água destilada. Os esfregaços foram examinados sob lente de imersão em microscópio fotônico Olympus BX-51 (Aumento de 1000x).

Foi observado um esfregaço por ave, onde foram examinados 100 campos microscópicos. Em aves negativas foi observado mais um esfregaço para confirmação do resultado.

A prevalência foi calculada segundo MARGOLIS *et al.* (1982):

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de hospedeiros infectados}}{\text{n}^\circ \text{ de hospedeiros examinados}} \times 100$$

A parasitemia de cada ave foi calculada conforme proposto por SOUZA (1998):

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de eritrócitos parasitados}}{10000} \times 100 = \frac{\text{n}^\circ \text{ de eritrócitos parasitados}}{100}$$

3. Diagnóstico molecular

Foram coletadas amostras de sangue de 80 aves para realização de técnicas moleculares, das 119 amostradas. Esse número de aves foi devido à quantidade de sangue disponível e que pode ser retirado em cada ave, como recomendação do SISBIO. As amostras

de sangue obtidas foram utilizadas para diagnóstico e cálculo da prevalência de infecção para o gênero *Plasmodium* e para comparação com as análises microscópicas.

O sangue coletado foi armazenado em microtubos de 1,5 mL sem anticoagulante e colocado em gelo imediatamente após coleta e então armazenado a -20° C até o momento da extração de DNA.

3.1- Extração de DNA

Para extração de DNA as amostras de sangue foram descongeladas, sendo utilizados 100µL do sangue armazenado. Para isso foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega MA, EUA). Aos microtubos contendo 100µL de sangue, já descongelado, foram adicionados 900µL de solução de lise celular, invertidos por 5-6 vezes. A mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada em 13.000–16.000g por 20 segundos, descartando-se o sobrenadante, sem causar distúrbio ao *pellet* branco formado no fundo do tubo.

O tubo foi levado ao *vortex* para homogeneização por 10-15 segundos e, após esse procedimento, adicionados 300µL de solução de lise nuclear, 1,5µL de solução de Rnase, encubando-se a mistura a 37°C por 15 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína e os tubos foram levados ao *vortex* durante 10-20 segundos.

Os microtubos foram então centrifugados em 13.000-16.000g por 3 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente até o aparecimento de fitas brancas de DNA e centrifugados em 13.000-16.000g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 100µL de etanol 70% para lavagem e remoção de excesso de sal. Os tubos foram invertidos e novamente centrifugados a 13.000-16.000g por 1 minuto. O líquido presente no tubo foi descartado e secado em papel absorvente com o tubo invertido, foram adicionados 100µL de

solução de reidratação de DNA ao tubo já seco, que foi armazenado em temperatura de -20°C até o momento da amplificação.

3.2- Amplificação do gene citocromo b

Para amplificação do gene citocromo b (*cyt b*), por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados os iniciadores específicos para o gênero *Plasmodium*: PF (5'-GGA TTT GTG GTG GAT ATC TTG-3') e 4292Rw (5'-TGG AAC AAT ATG TAR AGG AGT-3') propostos por MARTÍNEZ *et al.* (2009). Esse iniciador amplifica regiões menores que 600 nucleotídeos.

A PCR consistiu em volume final de 25µL, onde foram utilizados 12,5 µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, MA, EUA), 1,64µL de cada oligonucleotídeo iniciador e 2µL de DNA total extraído armazenado em solução de reidratação. Para controle positivo foi utilizada amostra de DNA extraído de *Plasmodium juxtannucleare* obtido em estudo com infecção experimental em *Gallus gallus* e para controle negativo, água livre de nuclease que acompanha o kit Go Taq® Green Master Mix.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador TECHNE TC 412 (Analítica®) com o programa de amplificação: desnaturação em 94°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação em 95°C por 40 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e para extensão final 72°C por 10 minutos, segundo MERINO *et al.* (2008).

Foram realizadas repetições de cerca de 20% das amostras para garantir a reprodutibilidade da técnica.

3.3- Eletroforese

Todos os produtos amplificados gerados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®), sendo aplicados por canaleta do gel 25µL do produto da amplificação juntamente com 2,5µL de Blue Green Loading Dye I (LGC

Biotecnologia[®]), para visualização do DNA amplificado.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por aproximadamente três horas a 100 volts em fonte de alimentação de energia 'Power Pac Universal' para eletroforese e sistema de transferência (Biorad[®]), com tampão tris - EDTA - acetato, pH 8,0 (TAE – 1x) como fluido condutor de corrida. Na primeira canaleta de cada gel foram adicionados 10µL de padrão de peso molecular 100bp DNA Ladder de 100 a 1.500bp (Promega[®]) com 1µL de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia[®]).

Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta (U.V.) em fotodocumentador GE Healthcare[®].

O presente estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo protocolo n° 027/2011 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268.

RESULTADOS

1. Análises microscópicas

Dentre as 119 aves estudadas foram coletadas amostras de sangue de 14 famílias e 36 espécies (Tabela 1). Ao exame dos esfregaços em 99 aves foram registradas formas evolutivas de *Plasmodium* spp., registrando-se prevalência de 83,19% (Fotografia 1). A parasitemia média encontrada foi de 1,51% ($\pm 3,25$). As espécies com maior número de indivíduos amostrados foram *Saltator similis* (n=37) e *Aratinga leucophthalma* (n=20) (Tabela 1). No entanto, entre as aves a maior parasitemia média registrada foi na espécie *Caracara plancus* (3,49% $\pm 3,46$), seguida por *Saltator similis* (3,01% $\pm 5,04$) (Tabela 1).

Nos esfregaços examinados foram encontradas poucas formas evolutivas, sendo em sua maioria trofozoítos, impossibilitando a identificação específica de acordo com as características morfológicas de esquizontes e gametócitos. Podemos sugerir, entretanto, por algumas formas encontradas, que temos a presença provável de organismos dos subgêneros *Haemamoeba* e *Bennettinia*.

Foram encontradas também microfilárias em sete aves da família Thraupidae, apresentando prevalência de 5,88% (Fotografia 2). Além dos plasmódios, as microfilárias foram os únicos hemoparasitos encontrados nos hospedeiros observados.

Quanto à prevalência de *Plasmodium* spp. entre as famílias, em seis (Accipitridae, Columbidae, Picidae, Turdidae, Mimidae e Cardinalidae) foi registrada prevalência de infecção de 100%, entretanto essas foram as famílias com menor número de aves amostradas, variando de um a três (Tabela 2; Gráfico 1). A prevalência entre as demais famílias de aves examinadas foi a seguinte: Thraupidae (n=45) 88,8%; Psittacidae (n=36) 83,3%; Falconidae (n=8) 87,5%; e Ramphastidae (n=6) 83,3% (Tabela 2; Gráfico 1).

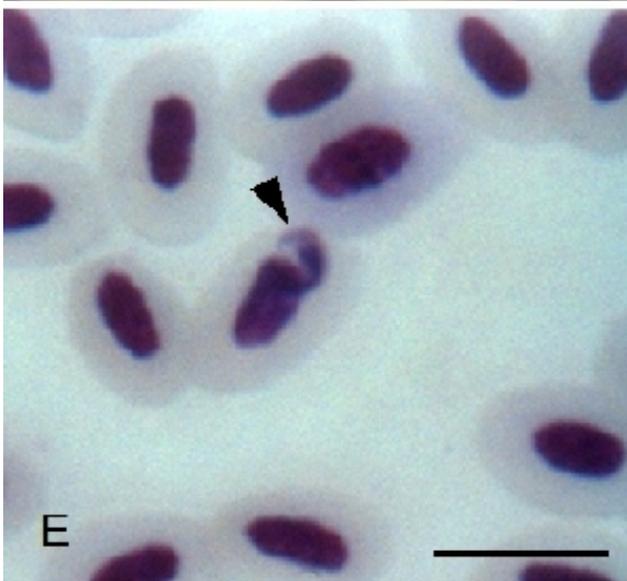
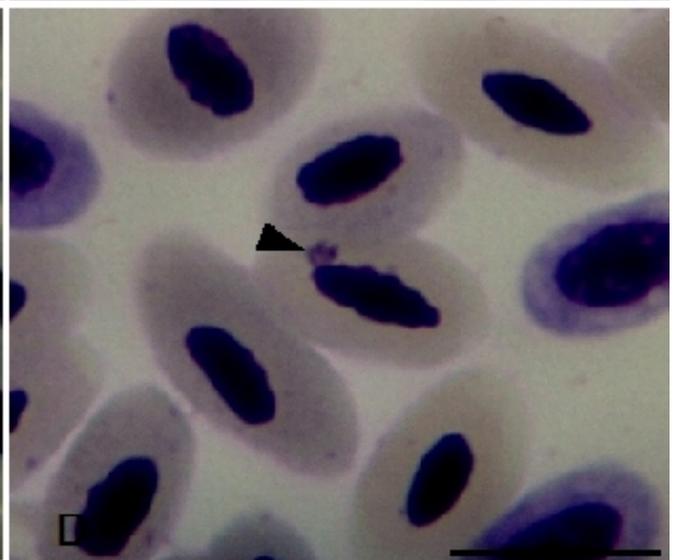
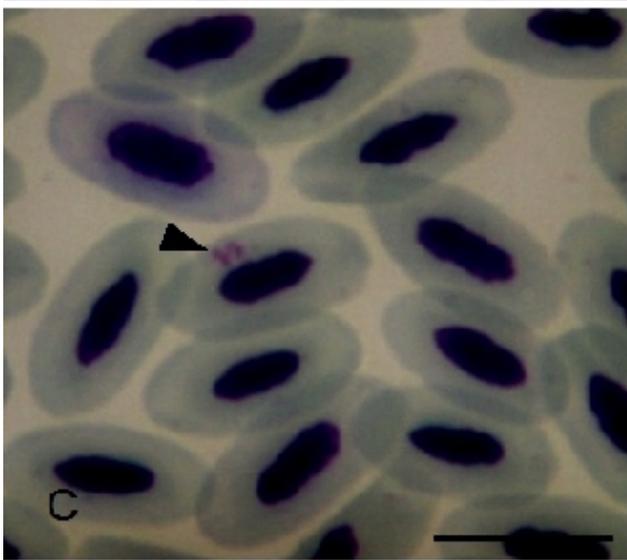
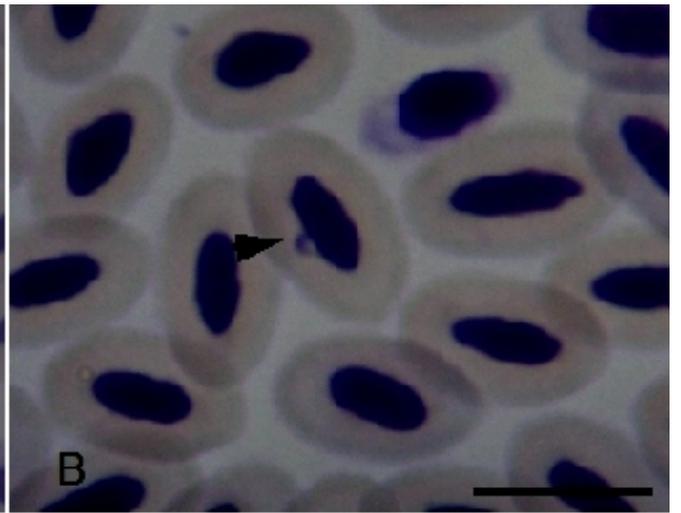
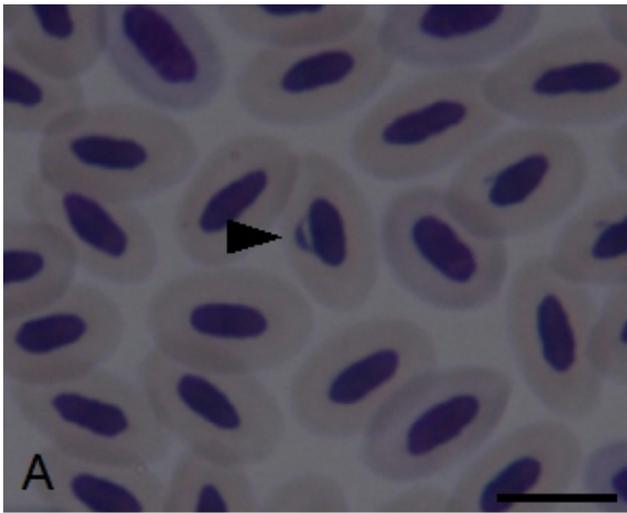
A família Emberizidae (n=4) foi a única na qual não se encontraram *Plasmodium* spp. Em Strigidae (n=4) foi registrada prevalência de 25%, Icteridae (n=4) de 75% e Tyrannidae (n=2) de 50% (Tabela 2; Gráfico 1).

Observou-se ainda que as maiores parasitemias foram encontradas em Falconidae (3,05% \pm 3,43), seguida por Thraupidae (2,52% \pm 4,68) e Cardinalidae (2,02% \pm 2,47) (Tabela 2; Gráfico 2). As menores parasitemias foram observadas em Strigidae (0,02% \pm 0,05), Picidae (0,05%) e Mimidae (0,09%). Pode-se destacar ainda que a família Psittacidae teve grande número de aves amostradas e a parasitemia foi de 0,83% \pm 1,27 (Tabela 2; Gráfico 2).

Tabela 1. Prevalência e parasitemia de *Plasmodium* sp. encontradas nas análises microscópicas em espécies de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais amostradas no presente estudo.

Família / Espécie	Nomes populares	Nº de aves examinadas	Prevalência (%)	Parasitemia média (%)
Accipitridae				
<i>Rupornis magnirostris</i> (Gmelin, 1788)	Gavião-carijó	3	100	0,21
Falconidae				
<i>Caracara plancus</i> (Miller, 1777)	Carcará	7	100	3,49
<i>Falco sparverius</i> Linnaeus, 1758	Quiriquiri	1	0	0
Columbidae				
<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1811)	Rolinha-roxa	1	100	0,58
Psittacidae				
<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus, 1758)	Arara canindé	1	0	0
<i>Ara chloropterus</i> Gray, 1859	Arara vermelha	1	100	0,49
<i>Primolius maracana</i> (Vieillot, 1816)	Maracanã verdadeira	4	50	0,18
<i>Aratinga leucophthalma</i> (Statius Muller, 1776)	Periquitão-maracanã; Maritaca	20	90	1,21
<i>Aratinga aurea</i> (Gmelin, 1788)	Periquito-rei	3	100	0,56
<i>Pionus maximiliani</i> (Kuhl, 1820)	Maitaca-verde	2	50	0,33
<i>Amazona vinacea</i> (Kuhl, 1820)	Papagaio-do-peito-roxo	1	100	0,19
<i>Amazona amazonica</i> (Linnaeus, 1766)	Papagaio-do-mangue	2	100	0,84
<i>Amazona aestiva</i> (Linnaeus, 1758)	Papagaio-verdadeiro	2	100	0,11
Strigidae				
<i>Strix virgata</i> (Cassin, 1849)	Coruja-do-mato	1	0	0
<i>Athene cunicularia</i> (Molina, 1782)	Coruja-buraqueira	1	100	0,09
<i>Asio stygius</i> (Wagler, 1832)	Coruja-diabo	2	0	0
Ramphastidae				
<i>Ramphastos toco</i> Statius Muller, 1776	Tucano toco	5	80	0,09
<i>Pteroglossus aracari</i> (Linnaeus, 1758)	Araçari	1	100	0,84
Picidae				
<i>Colaptes campestris</i> (Vieillot, 1818)	Pica-pau-do-campo	1	100	0,05
Tyrannidae				
<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	Bem-te-ví	2	50	0,66
Turdidae				
<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	Sabiá- laranja	2	100	1,49
Mimidae				
<i>Mimus saturninus</i> (Lichtenstein, 1823)	Sabiá-do-campo	1	100	0,09
Thraupidae				
<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)	Pimentão	1	100	0,3
<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye, 1837	Trinca-ferro verdadeiro	37	89,19	3,01
<i>Ramphocelus bresilius</i> (Linnaeus, 1766)	Tiê-sangue	1	100	0,07
<i>Lanio pileatus</i> (Wied, 1821)	Galinho-da-serra	2	100	0,17
<i>Paroaria dominicana</i> (Linnaeus, 1758)	Cardeal-do-nordeste	1	100	0,8
<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	Sanhaçu-cinzento	1	100	0,02
<i>Tangara palmarum</i> (Wied, 1823)	Sanhaçu-do-coqueiro	1	100	0,65
<i>Schistochlamys ruficapillus</i> (Vieillot, 1817)	Bico-de-veludo	1	0	0
Emberizidae				
<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	Tico-tico	2	0	0
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	Canário-da-terra- verdadeiro	2	0	0
Cardinalidae				
<i>Cyanoloxia brissonii</i> (Lichtenstein, 1823)	Azulão	2	100	2,02
Icteridae				
<i>Icterus jamaicii</i> (Gmelin, 1788)	Corrupião	1	100	0,1
<i>Gnorimopsar chopi</i> (Vieillot, 1819)	Pássaro-preto	2	50	0,04
<i>Chrysomus ruficapillus</i> (Vieillot, 1819)	Garibaldi	1	100	0,1
TOTAL		119	83,19	1,51

Fotografia 1. Formas evolutivas de *Plasmodium* spp. encontradas nos esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, de aves silvestres mantidas no IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. As setas evidenciam em A e B - trofozoíto, em C e D - esquizonte e em E e F- gametócito. (Aumento 1000x; barras = 10µm).





Fotografia 2. Exemplar de microfilária observada nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa de aves da família Thraupidae, mantidas no IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. (Aumento 1000x; barra = 50µm).

Tabela 2. Prevalência e parasitemia média para *Plasmodium* sp. em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica, mantidas em cativeiro, observadas em análise microscópica.

Família	Nº de aves examinadas	Prevalência média (%)	Parasitemia média (%) e desvio padrão
Accipitridae	3	100	0,21 (± 0,15)
Falconidae	8	87,5	3,05 (± 3,43)
Columbidae	1	100	0,58
Psittacidae	36	83,3	0,83 (± 1,27)
Strigidae	4	25	0,02 (± 0,05)
Ramphastidae	6	83,3	0,21 (± 0,32)
Picidae	1	100	0,05
Tyrannidae	2	50	0,66 (± 0,93)
Turdidae	2	100	0,49 (± 0,22)
Mimidae	1	100	0,09
Thraupidae	45	88,8	2,52 (± 4,68)
Emberizidae	4	0	-
Cardinalidae	2	100	2,02 (± 2,47)
Icteridae	4	75	0,34 (± 0,56)
Total	119		

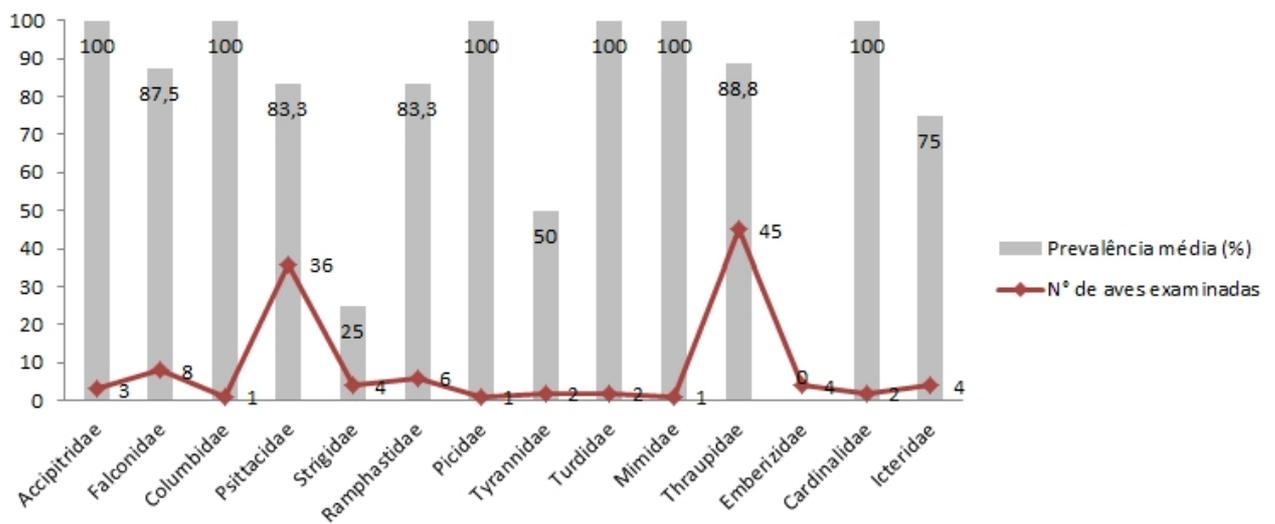


Gráfico 1. Prevalência média para *Plasmodium* sp. encontrada nas análises microscópicas em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais e número de aves amostradas no presente estudo.

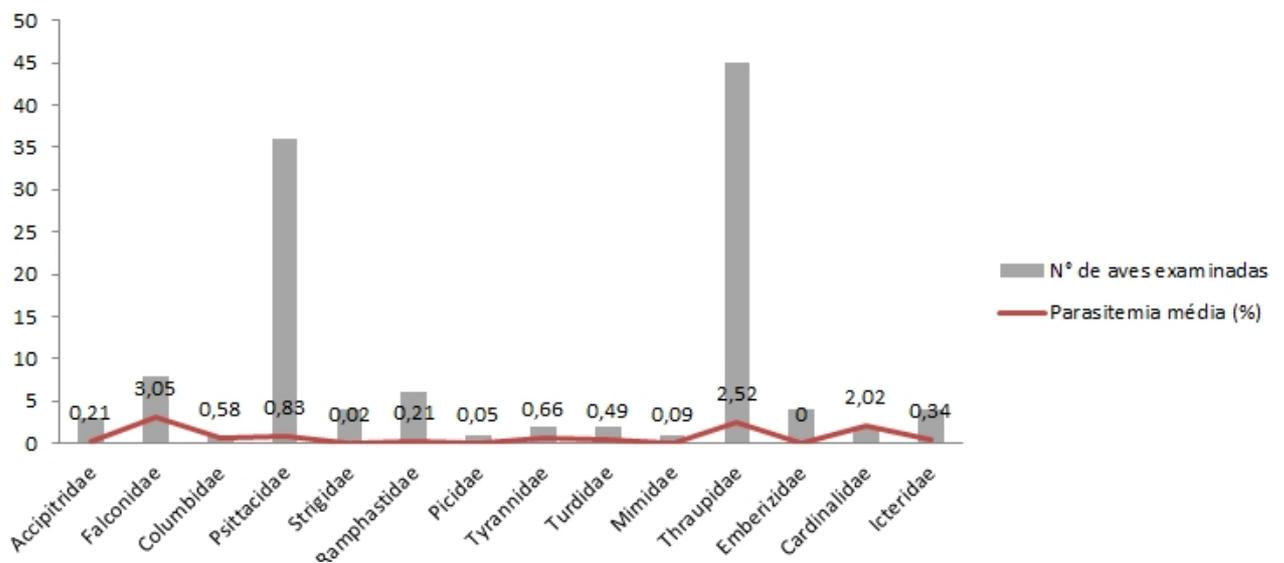


Gráfico 2. Parasitemia média para *Plasmodium* sp. encontrada nas análises microscópicas em famílias de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais e número de aves amostradas no presente estudo.

2. Diagnóstico molecular

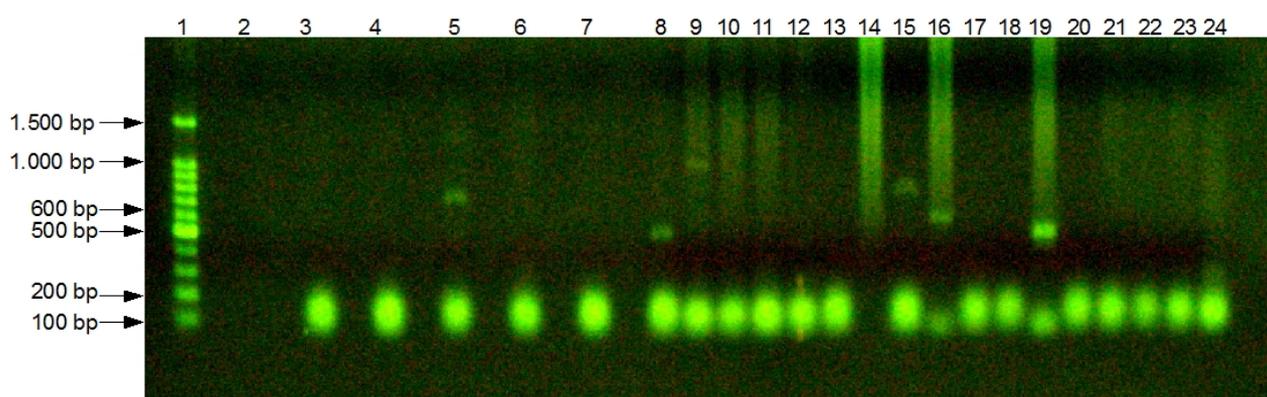
Dentre as 80 aves analisadas por PCR, 66 mostraram-se positivas para presença de DNA de *Plasmodium* spp. com prevalência de 82,5 % (Fotografia 3). Foram examinadas aves de 12 famílias e 24 espécies (Tabela 3).

Dentre as aves analisadas as espécies *Columbina talpacoti*, *Primolius maracana*, *Pitangus sulphuratus*, *Saltator fuliginosus* e *Sicalis flaveola* não apresentaram parasitismo por *Plasmodium* spp. (Tabela 3).

Nas famílias Strigidae, Turdidae, Cardinalidae e Icteridae foi registrada prevalência de 100%. Seguidas de Thraupidae (85,1%), Falconidae (83,3%), Psittacidae (82,1%), Emberizidae, Accipitridae e Ramphastidae com 66,6%, e Columbidae e Tyrannidae com 0%.

No gel de agarose foram observados fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, variando de 100 bp a 600 bp (Fotografia 3).

Em 14 aves não houve amplificação de DNA e estas foram consideradas negativas para *Plasmodium* spp. Apenas quatro dessas foram negativas também nos esfregaços.



Fotografia 3. Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de amplificação das amostras de DNA por meio da amplificação do gene citocromo b de *Plasmodium* sp. por PCR. 1- Padrão de peso molecular; 2- Controle negativo; 3-13 e 15-23 Amostras positivas; 14- Amostra negativa; 24- Controle positivo (*P. juxtannucleare*).

Tabela 3. Prevalência de *Plasmodium* sp. encontradas nas análises moleculares em espécies de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais amostradas no presente estudo.

Família / Espécie	Nº de aves examinadas pela biologia molecular	Prevalência PCR (%)
Accipitridae		
<i>Rupornis magnirostris</i> (Gmelin, 1788)	3	66,6
Falconidae		
<i>Caracara plancus</i> (Miller, 1777)	6	83,3
Columbidae		
<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1811)	1	0
Psittacidae		
<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus, 1758)	1	100
<i>Ara chloropterus</i> Gray, 1859	1	100
<i>Primolius maracana</i> (Vieillot, 1816)	1	0
<i>Aratinga leucophthalma</i> (Statius Muller, 1776)	18	88,8
<i>Aratinga aurea</i> (Gmelin, 1788)	3	66,6
<i>Pionus maximiliani</i> (Kuhl, 1820)	2	50
<i>Amazona vinacea</i> (Kuhl, 1820)	1	100
<i>Amazona amazonica</i> (Linnaeus, 1766)	1	100
Strigidae		
<i>Athene cunicularia</i> (Molina, 1782)	1	100
<i>Asio stygius</i> (Wagler, 1832)	2	100
Ramphastidae		
<i>Ramphastos toco</i> Statius Muller, 1776	3	66,6
Tyrannidae		
<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	1	0
Turdidae		
<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	2	100
Thraupidae		
<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)	1	0
<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye, 1837	24	87,5
<i>Lanio pileatus</i> (Wied, 1821)	1	100
<i>Tangara palmarum</i> (Wied, 1823)	1	100
Emberizidae		
<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	2	100
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	1	0
Cardinalidae		
<i>Cyanoloxia brissonii</i> (Lichtenstein, 1823)	2	100
Icteridae		
<i>Chrysomus ruficapillus</i> (Vieillot, 1819)	1	100
TOTAL	80	82,5

DISCUSSÃO

As prevalências médias de *Plasmodium* spp. observadas no presente estudo (83,19% na microscopia e 82,5% na PCR) podem ser consideradas altas, quando comparadas a outros como o de RODRÍGUEZ & MATTA (2001) com 0,6%, JARVI *et al.* (2002), 27%, o de VALKIÜNAS *et al.* (2004), 0,6%; KRONE *et al.* (2008), 11,9%, VALKIÜNAS *et al.* (2009-b), 46,6%; e GARAMSZEGI (2010) 23,35%. Dentre os estudos realizados no Brasil, este registra a maior prevalência encontrada para o gênero *Plasmodium* em aves silvestres brasileiras mantidas em cativeiro, até o momento.

BELO *et al.* (2009), estudaram psitacíformes em cativeiro de diferentes regiões do Brasil e encontraram uma prevalência de infecção de 34,6% por *Plasmodium* spp. na PCR, enquanto no presente estudo a prevalência para psitacídeos foi de 83,3% no microscopia e 82,1% na PCR. Os autores encontraram, assim como no presente estudo, apenas formas trofozoíticas nos esfregaços sanguíneos, e relataram o aumento da prevalência de infecção por hemoparasitos em aves mantidas em cativeiro, destacando a importância de estudos com aves de cativeiro, pois essas podem ser um risco para a disseminação da malária a outras aves em zoológicos ou mesmo na natureza se forem reintroduzidas.

Outro trabalho feito com psitacíformes em cativeiro, no Distrito Federal, foi o de RAMOS (2012), onde foram utilizados os oligonucleotídeos “rPLU” para identificar *Plasmodium* spp. em 106 araras de sete espécies, registrando prevalência de 7,29%, que, quando comparada ao presente estudo, pode ser considerada baixa.

A infecção por *Plasmodium* spp. pode ter um forte impacto negativo sobre o hospedeiro, principalmente, quando uma espécie de ave é exposta ao parasito pela primeira vez (VAN RIPER III *et al.*, 1986), ou ainda quando aves são expostas a espécies de plasmódios que não são encontradas em seu ambiente natural, como por exemplo em pinguins

Spheniscus magellanicus (Forster, 1781) que morreram em um zoológico no Brasil com infecção malárica causada por *Plasmodium relictum* (BUENO *et al.*, 2010). Pode-se citar ainda a extinção de aves nativas no Havaí devido à introdução de uma espécie nova de *Plasmodium* (ATKINSON *et al.*, 2000; BENSCH *et al.*, 2000). Isto confirma o risco que aves em cativeiro para aves nativas, já que muitas são reintroduzidas e podem levar espécies de parasitos diferentes, que podem ter sido adquiridas em cativeiro, para novas áreas.

A alta prevalência encontrada no presente estudo pode estar relacionada às condições de cativeiro, onde as aves são mantidas próximas umas das outras, não refletindo as condições naturais de muitas espécies. O cativeiro pode facilitar a exposição das aves aos possíveis vetores da malária, uma vez que lagoas existentes nas imediações do IBAMA próximas aos recintos podem servir como criadouros para os insetos. Os principais vetores do gênero *Plasmodium* são dípteros hematófagos da família Culicidae, comuns em regiões tropicais e antropizadas (VALKIÜNAS, 2005).

WHITE *et al.* (1978) já sugeriam que a grande diversidade da avifauna neotropical, somada ao grande número de endemismos, poderia oferecer um elevado potencial para altas prevalências de hematozoários de aves em relação à região Neártica.

SEBAIO *et al.* (2010) estudaram 925 aves, de 109 espécies de diferentes fragmentos de Mata Atlântica no Brasil e registraram prevalências médias de 9,2% para o gênero *Plasmodium* e 0,03% para microfilárias, diferenciando muito dos resultados encontrados no presente estudo. Entretanto não foi possível comparação entre espécies de aves, já que os autores não as divulgaram.

Segundo RIBEIRO *et al.* (2005), a prevalência de infecção deve ser relacionada a características biológicas e comportamentais do hospedeiro, como tipo de ninho, pois ninhos abertos expõem mais a ave aos vetores do que os fechados; participação da ave em bandos com outras espécies; sexo, idade e comportamento alimentar, o que pode alterar a possibilidade de contato com o vetor e por alterações fisiológicas, que podem tornar a ave

mais susceptível à contaminação por hemoparasitos.

No presente estudo muitas aves foram mantidas próximas ou no mesmo recinto com outras, tanto da mesma espécie, quanto de espécies diferentes, o que pode ter facilitado a transmissão da malária. Essas condições podem ser diferentes das naturais, onde muitas aves não se agrupam em bandos. FECCHIO *et al.* (2011), mostraram a influência da socialização de aves do Cerrado brasileiro na prevalência de hemoparasitos, registrando diferença significativa entre aves que vivem em grupos e aves solitárias, sendo maior a prevalência de infecções por *Plasmodium* spp. em aves sociais. Esses autores observaram ainda maior prevalência em aves que vivem em cativeiro, o que pode explicar a alta prevalência encontrada no presente estudo, já que as aves examinadas foram procedentes de cativeiros ilegais e mantidas próximas nas instalações do IBAMA.

Quanto às seis famílias em que a prevalência de *Plasmodium* spp. foi de 100%, devemos levar em conta o baixo *n* amostral das mesmas, sendo o resultado encontrado pouco confiável quando comparado ao das outras famílias com maior número de aves analisadas.

A parasitemia média total encontrada (1,51%) pode ser considerada baixa quando comparada com outros estudos. RIBEIRO *et al.* (2005), por exemplo, encontraram parasitemia média de 2,3%. Essa variável pode estar diretamente relacionada à patogenicidade da infecção, na maioria dos casos subclínica, e o aparecimento de sinais clínicos pode estar relacionado a infecções agudas, onde há aumento expressivo da parasitemia (ATKINSON *et al.*, 1995). A parasitemia pode ser influenciada por vários fatores, como a imunidade da ave, o tempo em que está estabelecida e o estágio da infecção, a espécie do parasito e do hospedeiro, sexo e idade do hospedeiro, e características intrínsecas do hospedeiro, como a presença de hormônios sexuais (REMPLE, 2004, VALKIÜNAS, 2005).

Apesar de alguns estudos como o de RICHARD *et al.* (2002), WALDENSTRÖM *et al.* (2004), GARAMSZEGI (2010) destacarem a sensibilidade das análises moleculares, principalmente em aves com parasitemias baixas, em alguns casos como em co-infecções de

hemosporídeos, a PCR pode mascarar a presença de mais de um parasito no sangue de aves, reforçando a necessidade de se fazer exame microscópico (VALKIŪNAS *et al.*, 2006, 2009-a; MARTÍNEZ *et al.*, 2009). No estudo realizado por VALKIŪNAS *et al.* (2009-b) o exame microscópico foi mais sensível para detecção de co-infecções do que a PCR, entretanto, assim como no presente estudo, a prevalência média total foi similar entre os dois métodos (83,19% na microscopia e 82,5% na PCR). Em KRONE *et al.* (2008) e KRIZANAUSKIENE *et al.* (2006), a prevalência também foi similar quando comparados os dois métodos de diagnóstico. Outros autores também destacam a congruência entre as análises moleculares e morfológicas (PERKINS & SCHALL 2002; KRIZANAUSKIENÉ *et al.*, 2006, 2010; HELLGREN *et al.*, 2007; PALINAUSKAS *et al.*, 2007).

Quanto às aves negativas no gel e positivas nos esfregaços, isto pode ser explicado pela falta de qualidade na extração de DNA, assim como em RIBEIRO *et al.* (2005) e BELO (2007). Deve-se considerar ainda que a quantidade de DNA total extraída do sangue em aves é maior que em mamíferos, devido ao núcleo presente nos eritrócitos, e essa grande quantidade de DNA pode inibir a PCR, formando falsos negativos. E ainda quando são encontradas novas espécies de parasitos torna-se necessário testes com *primers* que amplifiquem regiões de genes diferentes, já que um gene pode ser insuficiente para o diagnóstico. Como exemplo, pode ser citado o estudo de ZEHTINDJIEV *et al.* (2012), onde o gene citocromo b foi utilizado e não amplificou amostras de DNA da espécie *Plasmodium polymorphum*, que foi encontrada em esfregaços sanguíneos, que possibilitaram sua descrição, relevando ainda mais a importância da utilização da microscopia juntamente com a biologia molecular.

Estudo comparativo realizado por VALKIŪNAS *et al.* (2008) mostrou que tanto o exame microscópico como a reação em cadeia da polimerase (PCR) detectaram níveis semelhantes de prevalência para hemosporídeos em aves. Os autores recomendam o uso contínuo da microscopia fotônica em pesquisa de hemoparasitos em paralelo com o

diagnóstico baseado na PCR. GARAMSZEGI (2010) destaca que o número de campos examinados nas análises microscópicas pode influenciar o diagnóstico em infecções crônicas, principalmente para parasitos do gênero *Plasmodium*.

É importante enfatizar que a identificação de espécies de hemosporídeos ocorre, na maioria dos casos, com características observadas em microscopia, como fases eritrocíticas, análises morfométricas, como comprimento, largura, área, número e tamanho de grânulos de hemozoína (GARNHAM, 1966; VALKIÜNAS, 2005; MARTINSEN *et al.*, 2006).

HELLGREN *et al.* (2007) levantaram hipótese em que espécies de hemosporídeos com a diferenciação genética de mais de 5% no gene mitocondrial citocromo b sejam morfologicamente diferenciadas. Este estudo enfatiza ainda a importância de utilização dos métodos de diagnóstico e identificação baseados em PCR e microscopia em estudo taxonômicos, investigações ecológicas e evolutivas de hemosporídeos aviários.

Com a formação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos no gel de agarose, pode-se sugerir a presença de mais de uma espécie de *Plasmodium* nas aves.

Os resultados encontrados podem ser preocupantes, já que pesquisas tem revelado que hemoparasitos podem causar importantes alterações nas aves infectadas, inclusive levar à morte. Além disso esses parasitos podem estar relacionados à conservação desses animais (DERRAIK *et al.*, 2008). A malária pode colocar em risco imediato ou a longo prazo os animais em cativeiro, o que pode justificar a necessidade de readequação das práticas de manejo de aves em cativeiro e aves destinadas à reintrodução.

A infecção por *Plasmodium* spp. pode ser influenciada por três fatores: presença do vetor apropriado, presença da ave hospedeira e estado imunológico do hospedeiro (ESPARZA *et al.*, 2004). Por isso, é importante atentar para essas condições nos processos de transferências de aves domésticas e silvestres para outros locais a fim de evitar ocorrência de surtos dessa doença (VALKIÜNAS, 2005). É necessário reconhecer que os hemoparasitos são importantes agentes etiológicos, sendo necessária mais atenção sobre infecções que podem ser

transmitidas em cativeiro e levadas para o hábitat natural por aves reintroduzidas.

SEÇÃO II

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DE AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA MANTIDAS EM CATIVEIRO INFECTADAS POR MALÁRIA

RESUMO

A malária é uma importante doença que acomete aves domésticas, silvestres e em cativeiro, causando alterações fisiológicas em diferentes órgãos. Essas alterações podem ser caracterizadas por análises bioquímicas e histopatológicas. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar bioquímica e histopatologicamente alterações em órgãos de aves silvestres mantidas em cativeiro infectadas por *Plasmodium* sp. Para isso foram estudadas seis aves eutanasiadas cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora, MG. Para diagnóstico da malária, foram observados 100 campos microscópicos de esfregaços sanguíneos feitos no dia da eutanásia. Foram utilizados fragmentos do fígado, rins, baço e coração para análises histopatológicas e coletada amostra de sangue para análise bioquímica sérica. Todas as aves estavam infectadas por *Plasmodium* sp. e apresentaram parasitemia média de 2,99% ($\pm 2,50$). A análise histológica revelou alterações no fígado, rins, baço e coração, provavelmente secundárias à infecção malárica, destacando-se no fígado, baço e rins a presença de pigmentação acastanhada, sugestiva de pigmento malárico, a hemozoína. Os valores de atividade da enzima ALT e de proteínas totais foram aparentemente mais altos em aves com parasitemia maior, enquanto que a AST apresentou valores próximos do normal. É necessário considerar que parâmetros bioquímicos podem ser alterados por fatores internos e externos, o que pode explicar a diferença dos valores das enzimas encontrados no presente estudo com valores para outras espécies relatados na literatura. Portanto, torna-se fundamental a realização de outros estudos visando estabelecer valores de referência de análises bioquímicas, já que podem ser uma ferramenta na caracterização da saúde das aves silvestres.

Palavras-chave: Aves silvestres. Bioquímica sérica. Histopatologia. Malária aviária.

INTRODUÇÃO

A malária é uma importante doença que acomete aves domésticas, silvestres e em cativeiro, podendo levar à morte (ATKINSON *et al.*, 1995). Apesar de em muitos casos a infecção malárica ser assintomática, vários estudos tem demonstrado o impacto dessa doença nas taxas de sobrevivência, no sucesso reprodutivo e até no comportamento de aves (GARAMSEGI, 2005; MARZAL *et al.*, 2005; KILPATRICK *et al.*, 2006; KNOWLES *et al.*, 2010; LACHISH *et al.*, 2011; DUNN *et al.*, 2011).

Em alguns casos a doença pode ser identificada por sintomas tais como anorexia, depressão, vômito e dificuldade de alimentação (STOSKOPF & BEIER, 1979). Após a morte pode ser diagnosticada por análise macroscópica dos órgãos, incluindo características como esplenomegalia, edema pulmonar, hidropericárdio e pela análise microscópica, onde é observada a presença de parasitos no sistema reticuloendotelial e por alterações na histologia de diferentes órgãos (GRIM *et al.*, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2011)

Entre as alterações histopatológicas mais frequentes causadas pela malária estão a deposição de pigmento malárico em células de Kupffer e macrófagos; áreas de eritropoiese extramedular; e alterações na estrutura de alguns órgãos como fígado, rins, baço e pulmões (ATKINSON *et al.*, 2000; SCHRENZEL *et al.*, 2003; VASHIST *et al.*, 2011). Isso decorre da merogonia exo-eritrocítica, que pode destruir várias células de diferentes tecidos. Análises histopatológicas são ferramentas que permitem a caracterização e descrição de alterações teciduais, que juntamente com o diagnóstico microscópico, pode ser muito importante na caracterização da malária (DINHOPPL *et al.*, 2011).

A malária pode alterar também fatores fisiológicos e bioquímicos das aves (MOTTA, 2011). Para o entendimento dessas alterações e para abordagem mais aprofundada sobre a saúde das aves é necessário estudo da bioquímica plasmática, o que pode fornecer importantes informações sobre o estado fisiológico desses animais. A determinação de parâmetros

bioquímicos no sangue é uma ferramenta que pode auxiliar o diagnóstico de doenças metabólicas, definir o perfil nutricional de uma população homogênea e permitir uma avaliação clínica mais aprofundada de indivíduos, podendo ser uma ferramenta muito útil na caracterização da malária. Entretanto, essa metodologia é pouco utilizada para estudos em aves (VALLE *et al.*, 2008; VASHIST *et al.*, 2011). Assim a escassez de estudos relacionados à parâmetros bioquímicos em diferentes espécies de aves dificulta a interpretação dos dados obtidos, já que não se tem dados de referência para comparações (HOCHLETHNER, 1994; CAMBPELL, 2006).

Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar bioquímica e histopatologicamente a saúde geral de aves silvestres da Mata Atlântica mantidas em cativeiro e infectadas com *Plasmodium* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local de estudo e aves amostradas

O estudo foi realizado na sede do IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. Que localiza-se na Av. Prefeito Mello Reis, 1.500, bairro Aeroporto (23 K E 667368,991 N 7589073,595).

Foram estudadas seis aves eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA, sendo cinco da espécie *Caracara plancus* (Miller, 1777) e uma da espécie *Asio stygius* (Wagler, 1832). Essas aves não estavam em condições de soltura e não possuíam destino para zoológicos ou outros cativeiros, já que estavam com asas quebradas, amputadas e/ou machucadas, tornando a eutanásia inevitável.

2. Análises de infecção

Para diagnóstico da infecção malárica foram feitos quatro esfregaços sanguíneos das seis aves no mesmo dia da eutanásia. Estes foram secados ao ar e levados ao Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal – da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde foram fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos, secados ao ar e corados pelo Giemsa (Eosina e Azul de Metileno) por aproximadamente 40 minutos, na diluição de 1:9 em água destilada. Os esfregaços corados foram examinados sob lente de imersão em microscópio fotônico Olympus BX-51 (aumento de 1000x).

Foram examinados 100 campos microscópicos (cerca de 10.000 eritrócitos) por lâmina de cada ave, calculando-se a prevalência (MARGOLIS *et al.*, 1982) e parasitemia (SOUZA, 1998).

3. Análises histopatológicas

Para o estudo de possíveis alterações no fígado, rins, baço e coração, foram coletados fragmentos dos órgãos das seis aves eutanasiadas.

Imediatamente após a morte os órgãos foram retirados e fixados em formalina 10%, por um período mínimo de 72 horas, após o qual realizou-se a análise macroscópica (fígado, rins, baço e coração) e clivagem. Fragmentos representativos foram selecionados e processados de acordo com técnicas histológicas de rotina, que envolve inclusão em parafina, cortes em secções de 5 µm de espessura com uso de micrótomo e montagem em lâminas de vidro. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina (fígado, rins, baço e coração) e Perl's ou Azul da Prússia (fígado) e montadas com lamínulas com Entellan®. Em seguida, foram observadas e fotografadas com o uso de câmera digital (Q color - Olympus) acoplada ao microscópio fotônico Olympus BX-51.

4. Análises bioquímicas

Foram coletadas amostras de 3 mL de sangue das seis aves eutanasiadas para a realização de análises das enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), proteínas séricas totais, albumina e uréia enzimática, visando a caracterização hepática e renal das aves.

O sangue foi armazenado em microtubos de 1,5 mL contendo heparina sódica e conduzido em caixa térmica resfriada ao Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram realizadas as análises do plasma das aves no mesmo dia. Foram utilizados “kits” bioquímicos comerciais Bioclin (QUIBASA) e a leitura feita por métodos colorimétricos. Para cada parâmetro foram realizadas triplicatas dos testes.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação

Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo protocolo nº 027/2011 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268.

RESULTADOS

Todas as aves eutanasiadas estavam infectadas por *Plasmodium* sp. (Fotografia 4), apresentando prevalência de 100%. As formas mais encontradas foram trofozoítos, impossibilitando a identificação morfológica da espécie do parasito. A parasitemia média foi de 2,99% ($\pm 2,50$).

As análises histopatológicas do fígado mostraram alterações que podem ser decorrentes da malária. O parênquima hepático apresentou infiltrado inflamatório focal constituído por linfócitos e plasmócitos, abscessos, capilares sinusóides dilatados, exuberante congestão vascular centro lobular, portal e sinusoidal, desarranjo estrutural das trabéculas de hepatócitos, aparente vacuolização citoplasmática de hepatócitos, necrose hepatocelular focal, além da presença de pigmento acastanhado, sugestivo de hemozoína (pigmento típico de infecções maláricas), fora e dentro de células de Kupffer, que se apresentaram hipertrofiadas e hiperplasiadas e indícios de eritropoiese extra-medular, com a presença de hemácias jovens (Fotografia 5).

Nos rins observou-se intensa congestão vascular cortical e medular, além de focos de hemorragia e necrose tubular e assim como no fígado presença de pigmento acastanhado indicativo de hemozoína (Fotografia 6).

No baço houve alterações como desorganização da arquitetura esplênica, congestão intensa da polpa vermelha, hiperplasia e hipertrofia de macrófagos, presença também de pigmento acastanhado e ainda cordões esplênicos transformados em traves fibróticas e a polpa branca apresentou folículos linfóides aparentemente dilatados ou transformados em blocos hialinos (Fotografia 7).

No coração não houve alterações marcantes, foi encontrada aparente congestão miocárdica e pericárdica (Fotografia 8).

Em relação à atividade da enzima alanina transaminase (ALT) foram encontrados

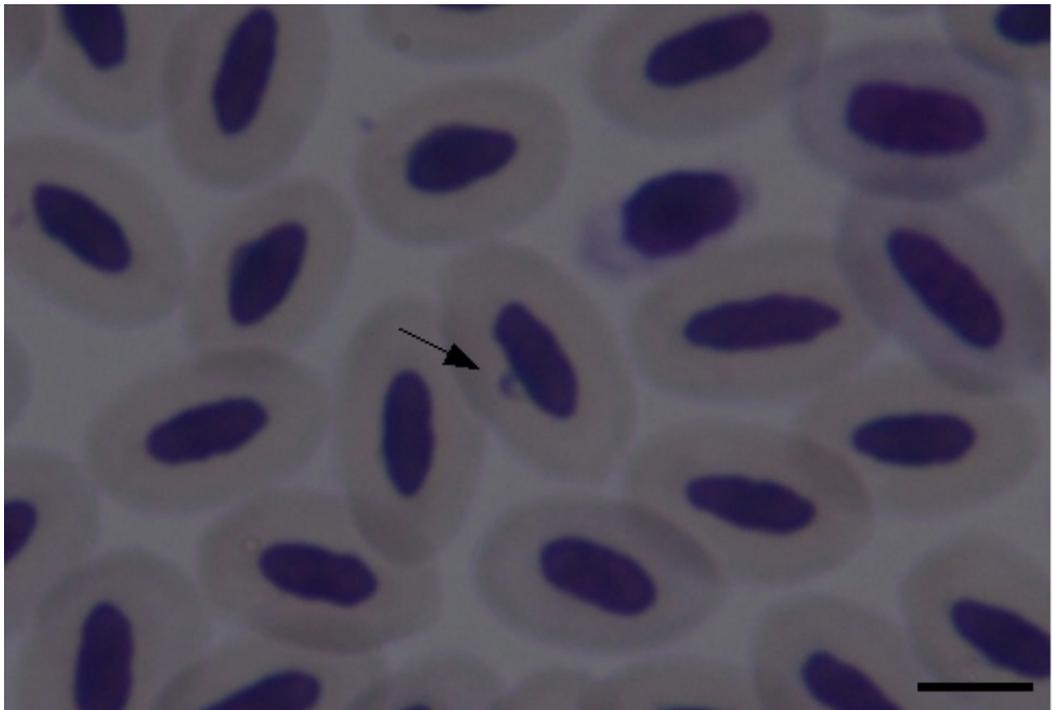
valores médios de 103,64 U/mL ($\pm 16,66$) e entre as aves amostradas observou-se que naquelas em que a parasitemia foi maior, encontrou-se aparentemente maiores valores de atividade da enzima (Gráfico 3).

Quanto à atividade da aspartato aminotransferase (AST), não houve aparente correlação com a parasitemia. Valores de atividade dessa enzima apresentaram-se próximos do normal, sem grandes elevações, quando comparado com outros estudos, como o realizado por VASHIST *et al.* (2011). O valor médio de atividade da enzima encontrado foi de 96,58 U/mL ($\pm 28,46$) (Gráfico 4).

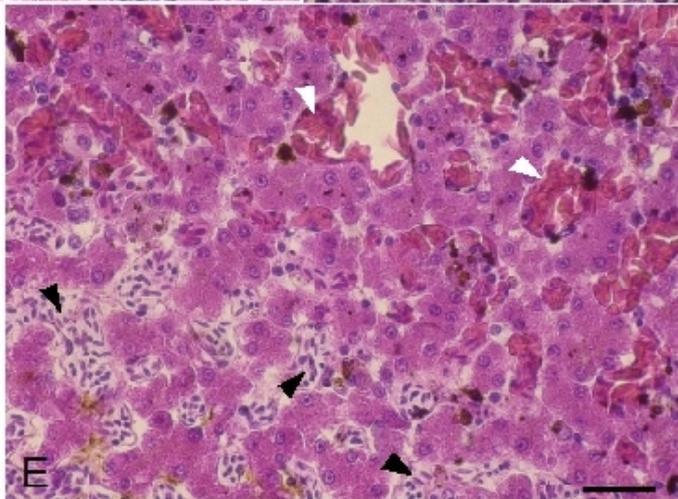
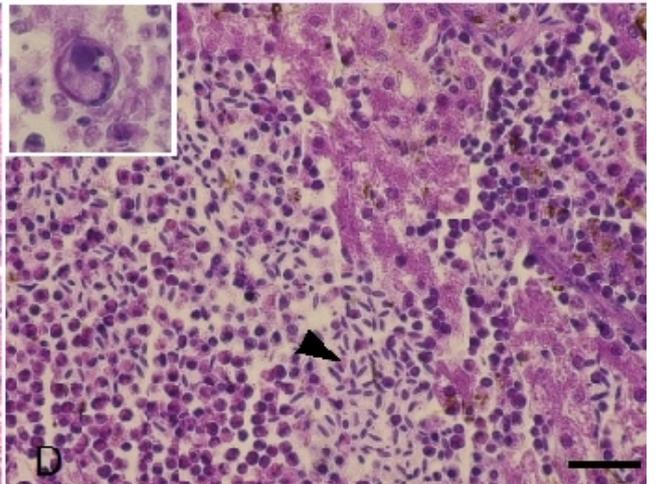
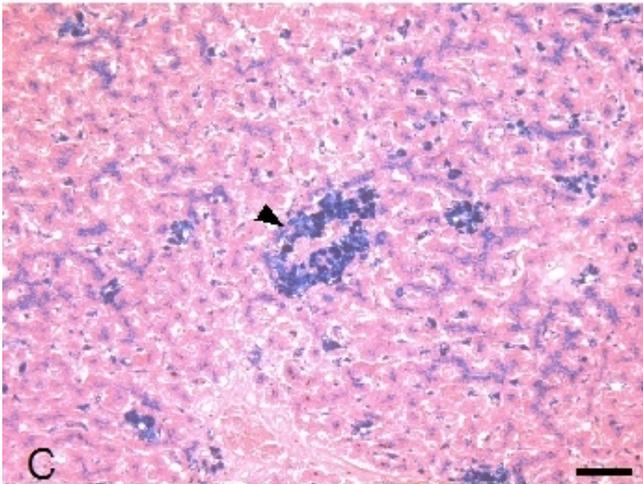
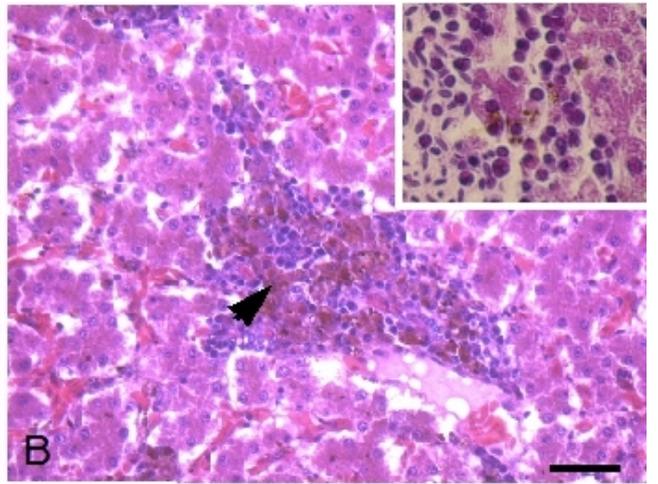
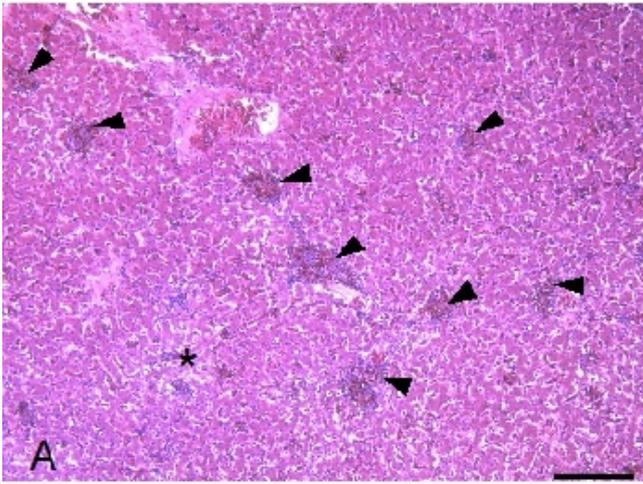
A média dos valores de atividade para proteínas totais foi de 3,81 g/dL ($\pm 0,95$) (Gráfico 5). O maior valor encontrado, de 5,71 g/dL, foi na ave 5, seguido por 3,64 g/dL, na ave 2, sendo essas as aves que apresentaram parasitemia mais elevada. As concentrações de proteínas não se diferenciaram muito do normal, quando comparadas ao estudo de VASHIST *et al.* (2011). Entretanto a ave 5 demonstrou valor elevado em relação as demais.

O valor médio da albumina encontrado foi de 1,94 g/dL ($\pm 0,49$) (Gráfico 6). E a uréia enzimática apresentou valor médio de 13,63 mg/dL ($\pm 12,83$) (Gráfico 7). Os valores maiores foram observados na ave 1 (coruja), e na ave 5. Esse parâmetro pode estar relacionado diretamente à avaliação renal.

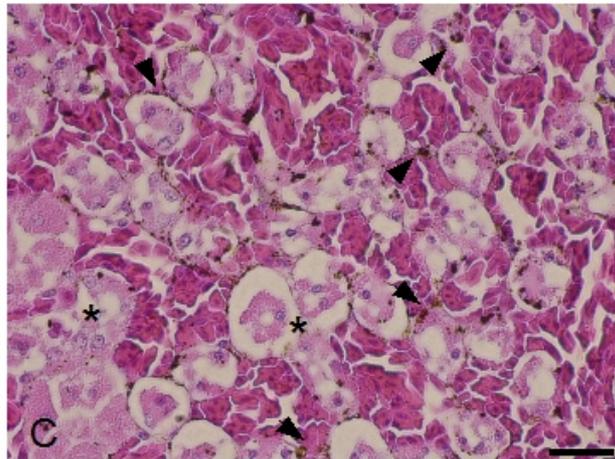
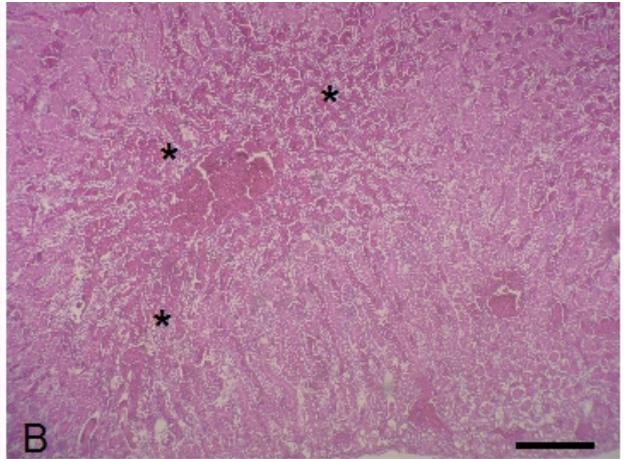
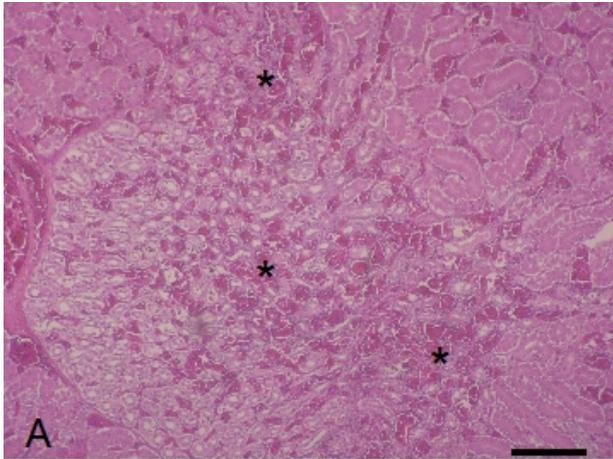
Fotografia 4. Exemplar de trofozoíto de *Plasmodium* sp. encontrado nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa da ave *Caracara plancus* eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. A seta evidencia o parasito. (Aumento 1000x; barra = 5µm).



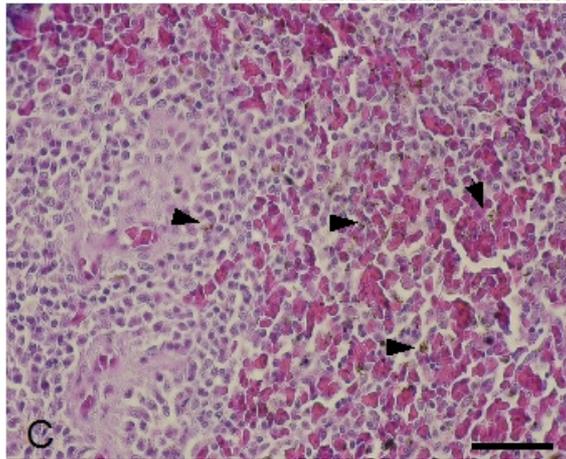
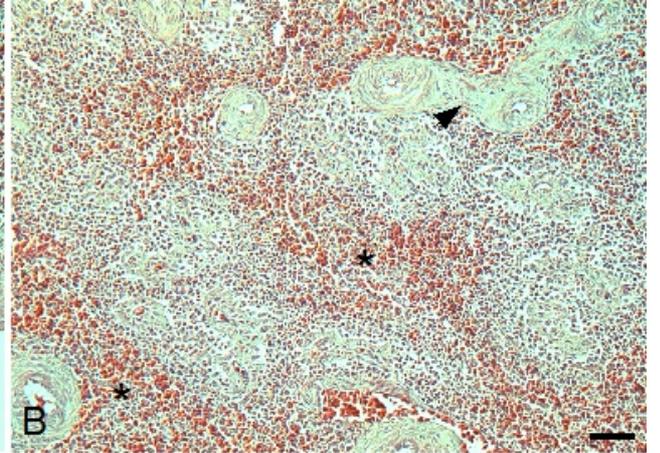
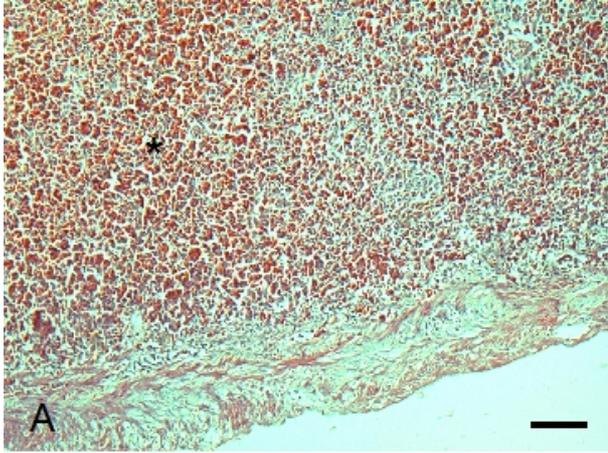
Fotografia 5. Cortes histológicos do fígado da ave *Caracara plancus* infectada por *Plasmodium* sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. (A) Regiões de abscesso no parênquima hepático (setas) e regiões com capilares sinusóides dilatados e desarranjados (asterisco) (HE 100x, barra = 120µm); (B) Região de abscesso no parênquima hepático (seta) e em destaque, no canto superior direito, pigmento malárico em células hepáticas (seta) (HE 100x, barra = 50µm); (C) Pigmento férrico destacado pela coloração azul no tecido. A imagem mostra o acúmulo desse pigmento em células de Kupffer e hepatócitos (Perl's 200x, barra = 120µm); (D) Região de possível eritropoiese extramedular, destacando na seta região com eritrócitos jovens e no canto esquerdo uma célula volumosa (HE 400x, barra = 50µm); (E) Imagem evidenciando dilatação e congestão sinusoidal, destacando nas setas pretas regiões com eritrócitos provavelmente jovens e nas setas brancas eritrócitos já formados (HE 400x, barra = 50µm).



Fotografia 6. Cortes histológicos do rim da ave *Caracara plancus* infectada por *Plasmodium* sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. (A) Intensa congestão da região medular indicada pelos asteriscos (HE 100x, barra = 120µm); (B) Intensa congestão e foco de hemorragia na região cortical, indicados pelos asteriscos (HE 100x, barra = 120µm); (C) Congestão do tecido e necrose tubular indicadas pelos asteriscos e deposição de pigmento acastanhado, que pode ser pigmento malárico indicada pelas setas (HE 400x, barra = 50µm).



Fotografia 7. Cortes histológicos do baço da ave *Caracara plancus* infectada por *Plasmodium* sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. (A) Aparente congestão da polpa vermelha destacada pelo asterisco (HE 200x, barra = 120µm); (B) Aparente congestão da polpa branca, desorganização do tecido e destacada pela seta a formação de traves fibróticas a partir de cordões esplênicos (HE Aumento 200x, barra = 120µm); (C) Deposição de pigmento acastanhado, que pode ser pigmento malárico destacado pelas setas (HE 400x, barra = 50µm).



Fotografia 8. Cortes histológicos do coração da ave *Asio stygius* infectada por *Plasmodium* sp. eutanasiada e cedida pelo IBAMA de Juiz de Fora, Minas Gerais. (A) Aparente hemorragia miocárdica destacada pela seta (HE Aumento 100x, barra = 120µm); (B) Aparente congestão pericárdica destacada pela seta (HE Aumento 100x, barra = 120µm).

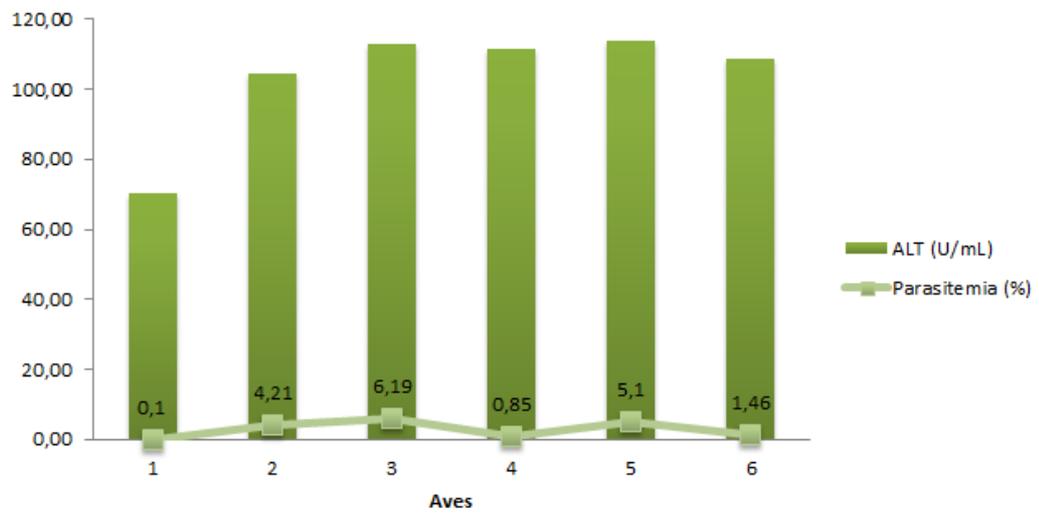
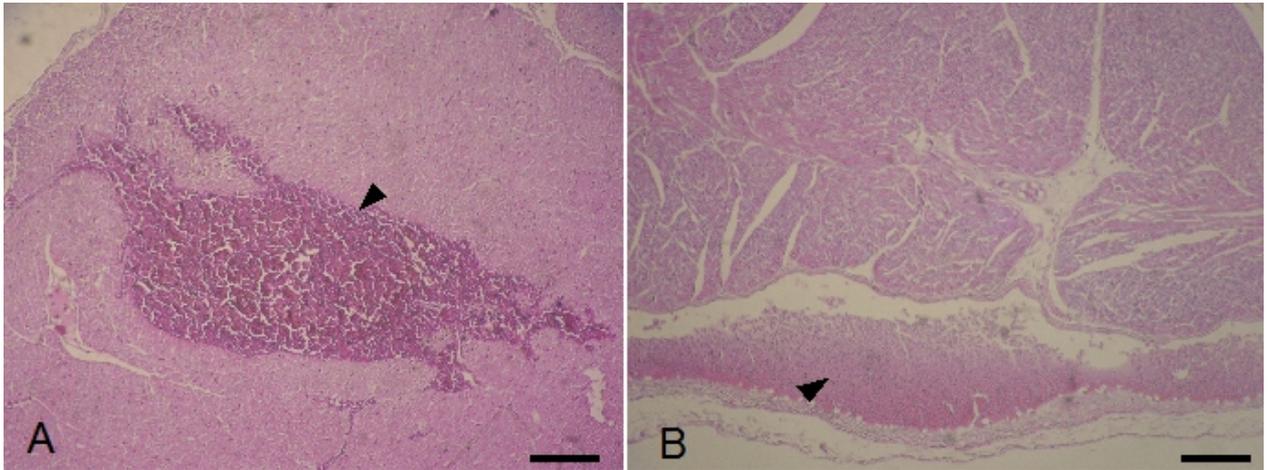


Gráfico 3. Atividade da alanina transaminase (ALT) e parasitemia de infecção por *Plasmodium* sp. em aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.

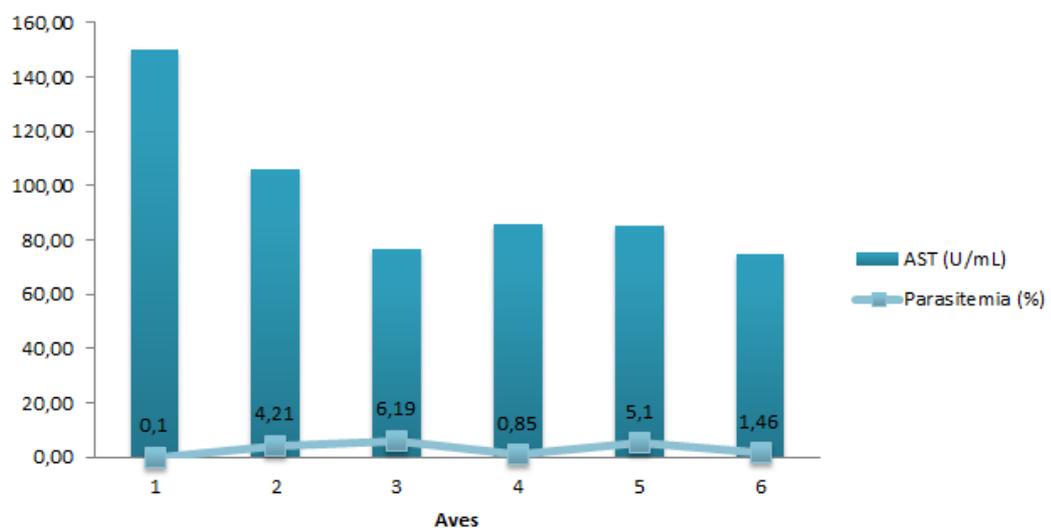


Gráfico 4. Atividade da aspartato aminotransferase (AST) e parasitemia de infecção por *Plasmodium* sp. em aves silvestres da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.

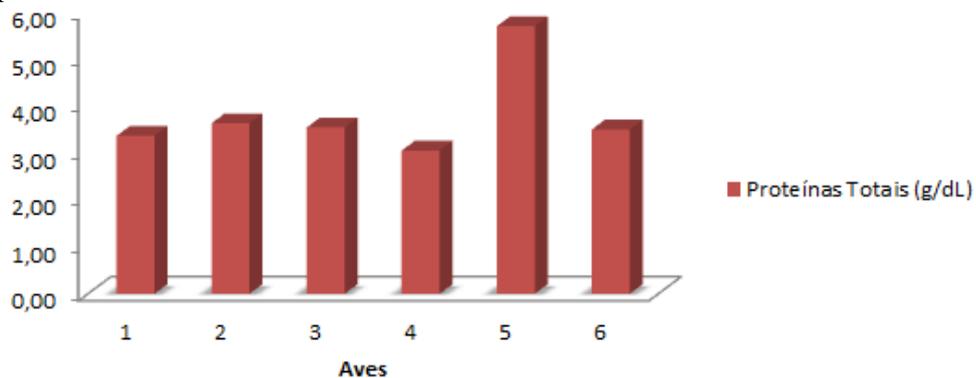


Gráfico 5. Concentrações de proteínas totais encontradas em aves silvestres infectadas por *Plasmodium* sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.

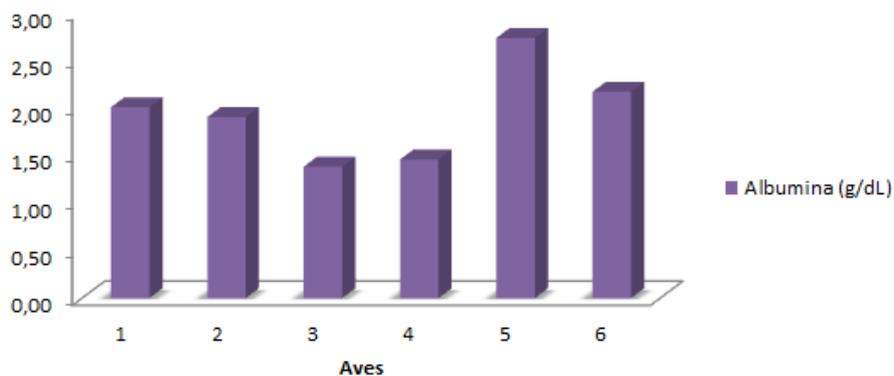


Gráfico 6. Concentrações de albumina em aves silvestres infectadas por *Plasmodium* sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.

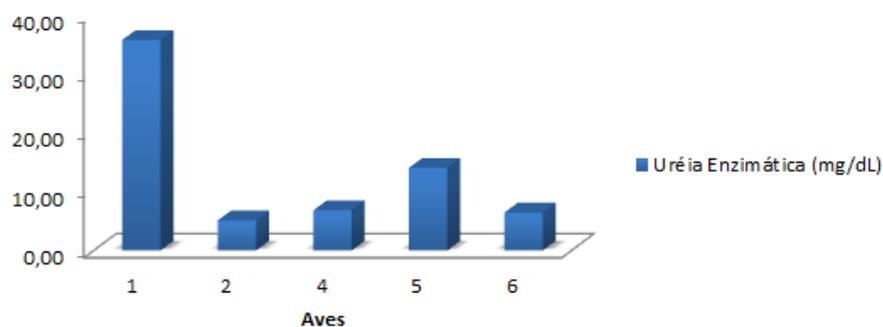


Gráfico 7. Concentrações de uréia enzimática em aves silvestres infectadas por *Plasmodium* sp. da Mata Atlântica em Minas Gerais, eutanasiadas e cedidas pelo IBAMA de Juiz de Fora.

DISCUSSÃO

A parasitemia de 2,99% encontrada no presente trabalho pode ser considerada alta, quando comparada à outros estudos realizados no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2005; BELO *et al.*, 2009; SEBAIO *et al.*, 2010; FECCHIO *et al.*, 2011). Essa variável pode estar diretamente relacionada à patogenicidade da infecção, na maioria dos casos subclínica. O aparecimento de sintomas clínicos pode estar relacionado a infecções agudas, onde há um aumento expressivo da parasitemia (ATKINSON *et al.*, 1995). A parasitemia pode ser influenciada por vários fatores, como por exemplo, a imunidade da ave; o tempo em que está estabelecida e o estágio da infecção; a espécie do parasito e do hospedeiro; sexo e idade do hospedeiro; e características intrínsecas do hospedeiro, como a presença de hormônios sexuais (REMPLE, 2004, VALKIŪNAS, 2005).

Análises histopatológicas podem ser uma ferramenta muito útil na caracterização da saúde de aves silvestres, principalmente em doenças como a malária. Entretanto em casos onde a parasitemia é baixa, pode ser difícil o diagnóstico da doença por alterações histopatológicas (DINHOPL *et al.*, 2011).

As principais alterações histológicas que podem ser causadas pela infecção malárica são: esplenomegalia, edema pulmonar, hidropericárdio e a presença de parasitos no sistema reticuloendotelial (GRIM *et al.*, 2003).

No estudo de SCHRENZEL *et al.* (2003), os autores fizeram análise histológica de sete aves infectadas por malária, que morreram em cativeiro e encontraram alterações no fígado, baço e pulmões, com deposição de pigmento malárico, assim como no estudo de ATKINSON *et al.* (2000), onde foi encontrada deposição de pigmentos nas células de Kupffer no fígado e em macrófagos no baço, assim como encontrado no presente estudo.

No estudo de DINHOPL *et al.* (2011), onde verificaram alterações histológicas de pinguins em cativeiro, foi visto que lesões típicas de malária aviária, incluindo esplenomegalia, hepatomegalia e edema pulmonar grave estavam presentes em nove de 48

aves. Em cinco desses nove pinguins, foram vistos numerosos merontes evidentes no capilar do endotélio de vários tecidos, especialmente do pulmão, fígado, baço e cérebro. Outras características como necrose focal e cariorrexe bem como a formação de microtrombos foram observadas no baço. No fígado, assim como no presente estudo, estavam presentes infiltrados inflamatórios perivasculares não supurativos contendo principalmente células plasmáticas.

A eritropoiese consiste na formação de células sanguíneas, sendo a medula óssea o principal local de formação dessas células. Durante a vida fetal o fígado e o baço constituem os principais locais de eritropoiese, podendo esta função ser retomada em caso de necessidade, o que caracteriza a eritropoiese extramedular (LACERDA *et al.*, 2007). Esse evento pode acontecer em situações de doenças em que são alteradas as características da medula óssea, normalmente observada em casos de distúrbios mieloproliferativos, como a mielofibrose. Pode ocorrer também em casos onde há anemia intensa, o que é sintoma de infecção malárica (MAKRIS & GREAVES, 1998).

A alanina transaminase (ALT) é uma enzima encontrada principalmente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Nos hepatócitos a ALT é encontrada predominantemente no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%), assim qualquer lesão no tecido hepático pode liberar uma maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da ALT. Deste modo, essa enzima, além de ser sensível é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular.

A elevação da atividade da enzima ALT pode estar relacionada a alterações em quase todos os tecidos. Valores anormais de atividade dessa enzima podem se manifestar quando ocorrem lesões graves no fígado, lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos, provocando maior liberação de ALT para a corrente sanguínea (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2006).

A elevação de níveis séricos de enzimas transaminases atribuídas a alterações

hepáticas pode ser devido a ruptura de hepatócitos, resultante de necroses ou alterações na permeabilidade da membrana celular ou processo de colestase (KANEKO, 1989). Algumas dessas alterações podem estar relacionadas diretamente à malária, e foram encontradas nos cortes histológicos das aves estudadas, explicando elevados níveis de atividade da enzima ALT encontrados, quando comparados com outros estudos (VASHIST, *et al.*, 2011).

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é encontrada em concentração alta no músculo cardíaco, fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Nas células hepáticas, localiza-se no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). Assim qualquer lesão que afete o parênquima hepático, liberará uma maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da AST.

A enzima AST é considerada um marcador não específico por ser encontrada em vários tecidos, mas altamente sensível indicador de lesão tecidual, estando mais relacionada à lesão tecidual recente e diminuição da função do órgão (LUMEIJ, 2008). A atividade basal da enzima AST no plasma é geralmente um reflexo do acúmulo e da mudança sofrida pelo tecido que contém esta enzima. Análise da atividade da AST é frequentemente utilizada como complemento no método diagnóstico e não como parâmetro principal. O fato da atividade dessa enzima neste estudo não ter mostrado valores alterados, possivelmente ocorreu pela inespecificidade desta enzima como indicador de lesão hepática.

Valores de proteínas totais podem estar relacionados a disfunções gastrointestinais, renais, hepáticas ou doenças infecciosas, podendo ainda indicar anemia ou presença de processo inflamatório (BARGER & GRINDEM, 2000; LUMEIJ, 2008). Medidas desse parâmetro podem auxiliar na avaliação da severidade, natureza e o progresso da enfermidade (LUMEIJ, 1990; KANEKO *et al.*, 1997; LUMEIJ, 2008). De forma geral, os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são: idade, sazonalidade, condições de criação (manejo) e doenças (LUMEIJ, 2008).

Elevações nos níveis das proteínas (hiperproteinemia) podem acontecer devido à

desidratação ou durante doenças infecciosas que causam estimulação do sistema imunológico e, conseqüentemente, aumento nos níveis de imunoglobulinas (RATCLIFFE, 1996; EVANS & DUNCAN, 2003). Assim nas aves em que foi observado maiores valores de parasitemia, é possível que maiores modificações metabólicas possam ter ocorrido, devido a provável resposta inflamatória de fase aguda provocada pelos parasitos estudados, o que explica uma concentração proteica elevada nestas aves.

Outro fator que pode determinar alterações hepáticas é a albumina. Essa proteína é sintetizada no fígado e seus valores podem ser influenciados pela nutrição, hormônios, estresse e doenças (THRALL *et al.*, 2004).

No trabalho de MOTTA (2011), onde foram analisados parâmetros bioquímicos em cracídeos, não houve diferenças significativas nas enzimas AST, ALT, nas proteínas totais e na uréia nos grupos infectados por *Plasmodium* spp. e grupos não infectados. Já no trabalho de VASHIST *et al.* (2011), os autores encontraram valores diferentes em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 infectados com *Plasmodium juxtannucleare* e não infectados.

Em VALLE *et al.* (2008), onde os autores utilizaram análises bioquímicas para caracterização do sexo e idade em psitacídeos mantidos em cativeiro, observou-se valores parecidos de proteínas totais e da enzima AST com os valores encontrados no presente estudo. Entretanto valores da uréia aqui encontrados foram mais elevados, o que pode ser explicado pelo diferente hábito alimentar das aves. A concentração de uréia enzimática pode ser influenciada pela ingestão de proteínas, sendo que as aves estudadas são carnívoras, taxa de excreção renal e ainda condição hepática (MOTTA, 2011). A uréia pode ser indicador de azotemia pré-renal, em algumas espécies, já que sua eliminação depende do estado de hidratação do animal. Então o aumento de níveis de uréia plasmática pode indicar redução na perfusão arterial dos rins (CAMPBELL, 2006; LUMEIJ, 2008).

No estudo de MIRANDA *et al.* (2008), os autores utilizaram a ferramenta de análise bioquímica para caracterização fisiológica de avestruzes, correlacionando com o sexo e

encontraram valores de proteínas totais de $3,59 \pm 0,72$ g/dL, albumina $1,04 \pm 0,14$ g/dL, uréia $18,27 \pm 12,33$ mg/dL, AST $200,67 \pm 31,42$ U/L e ALT $3,90 \pm 1,92$ U/L. Comparando com o presente estudo percebemos que valores da enzima ALT apresentaram valores inferiores.

É necessário considerar que parâmetros bioquímicos podem ser alterados por fatores internos e externos, como variações de temperatura, umidade, altitude, fotoperíodo, diferentes tipos de alimentação e manejo, além da idade, espécie e sazonalidade (HOCHLEITHNER, 1994; JURÁNI *et al.*, 2004; BORSA, *et al.*, 2006), que pode explicar a diferença dos valores das enzimas encontrados no presente estudo quando comparados com valores para outras espécies relatados na literatura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente estudo com aves silvestres mantidas em cativeiro nos permite considerar que:

1) A prevalência encontrada pode ser considerada alta quando comparada à outros estudos feitos no Brasil, o que pode ser devido às condições de cativeiro em que as aves eram mantidas.

2) Tanto a PCR como a microscopia mostraram-se eficientes para o diagnóstico de *Plasmodium* spp.

3) Análises histopatológicas mostraram que aves infectadas com malária podem apresentar alterações em muitos tecidos, como necrose, congestão e hemorragia dos mesmos, além de deposição de pigmento malárico, a hemozoína, subproduto da degradação da hemoglobina pelos parasitos e ainda a anemia causada pela malária aviária, pode ter levado à condição de eritropoiese extramedular encontrada nas aves do presente estudo.

4) Análise bioquímica sérica é uma ferramenta de extrema importância na caracterização da saúde de aves silvestres, já que é sensível a pequenas alterações fisiológicas de diferentes órgãos, necessitando de mais estudos, para determinação de valores de referência para diferentes espécies de aves, em diferentes condições. Valores de atividade da enzima ALT podem ser mais sensíveis para alterações hepáticas causadas pela malária do que valores de atividade da enzima AST.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOSNY, N. R. P. & MONTEIRO, A. O. **Patologia Clínica**. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, p. 951, 2006.

ANDERSON, R. M. & MAY, R. M. Population biology of infectious diseases: part I. **Nature**, 280, p. 361-367, 1979.

ATKINSON, C. T. & VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. 1991. In: J.E. LOYE and M. ZUK (eds.), Birdparasite interactions. Oxford, **Oxford University Press**, p. 19-48.

ATKINSON, C. T.; WOODS, K. L.; DUSEK, R. J.; SILEO, L. S.; IKO, W. M. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology** 111, p. 59–69, 1995.

ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L.; IKO, W. M. J. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**. Apr;36(2) p. 197-204, 2000.

ATKINSON, T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-813-82081-1, 2008.

BARGER, M. A. & GRINDEM, C. B. Analyzing the results of a complete blood cell count. **Veterinary Medicine**, 95(7), p. 534-553, 2000.

BARNARD, W. H.; METTKE-HOFMANN, C.; MATSUOKA, S. M. Prevalence of hematozoa infections among breeding and wintering rusty blackbirds. **The Condor** 112(4), p. 849-853, 2010.

BEADELL, J. S.; COVAS, R.; GEBHARD, C.; ISHTIAQ, F.; MELO, M.; SCHMIDT, B. K.; PERKINS, S. L.; GRAVES, G. R.; FLEISCHER, R. C. Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. **International Journal of Parasitology** 39, p. 257-266, 2009.

BELO, N. O. **Ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres da família Psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 45pp., 2007.

BELO, N. O.; PASSOS, L. F.; JÚNIOR, L. M. C.; GOULART, C. E.; SHERLOCK, T. M.; BRAGA, E. M. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. **Preventive Veterinary Medicine**, 88, p. 220-224, 2009.

BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T.; REIS, S. E.; RICKLEFS, R. O.; BRAGA, E. M. Host species and parasite lineage diversity of haemosporidians in three different environments with distinct levels of disturbance. **Plos ONE**, 6, p. 17654, 2011.

BENNETT, G. & LOPES, O. S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 75, p. 117-134, 1980.

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: a study of

Plasmodium and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of Biology Sciences**, 267, p. 1583-1589, 2000.

BENSCH, S.; PEÉREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, v. 58, n. 7, p. 1617–1621, 2004.

BENSCH, S.; WALDENSTRÖM, J.; JOSÉN, N.; WESTERDAHL, H.; HANSSON, H.; SEJBERG, D.; HASSELQUIST, D. Temporal dynamic and diversity of malaria parasites in a single host species. **Journal of Animal Ecology**, v. 76, p. 112-122, 2007.

BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Resources**, 9, p. 1353-1358, 2009.

BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.; SAITO, M.E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.675-677, 2006.

BRAGA, M. B.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; VALKIŪNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 106 (I), p. 3-11, 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1524 pp., 2011.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; de MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology** 173, p. 123-127, 2010.

CAMPBELL, T. W. **Avian Hematology and Cytology**. 2^a ed. Iowa State University Press, p. 30-34, 1995.

CAMPBELL, T.W. **Bioquímica clínica de aves**. In: THRALL, M.A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, p.415-435, 2006.

CBRO, Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>, acesso em 16/07/11.

CLARK, P.; BOARDMAN, W. S. J.; RAIDAL, S. R. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Ed. Blackwell, 2009.

DERRAIK, J. G. B.; TOMPKINS, D. M.; ALLEY, M. R.; HOLDER, P.; ATKINSON, T. Epidemiology of an avian malaria outbreak in a native bird species (*Mohoua ochrocephala*) in New Zealand. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, 38 (4), p. 237–242, 2008.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H. Application of in-situ hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. **Avian Pathology**, 40(3), p. 315-320, 2011.

DUNN, J. C.; COLE, E. F.; QUINN, J. L. Personality and parasites: sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioural traits. **Behavior Ecology and Sociobiology**, v. 65, p. 1459-1471, 2011.

DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; GRAVES, G. R.; OLSON, S. L.; GERING, E.; PEIRCE, M. A.; MILENSKY, C. M.; SCHMIDT, B. K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R. Avian hematozoa in south america: a comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**, 60, p. 98-111, 2006.

ELISEI, C.; SOUZA, P. C. O.; MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al Dia** 25, p. 1-2, 2001.

ESPARZA, B.; MARTÍNEZ-ABRAÍN, A.; MERINO, S.; ORO, D. Brief report Immunocompetence and the prevalence of haematozoan parasites in two long-lived seabirds. **Ornis Fennica**, v. 81, 2004.

EVANS, E. W. & DUNCAN, J. R. Proteins, lipids and carbohydrates. In: Latimer, K. S. **Clinical pathology**. 4.ed. cap.6. p.163-192, 2003.

EWEN, J. G.; BENS, S.; BLACKBURN, T. M.; BONNEAUD, C.; BROWN, R.; CASSEY, P.; CLARKE, R. H.; PÉ-REZ, J. Establishment of exotic parasites: the origins and characteristics of an avian malaria community in an isolated island avifauna. **Ecology Letters**, 2012.

FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. **Evolution**, 57(3), p.606-615, 2003-a.

FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; BERMINGHAM, E. Detecting avian malaria: An improved polymerase chain reaction diagnostic. **Journal of Parasitology** 89, p. 1044–1047, 2003-b.

FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. 165 (4), **The American Naturalist**, p. 466-480, 2005.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no cerrado brasileiro. **Neotropical Biology and Conservation** , 2, p. 127-135, 2007.

FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E. M.; MARINI, M. A. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. **Emu – Austral Ornithology**, 111, p. 132-138, 2011.

FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, 4(6), p.663-673, 1995.

FOWLER, G. S.; FOWLER, M. E. **Order Sphenisciformes (Penguins)**. *In*: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z.S. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Cap. 6 p. 63, 2001.

GARAMSZEGI, L. Z. Bird song and parasites. **Behavior Ecology and Sociobiology**, 59, p. 167-180, 2005.

GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and pcr-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, 96(6), p. 1197–1203, 2010.

GARNHAM, P. C. (Ed.). **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1966, 1.114pp.

GREINER, E. C. & HARRISON, G. J. **Parasites**. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. Avian Medicine: Principles and Application. Wingers Publishing, Inc., p. 1017, 1994.

GRIM, K. C.; VAN DER MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; MCCHTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 34(3), p. 250–255, 2003.

HAMILTON, W. D. & ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds. A role for parasites? **Science**, 218, p. 384-387, 1982.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, 90, p. 797-802, 2004.

HELLGREN, O.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, 93, p 889–896,

2007.

HOCHLEITHNER, M. **Biochemistries**. In: RITCHIE, B. W. Avian Medicine: Principles and Application. Florida: Wingers Publishing, p. 223-245, 1994.

IBAMA, disponível em: www.ibama.gov.br, acesso em 12/03/11.

JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, 88(1), p. 153-158, 2002.

JÚRANI, M.; VÝBOH, P.; ZEMAN, M.; LAMOSOVÁ, D.; L'UBOR, K.; BLAZÍČEK, P. Post-hatching dynamics of plasma biochemistry in free-living European starlings (*Sturnus vulgaris*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 138, p. 89-95, 2004.

KANEKO, J. J. Appendixes. In: KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4.ed. San Diego: Academic Press, p. 877-901, 1989.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th edition, San Diego: Academic Press , 932 pp., 1997.

KARAMBA. K. I.; KAWO, A. H.; DABO, N. T.; MUKHTAR, M. D. A survey of avian malaria parasite in Kano State, Northern Nigeria. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research** ,Vol. 3(1), p. 8-14, 2012.

KAWAI, T. **Clinical aspects of the plasma proteins**. Igaku Shoin Ltd, Tokio and Springer-

Verlag, Berlin, pp. 464, 1973.

KILPATRICK, A. M.; LAPOINTE, D. A.; ATKINSON, A. T.; WOODWORTH, B. L.; LEASE, J. K.; REITER, M. E.; GROSS, K. Effects of chronic avian malaria (*Plasmodium relictum*) infection on reproductive success of hawaii amakihi (*Hemignathus virens*). **The Auk** 123(3), p. 764–774, 2006.

KNOWLES, S. C.; PALINAUSKAS, V.; SHELDON, B. C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. **Journal of Evolution Biology**, v. 23, p. 557-569, 2010.

KRIŽANAUSKIENÉ, A.; HELLGREN, O.; KOSAREV, V.; SOKOLOV, L.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. J. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. **Parasitology**, 92(6), p. 1319–1324, 2006.

KRIŽANAUSKIENÉ, A.; PÉREZ-TRIS, J.; PALINAUSKAS, V.; HELLGREN, O.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. **Parasitology**, 137, P. 217-227, 2010.

KRONE, O.; WALDENSTRÖM, J.; VALKIŪNAS, G.; LESSOW, O.; MÜLLER, K.; IEZHOVA, T. A.; FICKEL, J.; BENSCH, S. Haemosporidian blood parasites in european birds of prey and owls. **Journal of Parasitology** 94(3), p. 709-715, 2008.

LACERDA, A. F.; da SILVA, I. J.; RIBEIRO, I. M. S.; COSTA, M. J.; PEREIRA F.
Hemoglobinopatias, **Actas Bioquímica.**, 8, p. 157-166, 2007.

LACHISH, S.; KNOWLES, S. C. L.; ALVES, R.; WOOD, M. J.; SHELDON, B. C. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. **Journal of Animal Ecology**, p. 1-11, 2011.

LAFERTY, K.D. & MORRIS, K. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. **Ecology**, 77, p.1390-1397, 1996.

LEFÈVRE, T.; ROCHE, B.; POULIN, R.; HURD, H.; RENAUD, F.; THOMAS, F. Exploiting host compensatory responses: the ‘must’ of manipulation? **Trends in Parasitology**, 24, p. 435-439, 2008.

LEWANDOWSKI, A. H.; CAMPBELL, T. W.; HARRISON, G. J. **Clinical chemistries**. *In*: Clinical avian medicine, HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R., Eds., Philadelphia, W. B. Saunders, pp. 717, 1986.

LI, J.; WITZ, R. A.; McCONKEY, G. A.; SATTABONGKOT, J.; WATER, A. P.; ROGERS, M. J.; McCUTCHAN, T. F. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantification. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 182-190, 1995.

LIERZ, M.; HAFEZ, H. M.; KRONE, O. Prevalence of Hematozoa in falcons in the United Arab Emirates with respect to the origin of falcon hosts. **Journal of Avian Medicine and Surgery** 22(3), p. 208–212, 2008.

LIMA, M. R.; SIMPSON, L.; FECCHIO, A.; KYAW, C. M. Low prevalence of haemosporidian parasites in the introduced house sparrow (*Passer domesticus*) in Brazil. **Acta Parasitology**, 55, p. 297-303, 2010.

LOBATO, D. N. C.; BRAGA, E. M.; BELO, N. O.; ANTONINI, Y. Hematological and parasitological health conditions of the Pale-breasted Thrush (*Turdus leucomelas*) (Passeriformes: Turdidae) in southeastern Brazil. **Zoologia**, v. 28, p. 771-776, 2011.

LOISEAU, C.; IEZHOVA, T.; VALKIÜNAS, G.; CHASAR, A.; HUTCHINSON, A.; BUERMANN, W.; SMITH, T. B; SEHGAL, R. N. M. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in african rainforest bird species. **Journal of Parasitology**, 96(1), p.21-29, 2010.

LUMEIJ, J.T. & OVERDUIN, L. M.. Plasma chemistry references values in psittaciformes. **Avian Pathology**, 19(2), p.235-244, 1990.

LUMEIJ, J. T. The relation of plasma calcium to total protein and albumin in African grey (*Psittacus erithacus*) and Amaza (*Amazona* spp.) parrots. **Avian Pathology**, 19(4), p.661-667, 1990.

LUMEIJ, J. T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th Ed., San Diego, Academic Press, p. 839-872, 2008.

MAKRIS, M. & GREAVES, M. **Sangue nas doenças sistemicas**. Editora Manole Ed.1a., 102 pp., 1998.

- MAKSIMOWICH, D.S. & MATHIS, A. Parasitized salamanders are inferior competitors for territories and food resources. **Ethology**, 106, p.319-329, 2000.
- MARGOLIS, L.; ESCH, G. W.; HOLMES, J. C.; KURIS, A. M.; SCHAD, G. A. The use of ecological terms in parasitology (reports of an ad hoc committee of American Society of Parasitologists). **Journal of Parasitology**, 68(1), p. 131-133, 1982.
- MARINI, M. A. & GARCIA, F. I. Bird Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, 19(3), p. 665–671, 2005.
- MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; HERRERO, J.; DEL CERRO, S.; LOBATO, E.; RIVERO-DE AGUILAR, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MERINO, S. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. **Parasitology** 136: 713-722, 2009.
- MARTINSEN, E. S.; PAPERNA, I.; SCHALL, J. J. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. **Parasitology**, 133, p. 279-288, 2006.
- MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S.; SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetic Evolution**, 47, p. 261-273, 2008.
- MARZAL, A.; de LOPE, F.; NAVARRO, C.; MOLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, 142, p. 541-545, 2005.

MASSEY, J. G.; GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in native Hawaiians crows in Hawaii. *Journal of Parasitology*, 82, p. 182-185, 1996.

MIRANDA, R. L.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A. S.; GUIMARÃES, R. V.; SILVA, F.O.C. Serum biochemistry of 4-day-old ostriches (*Struthio camelus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 28(9), p. 423-426, 2008.

MOTTA, R. O. C. **Malária aviária em cracídeos: influência sobre a hematologia, bioquímica sanguínea e perfil eletroforético de proteínas plasmáticas**. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

NAGATA, H. Reevaluation of the prevalence of blood parasites in Japanese Passerines by using PCR based molecular diagnostics. **Ornithological Science**, 5, p. 105–112, 2006.

OPPLIGER, A.; CÉLÉRIER, M. L.; CLOBERT, J. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by Haemogregarines. **Parasitology**, 113, p. 433-438, 1996.

PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). **Zootaxa** 1626: 39-50, 2007.

PALINAUSKAS, V.; VALKIŪNAS, G.; BOLSHAKOV, C. V.; BENSCH, S. *Plasmodium*

relictum (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): the effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. **Experimental Parasitology** 127, p. 527-533, 2011.

PERKINS, S. L. & SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malaria parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal of Parasitology**, 88, p. 972-978, 2002.

PEIRCE, M. A. **Infectious disease – Hemoparasites**. In: SAMOUR, J. Avian Medicine. Elsevier 2^a ed. 2008 p 337-342.

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96 (8), p. 1161-1164, 2001.

RAMOS, R. R. **Estudo da infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro no DF**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília/DF, 2012.

RATCLIFFE, M. J. H. Chicken immunoglobulin isotypes and allotypes. In: Herzenberg, L. A. et al. Handbook of experimental immunology. 5.ed. Cambridge: **Blackwell science**, p. 241-247, 1996.

REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. **Journal of Avian Medicine and Surgery** 18(2), p. 75–88, 2004.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C.; MARINI, M. A.; VAGO, A. R.;

BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR

using DNA from stained blood smears. **Parasitology** 130, p. 261–267, 2005.

RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. **Journal of Parasitology**, 88, p.819-822, 2002.

RICKLEFS, R. E. & FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of Royal Society B**, 269, p. 885-892, 2002.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E. Evolucionary Relationships, Cospeciation and Host Switching in Avian Malaria Parasites. **Systematic Biology**, v.53, p. 111-119, 2004.

RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; FALLON, S. M.; MARTÍNEZ-ABRAÍN, A.; SCHEUERLEIN, A.; GRAY, J.; LATTA, S. C. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. **Ecological Monographs**, 75, p. 543–559, 2005.

RICKLEFS, R. E. & SHELDON, K. S. Malaria prevalence and white-blood-cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. **The Auk** 124(4), p.1254–1266, 2007.

RODRÍGUEZ, O. A. & MATTA, N. E. Blood Parasites in Some Birds from Eastern Plains of Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(8), p. 1173-1176, 2001.

SAMOUR, J.; HOWLETT, J. C. **Clinical and diagnostic procedures – Blood sampling**. *In*: SAMOUR, J. Avian Medicine. Elsevier 2^a ed., p. 32., 2008.

SCHMIDT, E. M. S.; PAULILLO, A. C.; DITTRICH, R. L.; SANTIN, E.; BELTRAME, O.; MOURA, J.; OLIVEIRA, E. G. Serum Biochemical Parameters in the Ring-Necked Pheasant (*Phasianus colchicus*) on Breeding Season. **International Journal of Poultry Science** 6 (9), p. 673-674, 2007.

SCHRADER, M.; WALTERS, E. L.; JAMES, F. C.; GREINER, E. C. Seasonal prevalence of a haematozoan parasite of red-bellied woodpeckers (*Melanerpes carolinus*) and its association with host condition and overwinter survival. **The Auk** 120(1), p. 130-137, 2003.

SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L.L.; GAFFNEY, P. M. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. **Journal of Parasitology**, 89(5), pp. 1025–1033, 2003.

SEBAIO, F.; BRAGA, E. M.; BRANQUINHO, F.; MANICA, L. T.; MARINI, M. A. Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds: effects of fragment size and habitat dependency. **Bird Conservation Internacional**, 20, p. 432-439, 2010.

SEED, T. M.; MANWELL, R. D. **Plasmodia of birds**. In: Kreier, J.P. (Ed.). Parasitic Protozoa. New York etc.: Academic Press, 3, p. 311–357, 1977.

SOUZA, P. C.A. **Malária aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. De criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental**. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998, 137f.

STOSKOPF, M. K. & BEIER, J. Avian malaria in African black-footed penguins. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 175: 944–947, 1979.

STURROCK, H. & TOMPKINS D.M. Avian malaria parasites in the Dunedin / Otago Peninsula region. *New Zealand Journal of Ecology*, 32, p. 98-102, 2008.

THRALL, M. A. **Laboratory evaluation of plasma and serum proteins.** *In: Veterinary hematology and chemistry.* Philadelphia: Lippincott Williams, p. 401-412, 2004.

VALLE, S. F.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A.; BARCELLOS, L. J. G.; HLAVAC, N. R. C.; FRANÇA, R. T.; LOCATELLI, M. L. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras canindé (*Ara ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n.3, p. 711-716, 2008.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; BROOKS, D. R.; HANELT, B.; BRANT, S. V.; SUTHERLIN, M. E.; CAUSEY, D. Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), p. 555–561, 2004.

VALKIŪNAS, G. **Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia.** CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.

VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C. V. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology*, 92, p. 418-422, 2006.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R. N. M.; BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites. **Journal of Parasitology**, 94(6), p. 1395–1401, 2008.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R. N. M. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. **Journal of Parasitology**, 95(6), p.1512–1515, 2009-a.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA T. A.; LOISEAU, C.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. New malaria parasites of the subgenus *Novyella* in African rainforest birds, with remarks on their high prevalence, classification and diagnostics. **Parasitology Research**, 104, p. 1061-1077, 2009-b.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GAFF, M. L.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaii land birds. **Ecological Monographs**, 56, p. 327-344, 1986.

VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C. T.; SEED, T. M. **Plasmodia of birds**. In: Kreier, J. P. & San Diego, CA (eds.), Parasitic protozoa. Academic Press, p. 73–140, 1994.

VASHIST, U.; FALQUETO, A. D.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; SANTOS, M. A. J.; D'AGOSTO, M.; MASSARD, C. L.; PINHEIRO, J. Hepatic profile of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. **Veterinary Parasitology**, 2011.

ZEHTINDJIEV, P.; KRIANAUSKIENE, A.; BENSCH, S.; PALINAUSKAS, V.; ASGHAR, M.; DIMITROV, D.; SCEBBA, S.; VALKIÜNAS, G. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction–based protocols for amplification of the cytochrome b gene. **Journal of Parasitology**, 98(3), p.657-665, 2012.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, 90, p. 191-194, 2004.

WHITE, E. M.; GREINER, E. C.; BENNETT, G. F.; HERMAN, C.M. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. **Revista de Biología Tropical**, 26, p.43-102, 1978.

WILLIAMS, R. B. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. **Avian Pathology**, v.34, n.1, p.29- 47, 2005.

WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNETT, G. F. Prevalence of avian Haematozoa in São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 84(4), p. 515-526, 1989.

WWF, disponível em: <http://www.wwf.org.br/informacoes/biblioteca/?26722/Guia-de-aves-Mata-Atlantica-Paulista>, acesso em 09/06/11.