

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Malária Aviária em *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781,
Originários da Patagônia Recolhidos na Costa Brasileira**

Aline Falqueto Duarte

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**MALÁRIA AVIÁRIA EM *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781,
ORIGINÁRIOS DA PATAGÔNIA RECOLHIDOS NA COSTA BRASILEIRA**

ALINE FALQUETO DUARTE

Sob a orientação do Professor Dr.
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação da professora Dra.
Usha Vashist

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção
do grau de **Mestre em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Parasitologia

Seropédica, RJ

Março de 2012

636.50896

D812m

T

Duarte, Aline Falqueto, 1985-
Malária aviária em *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781, originários da Patagônia recolhidos na costa brasileira / Aline Falqueto Duarte - 2012.

41 f. : il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.
Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 27-31.

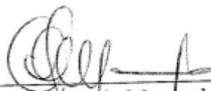
1. Malária aviária - Teses. 2. Pingüins - Doenças - Teses. 3. Malária aviária - Brasil - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

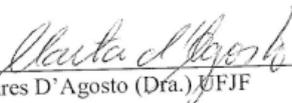
ALINE FALQUETO DUARTE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/03/2012



Carlos Luiz Massard (Dr.) UFRRJ
(Orientador)



Marta Tavares D'Agosto (Dra.) UFRRJ



Adivaldo Henrique da Fonseca (Dr.) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Newton e Isabel, minhas irmãs Míriam e Luísa, e meu amor Renan.

O estímulo, a compreensão, a força e o carinho de vocês foram essenciais para que este trabalho fosse concluído.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelo amparo e por sempre iluminar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard pela orientação, confiança, amizade, pelos valiosos ensinamentos e ajuda na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Usha Vashist pela co-orientação compromissada, pela confiança, incentivo pela pesquisa, e pela grande amizade construída que levarei comigo por toda a vida.

Ao Prof. Dr. Argemiro Sanavria pela oportunidade do nosso primeiro contato com os responsáveis pelos pinguins do Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (FUNDAÇÃO RIOZOO).

Ao diretor técnico da FUNDAÇÃO RIOZOO, Luiz Paulo Luzes Fedullo pela colaboração e confiança ao ceder os animais para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos por ter gentilmente cedido o Laboratório de Microscopia para realizar parte desta pesquisa.

Ao prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos pela ajuda fundamental neste trabalho, pelos ensinamentos e pela disponibilidade sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Leandro Azevedo Santos do Departamento de Solos/IA/UFRRJ pelo auxílio na purificação das amostras para sequenciamento.

Ao motorista Carlos Alberto Correa Barbosa pela boa condução nas viagens em prol desta pesquisa.

À amiga Profa. Dra. Raquel Silva Lisbôa pela amizade, pelos ensinamentos e estímulo.

As doutorandas Aldenice Nazaré Silva Pereira, Cláudia Bezerra da Silva, Milena Batista Carneiro e Vivian Suane Vieira de Freitas pela amizade, companherismo, estímulo e apoio em todos os momentos que precisei.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores Marcos Sandes Pires, Joice Aparecida Rezende Villela, Maristela Peixoto Peckle, Antônio Amélia dos Santos Mucalame Tembue, Juliana Raimundo Macedo e Andressa Guimarães pela disponibilidade e valiosa ajuda prestada em diferentes fases desta pesquisa.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia Animal e funcionários da Estação Experimental para Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ da UFRRJ pelas diferentes formas de auxílio e atenção prestados.

Aos meus pais, Newton Pizzol Duarte e Isabel Falqueto Duarte, pelo apoio em todas as minhas decisões, pela compreensão, carinho, educação e por sempre estarem presentes mesmo com a distância.

À minhas irmãs, Míriam Falqueto Duarte e Luísa Falqueto Duarte, pela compreensão, companherismo, carinho e apoio.

À minha avó Zulmira Pizzol Duarte pelo carinho e presença constante em minha vida.

À minha tia Hilarina Maria Pizzol Duarte pelo estímulo, carinho e palavras de amizade e conforto.

Ao meu namorado Renan Marcondes Dobrovolsky Almada pelo apoio, compreensão, paciência, prontidão em ajudar sempre e principalmente pela incondicional demonstração de companherismo e amizade.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

BIOGRAFIA

ALINE FALQUETO DUARTE, filha de Newton Pizzol Duarte e Isabel Falqueto Duarte, nasceu em 27 de outubro de 1985, na cidade de Venda Nova do Imigrante, estado do Espírito Santo.

Cursou o ensino fundamental na Escola Municipal de Ensino Fundamental Atílio Pizzol e o Ensino Médio na Escola Fundação Deolindo Perim, no município de Venda Nova do Imigrante, estado do Espírito Santo, concluindo os estudos em 2003.

No ano 2005 foi aprovada no vestibular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no curso de Medicina Veterinária, graduando em fevereiro de 2010 como Médica Veterinária. Ao longo da graduação realizou estágios acadêmicos, foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/DPA/IV/UFRRJ, desenvolvendo suas pesquisas com aves silvestres e de produção. Participou de várias atividades laboratoriais e projetos de pesquisa financiados por órgãos de fomento como FAPERJ e CNPq. Faz parte do grupo de pesquisa do professor Carlos Luiz Massard. Durante a XXV Semana do Médico Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, foi agraciada com o Prêmio de Pesquisa Professor Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia, concedido ao melhor trabalho de pesquisa apresentado naquela Jornada Científica, ao estudar malária aviária em *Gallus gallus*, na raça Sedosa do Japão.

Em março de 2010, após seleção por mérito, ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro cumprindo todos os créditos exigidos sempre com conceito A em todas as disciplinas cursadas durante o mestrado, totalizando 25 créditos. Sob a orientação do professor Carlos Luiz Massard participou ativamente na lecionação das disciplinas Agentes Patogênicos Transmitidos por Artrópodes (IV-1418) e Hemoprotozoários de importância Veterinária (IV-1427), acompanhando todas as aulas por 4 períodos consecutivos. Participou também de projetos de pesquisa do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/DPA/IV, auxiliando no desenvolvimento dos trabalhos com malária aviária, causada por *Plasmodium juxtannucleare*, e de projetos com carrapatos como vetores de Babesioses equinas e Riquettsioses dos animais domésticos. No período de graduação e pós-graduação participou também de reuniões científicas, Workshops, seminários e congressos, discutindo e apresentando resultados de suas pesquisas como autora ou co-autora. Participou de cursos especiais, assistiu e ministrou palestras envolvendo parasitoses animais e em especial hemoparasitos de aves, com destaque para o ensino médio e aos estudantes de graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas- Campus Muzambinho/MG.

RESUMO

Duarte, Aline Falqueto. **MALÁRIA AVIÁRIA EM *Spheniscus magellanicus* FORSTER, 1781, ORIGINÁRIOS DA PATAGÔNIA RECOLHIDOS NA COSTA BRASILEIRA.** 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A malária aviária é uma importante doença em pinguins de cativeiro e em seu ambiente natural, e atualmente é considerada a principal causa de morte nesta espécie. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a presença de malária aviária em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) recém chegados à Fundação Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO) após terem sido recolhidos nas praias do Rio de Janeiro e regiões limítrofes. Para o estudo, foram amostradas 44 aves mantidas na Fundação RIOZOO. As aves foram observadas quanto à presença de parasitos e de sinais clínicos relacionados a esses, além disso, analisou-se a prevalência, parasitemia, morfologia e morfometria dos parasitos encontrados. Para confirmar o diagnóstico, realizou-se a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) com o gene mitocondrial genérico para *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* para as cinco aves mais parasitadas; a diferenciação entre os gêneros foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP. Quatro amostras positivas foram enviadas para sequenciamento e o resultado obtido foi comparado com outras sequências do gene mitocondrial do GenBank, o que serviu para construção da árvore filogenética. O estado de saúde geral das aves era grave, apresentando-se prostradas, anêmicas e com fezes de coloração esverdeada. A análise dos esfregaços sanguíneos das aves amostradas revelou a presença de formas evolutivas parasitando eritrócitos, sugestivo de parasitos do gênero *Plasmodium*. Dos 44 pinguins-de-magalhães amostrados 21 estavam parasitados, apresentando prevalência de 47,73%. A parasitemia mais elevada foi de 6,1%. Foram encontrados todas as formas evolutivas de plasmódios: gametócitos, trofozoítos e esquizontes. Morfologicamente, os trofozoítos apresentaram-se ovais ou piriformes, os esquizontes irregularmente esféricos com cerca de 14 merozoítos por esquizontes, os macrogametócitos e microgametócitos apresentavam formato arredondado ou alongado, prevalecendo as formas alongadas. Morfométricamente, os macrogametócitos apresentaram comprimento médio de $10,16 \pm 1,48 \mu\text{m}$ e largura média de $2,40 \pm 0,72 \mu\text{m}$; os microgametócitos apresentaram comprimento médio de $11 \pm 1,03 \mu\text{m}$ e largura média de $2,04 \pm 0,27 \mu\text{m}$; os trofozoítos apresentaram $2,14\mu\text{m}$ para o diâmetro maior e $1,46\mu\text{m}$ para o diâmetro menor, e os esquizontes apresentaram como diâmetro maior $9,14\mu\text{m}$ e $8\mu\text{m}$ como diâmetro menor. Na PCR um fragmento de aproximadamente 160 pares de base foi amplificado, e a diferenciação entre os gêneros confirmou se tratar do gênero *Plasmodium*. O sequenciamento revelou que provavelmente ocorre uma co-infecção de parasitos do gênero *Plasmodium* e que uma das espécies envolvidas é *Plasmodium relictum*.

Palavras-chave: Pinguins-de-magalhães, *Plasmodium relictum*, *Haemaboeba*.

ABSTRACT

Duarte, Aline Falqueto. **AVIAN MALARIA IN *Spheniscus magellanicus* FORSTER, 1781, PATAGONIA ORIGINATING COLLECTED IN THE BRAZILIAN COAST.** 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The avian malaria is an important disease in captive and free living penguins and is currently considered the leading cause of death in this species. Due to the knowledge lack of avian malaria parasite in *Spheniscus magellanicus* this research aimed to evaluate the presence of avian malaria in specimens newcomers to the Zoological Foundation of Rio de Janeiro (RIOZOO) after being collected on the Rio de Janeiro beaches and neighboring regions. For this study, 44 Magellanic penguins kept in RIOZOO Foundation were sampled. The birds were observed for the presence of parasites and clinical signs related to these, in addition, the prevalence, parasitaemia, morphology and morphometry of the parasites found were analyzed. To confirm the morphological and morphometric characterization molecular technique of polymerase chain reaction (PCR) was carried out with the mitochondrial gene for generic *Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* for five birds most affected; differentiation between the genus was performed by PCR-RFLP. Four positive samples were submitted for sequencing and the result was compared with other mitochondrial gene sequences from GenBank, which served to construct the phylogenetic tree. The general health of the birds was serious, showed prostrate with loose stools and anemia. The analysis of blood smears from birds sampled revealed the presence of parasitized erythrocytes evolutionary forms, suggestive of parasites of the genus. Of the 44 Magellanic penguins sampled 21 were parasitized, with prevalence of 47.73%. The higher parasitemia was 6.1%. Found all developmental forms of *Plasmodium*: gametocytes, trophozoites and schizonts. Morphologically, the trophozoites were presented oval or pyriform, irregularly spherical schizonts with merozoites by about 14 schizonts, the macrogametocytes and microgametocytes had rounded or elongated shape, elongated forms prevail. Given the scarcity of trophozoites and schizonts and predominance of gametocytes, morphometric characterizations using the measure of 30 forms were made only for the latter an evolutionary way, the macrogametocytes had a mean length of $10.16 \pm 1.48\mu\text{m}$ and an average width of $2.40 \pm 0.72\mu\text{m}$. Already the microgametocytes had an average length of $11 \pm 1.03\mu\text{m}$ and an average width of $2.04 \pm 0.27\mu\text{m}$. Eight *Plasmodium* trophozoites were measured and the average was $2.14\mu\text{m}$ to $1.46\mu\text{m}$ and diameter to the smallest diameter. As for schizont, only one has been measured as having a larger diameter $9.14\mu\text{m}$ and smaller diameter $8\mu\text{m}$. In a PCR fragment of approximately 160 base pairs was amplified, and differentiation between the genus had measured and confirmed to be the genus *Plasmodium*. Sequencing revealed that probably is a co-infection with parasites of the genus *Plasmodium* and is one of the species involved *Plasmodium relictum*.

Keywords: magellanic penguins, *Plasmodium relictum*, *Haemaboeba*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Pinguins	3
2.2 Malária Aviária.....	4
2.3 Malária em pinguins	5
2.3.1 Gênero <i>Plasmodium</i>	7
2.3.2 Gênero <i>Leucocytozoon</i>	8
2.4 Patogenia da malária aviária.....	9
2.5 Diagnóstico da malária aviária	9
2.6 Controle e tratamento da malária aviária.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Pinguins Amostrados	11
3.2 Esfregaços Sanguíneos	11
3.3 Amostras Sanguíneas.....	11
3.4 Caracterizações Morfológicas e Morfométrica das Formas Evolutivas	11
3.5 Extração do Material Genômico (DNA)	12
3.6 Quantificação e Pureza do Material Genômico (DNA).....	12
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Visualização dos Produtos Amplificados.....	12
3.8 Diferenciação entre os Gêneros: <i>Leucocytozoon</i> , <i>Haemoproteus</i> e <i>Plasmodium</i>	13
3.9 Purificação e Sequenciamento das Amostras	14
3.10 Análises Filogenéticas	14
4 RESULTADOS	16
4.1 Aves Amostradas.....	16
4.2 Análise dos Esfregaços Sanguíneos	16
4.3 Caracterizações Morfológica e Morfométrica das Formas Evolutivas	21
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	21
4.5 Diferenciação entre os Gêneros Pesquisados	22
4.6 Sequenciamento das Amostras e Análise Filogenética	22
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES	27
7 REFERÊNCIAS.....	28
ANEXO I.....	33

1 INTRODUÇÃO

Pinguins são aves marinhas habitantes naturais dos extremos do Hemisfério Sul; vivem em colônias na região da Antártida e em algumas ilhas subantárticas da Nova Zelândia, sendo também encontradas em algumas regiões situadas ao sul da África, da Austrália e da América do Sul. No Brasil a espécie mais comum de ser recolhida é o pinguim-de-magalhães, *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781, que vive ao longo da costa sul da América do Sul, em regiões mais frias e temperadas.

Atualmente, a diminuição das populações de pinguins de todo o mundo não está relacionada à matança para alimentação humana nem à morte por perda da impermeabilidade natural das penas devido à aderência de óleo, uma vez que a maioria das espécies estão sob proteção do governo. A maior causa de morte dessas aves tem sido devido a inúmeras infecções, dentre elas as parasitárias, que estão ocorrendo em decorrência das alterações climáticas (JONES; SHELLAM, 1999) que propiciam o aumento da densidade de vetores invertebrados no habitat natural dessas aves. De forma geral, os fenômenos naturais associados a infecções causadas por hemoparasitos causam sérios impactos sobre a preservação das espécies de pinguins podendo levar ao intenso declínio e até mesmo a extinção de algumas populações (LEVIN et al., 2009). Muitos ectoparasitos e helmintos já foram encontrados em pinguins, porém, atualmente os hemoprotozoários são os mais preocupantes e merecem uma atenção especial, uma vez que causam quadros clínicos graves levando a alta debilidade e mortalidade. Outro fator importante é a migração dos pinguins em busca de alimento, podendo passar longos períodos no mar e eventualmente se perderem do grupo e serem arrastados pelas correntes marinhas para o litoral chegando extremamente debilitados em um ambiente totalmente diferente, repleto de vetores, tornando-os vulneráveis a doenças.

A malária aviária, causada por parasitos dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, pode ser considerada a causa mais importante de mortalidade entre os pinguins em cativeiro e também em ambiente natural, sendo encontrada em todos os continentes e provavelmente em todos os países do mundo. Esta ampla distribuição geográfica pode ser facilmente explicada pela vasta migração das aves, que se expõem a diferentes vetores (GARNHAM, 1966). A evidência de malária em pinguins pode ser confirmada pelos sinais clínicos, pela elevada parasitemia observada no diagnóstico parasitológico por meio de exame de esfregaços sanguíneos e, após a morte do animal, pelos achados de esplenomegalia e edema pulmonar e pela visualização de esquizontes em material histológico. As espécies identificadas como patogênicas para pinguins são *Plasmodium relictum*, *Plasmodium elongatum*, *Plasmodium juxtannucleare* e *Leucocytozoon tawaki* (FLEISCHMAN et al., 1968, STOSKOPF; BEIER, 1979, SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

O estudo hemoparasitológico em pinguins *S. magellanicus*, originários da Patagônia, recolhidos na costa brasileira faz-se necessário porque atualmente as doenças parasitárias têm sido a principal causa de morte nesta espécie. Em outras espécies desse grupo, muitas delas ameaçadas de extinção, existem relativamente poucos trabalhos que tratem deste tema. Além disto, as atuais alterações climáticas e desequilíbrios ambientais causam sérios impactos sobre a conservação das espécies podendo levar ao declínio e até mesmo à escassez de algumas populações. Estudos como este, que envolvem o diagnóstico de parasitos e a observação da sintomatologia clínica nos animais infectados contribuirá para o conhecimento a respeito desta forma de parasitismo, passível de ocorrer na espécie *S. magellanicus* e contribuirá na compreensão da relação parasito-hospedeiro e na elaboração de estratégias de tratamento e profilaxia. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de parasitos causadores da malária aviária em pinguins originários da Patagônia, recolhidos na costa brasileira, por

meio dos sinais clínicos, da morfologia, morfometria e confirmação por meio de técnicas de biologia molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pinguins

Pinguins são aves marinhas pertencentes à ordem Sphenisciformes encontradas apenas no Hemisfério Sul. Embora sejam aves, os pinguins não possuem a capacidade de voar, são especializadas para o nado e mergulho cuja maior diferença perante as aves voadoras são ossos densos, sólidos e não pneumáticos e membros anteriores modificados em nadadeiras que atuam na propulsão; as penas também são adaptadas para a vida na água, sendo todas uniformes em relação ao tamanho por todo o corpo da ave, só diferindo nas asas onde são bem curtas (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Até o momento, são conhecidas 17 espécies de pinguins. No Brasil, a espécie mais comum de ser recolhida é o pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), porém, seguintes outras espécies já foram registradas no território brasileiro: pinguim-de-penacho-amarelo (*Eudyptes chrysocome*), pinguim-de-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) e pinguim-rei (*Aptenodytes patagonicus*) (Figura 1) (VANSTREELS et al., 2011).

Por ser uma espécie migratória, tanto jovens quanto adultos do pinguim-de-magalhães abandonam os sítios reprodutivos após o período de reprodução, que compreende setembro à março, e deslocam-se por correntes oceânicas em busca de boa oferta de alimento (WILLIAMS, 1995, FRERE et al., 1996). Seguem as águas mais frias e ricas em nutrientes da corrente das Malvinas e, conseqüentemente, muitas dessas aves atingem as águas da plataforma continental do Brasil. Geralmente os mais encontrados são animais jovens, cuja características principais são plumagem de cor negro-acinzentada no dorso, ausência das duas faixas peitorais e do arco na face, que deixam os ninhos em busca de independência e de alimento e, por isso, podem se perder dos grupos, enfrentando situações de estresse, aparecendo moribundos ou mortos nas praias (SICK 1997, VANSTREELS et al., 2011, VOOREN; BRUSQUE 1999).

Pinguins-de-magalhães alimentam-se principalmente da espécie de peixe anchoíta (*Engraulis anchoita*), cefalópodes e crustáceos. No Brasil, acredita-se que o principal item alimentar dos pinguins sejam os cefalópodes (FONSECA et al., 2001, PINTO et al., 2007). Seu maior predador é a foca-leopardo, mas outros também podem ser considerados, como tubarões, lobos, leões marinhos e orcas no mar, e skuas, gaivotas e outras aves comedoras de ovos, ratos, canídeos e felídeos locais ou introduzidos, em terra (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Atualmente essas aves vêm sofrendo sérias ameaças tendo como causas principais a redução na abundância de presas devido à pesca comercial, mudanças climáticas, contaminação por óleo e parasitoses (BOERSMA et al., 2008). Fenômenos naturais associados a infecções causadas por parasitos causam sérios impactos sobre a conservação de inúmeras espécies de pinguins podendo levar ao declínio e até mesmo escassez de algumas populações (LEVIN et al., 2009).

Muitos ectoparasitos e helmintos já foram encontrados em pinguins, mas são os hemoprotozoários os mais preocupantes e que merecem uma atenção especial, uma vez que, levam a quadros clínicos graves causando elevada mortalidade. Apesar de serem comuns em aves, esses hemoparasitos ganham maior importância em aves de cativeiro principalmente quando o foco são pinguins (JONES; SHELLAM, 1999). Infecções que foram relatadas em pinguins de cativeiro são consideradas como tendo sido adquiridas localmente ou quando as aves estavam em trânsito.

A importância das hemoparasitoses para as populações em climas polares é considerada nula, uma vez que a escassez de vetores devido ao ambiente marítimo, as condições de seca em torno das colônias e a baixa temperatura são as hipóteses mais plausíveis para explicar a

aparente ausência de hemoparasitos em pinguins no ambiente natural. No entanto, essas vem sendo estudadas em colônias em climas temperados (JONES; SHELLAM, 1999).



Figura 1. Espécies de Pinguins já registradas na costa brasileira. (A. Pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (www.planetasustentavel.abril.com.br); B. Pinguim-de-penacho-amarelo (*Eudyptes chrysocome*) (www.biodiversityexplorer); C. Pinguim-de-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) (www.penguins.cl); D. Pinguim-rei (*Aptenodytes patagonicus*) (www.scarmarbin.be)).

2.2 Malária Aviária

Malária aviária é uma doença infecciosa causada por várias espécies de parasitos sanguíneos dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. É uma infecção muito

comum e frequente nos trópicos e acomete aves domésticas e silvestres, podendo cursar com um quadro grave e levar à morte ou então cursar com um quadro assintomático e raramente fatal, dependendo da espécie aviária envolvida (MASSARD; MASSARD, 1981, SOUZA, 1998, ELISEI, 2005). Os vetores diferem de acordo com o gênero de hemoparasito envolvido; espécies aviárias de *Plasmodium* são transmitidas por mosquitos da tribo Culicini, *Haemoproteus* por moscas da família hipoboscidae e *Leucocytozoon* por espécies de mosquitos da família simuliidae (URQUHART, 1998).

2.3 Malária em pinguins

A malária aviária é considerada a mais importante das doenças parasitárias de pinguins mantidos em cativeiro. O agente de maior prevalência e que causa maior mortalidade é o *Plasmodium relictum* (Figura 2), mas *Plasmodium elongatum* (Figura 3) e *Plasmodium juxtannucleare* (Figura 4) também podem estar envolvido. Parasitos do gênero *Leucocytozoon* também são potenciais patógenos nas regiões endêmicas, sendo já descrito *Leucocytozoon tawaki* (Figura 5) em pinguins (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

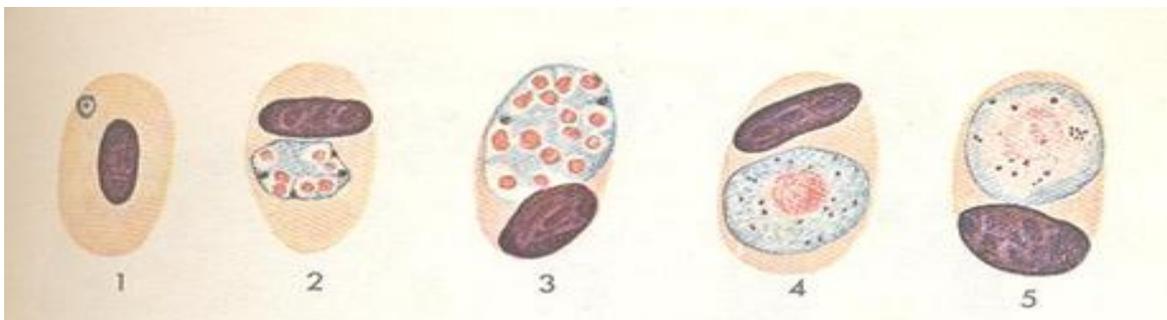


Figura 2. Formas evolutivas intraeritrocíticas de *Plasmodium relictum*: (1) trofozoíto; (2) esquizonte jovem; (3) esquizonte maduro; (4) macrogametócito; (5) microgametócito (Garnhan, 1966).



Figura 3. Formas evolutivas intraeritrocíticas de *Plasmodium elongatum*: (1) trofozoíto; (2-4) esquizonte; (5) macrogametócito; (6) microgametócito (Garnhan, 1966)

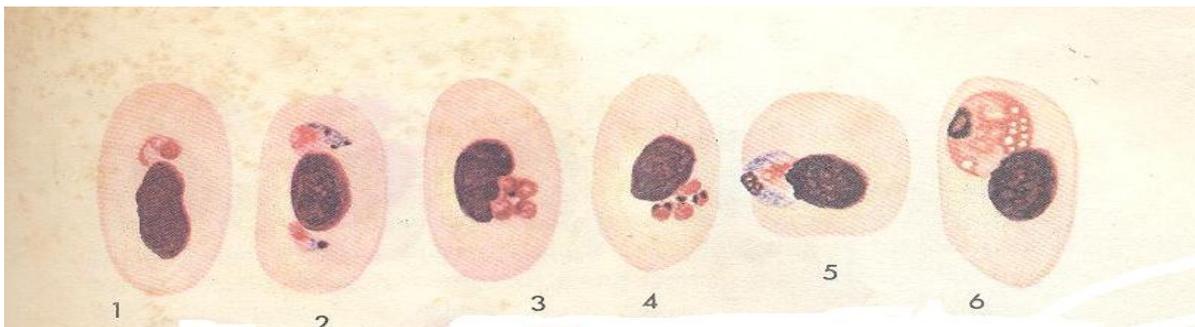


Figura 4. Formas evolutivas intraeritrocíticas de *Plasmodium juxtannucleare*: (1) trofozoíto; (2-4) esquizonte; (5) macrogametócito; (6) microgametócito (Garnhan, 1966).

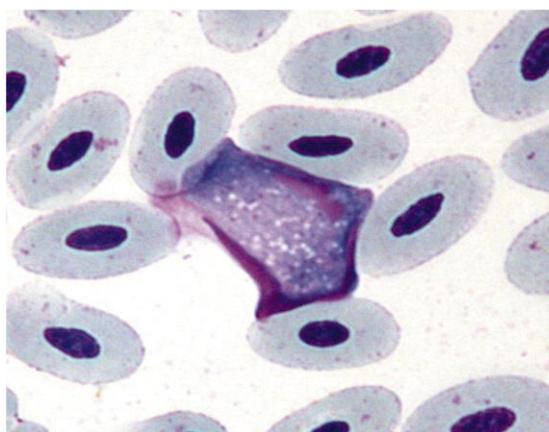


Figura 5. Gametócito de *Leucocytozoon tawaki* (Peirce et al., 2005)

A malária em pinguins já foi descrita em alguns países e o agente envolvido varia de acordo com a localidade. A distribuição da malária aviária em pinguins está assinalada no Quadro 1.

Quadro 1: Distribuição, agentes patogênicos e hospedeiros da malária aviária.

Localidade	Agente envolvido	Espécie de pinguim	Autor
Nova Zelândia; África do Sul; Estados Unidos; Brasil	<i>Plasmodium relictum</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i> ; <i>Spheniscus demersus</i> ; <i>Eudyptes pachyrhynchus</i>	FANTHAM; PORTER, 1944; FIX et al., 1988; BROSSY, 1992; BUENO et al., 2010.
Estados Unidos	<i>Plasmodium elongatum</i>	<i>Spheniscus humboldti</i> ; <i>Spheniscus dermesus</i>	BEIER; STOSKOPF, 1980.
África do Sul	<i>Plasmodium juxtannucleare</i>	<i>Spheniscus dermesus</i>	GRIM et al., 2003.
Inglaterra; África do Sul; Nova Zelândia.	<i>Leucocytozoon tawaki</i>	<i>Eudyptes chrysolophus</i> ; <i>Spheniscus humboldti</i> ; <i>Spheniscus demersus</i>	FALLIS et al., 1976; EARLÉ et al., 1992; PEIRCE, et al., 2005.

2.3.1 Gênero *Plasmodium*

Parasitas do gênero *Plasmodium* são os responsáveis por causar a malária aviária em diversas espécies de aves domésticas e silvestres, estão distribuídos por todos os continentes e provavelmente em todos os países, sendo já registrados em mais de 450 espécies hospedeiras (VAN RIPER III, 1994; DEVICHE et al., 2001; WALDENSTROM et al., 2002; MURATA et al., 2002).

Integrantes deste gênero são parasitos intracelulares sanguíneos e teciduais que possuem em seu ciclo dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Foi observado pela primeira vez na Rússia por Danilewsky em 1885, o qual descreveu a morfologia e os efeitos que *Plasmodium* sp ocasionava nas aves hospedeiras. Após este relato, vários estudos foram realizados utilizando a malária aviária como modelo experimental, sendo o de Ross (1898) um dos estudos pioneiros, que pesquisou a transmissão do agente da malária em aves utilizando pardais infectados com *Plasmodium relictum* e mosquitos do gênero *Culex* (GARNHAM, 1966).

Segundo Valkiūnas (2005) o gênero *Plasmodium* ocupa a seguinte posição taxonômica:

Reino: Protozoa
Sub-Reino: Alveolata
SuperPhylum: Apicomplexa
Phylum: Sporozoa
Classe: Haemosporidea
Ordem: Haemosporida
Família: Plasmodiidae
Gênero: *Plasmodium*

Existem cerca de 450 espécies de plasmódios, sendo que 75 são aviários e ocorrem em todos os continentes em aves migratórias ou não (GARNHAM, 1966; VAN RIPPER III et al., 1994). Os plasmódios são divididos em 5 subgêneros, sendo eles: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennetinia* (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Morfológicamente, esses subgêneros são caracterizados da seguinte maneira:

Haemamoeba: com grandes esquizontes eritrocíticos e gametócitos arredondados.

Giovannolaia: com grandes esquizontes eritrocíticos e gametócitos alongados.

Novyella: com pequenos esquizontes eritrocíticos e gametócitos ovais ou alongados.

Huffia: com grandes esquizontes eritrocíticos e gametócitos alongados, e com acentuada preferência por estágios imaturos do sistema hematopoiético.

Bennetinia: com esquizontes de citoplasma escasso e gametócitos ovais ou arredondados.

Bennet (1970), estudando a sequência evolutiva dos sub-gêneros dos plasmódios aviários *Haemamoeba*, *Giovannolaia* e *Novyella*, concluiu que *Novyella* era o mais evoluído, devido à sua especificidade em relação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, redução do número de merozoítos, redução do tamanho do parasito e grau de distorção da célula hospedeira. Através da classificação dos plasmódios em subgêneros fica mais fácil a identificação das espécies por meio da análise morfológica em esfregaços sanguíneos realizado por microscopia fotônica (VAN RIPER III et al., 1994).

Os parasitos do gênero *Plasmodium* podem ser transmitidos com relativa facilidade entre os hospedeiros a partir do repasto sanguíneo de vetores, geralmente dípteros ornitofílicos da família Culicidae, e principalmente dos gêneros *Culex*, *Aedes* e raramente do gênero *Anopheles*, com conseqüente inoculação de esporozoítos (VAN RIPER III et al., 1994).

O ciclo biológico dos plasmódios aviários é constituído de três fases: A) Fase exoeritrocítica, que ocorre no hospedeiro vertebrado, sendo subdividida em fase pré-eritrocítica e fase exoeritrocítica propriamente dita; B) Fase eritrocítica, que ocorre no hospedeiro vertebrado; C) Fase esporogônica, que ocorre no hospedeiro invertebrado (vetor).

O mosquito ao realizar o repasto sanguíneo inocula no hospedeiro vertebrado esporozoítos, que são as formas infectantes, presentes em suas glândulas salivares. Os esporozoítos invadem células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) e fibroblastos da pele, onde evoluem para trofozoítos e através de esquizogonia originam esquizontes que multiplicam-se assexuadamente e dão origem a merozoítos (o mesmo ciclo esquizogônico repete-se durante algumas gerações). Finalmente, os merozoítos invadem eritrócitos, evoluindo para trofozoítos e novas esquizogonias ocorrem dando origem a merozoítos sanguíneos. Após algumas gerações de merozoítos, algumas formas diferenciam-se em gametócitos que podem ser do tipo macrogametócito ou feminino e microgametócito ou masculino. Os gametócitos não se dividem e ao chegarem no estômago do mosquito, através do repasto sanguíneo, o microgametócito passa por um processo de exflagelação dando origem a microgametas que se fundem a um macrogametócito formando o zigoto, este dá origem a uma forma móvel, o oocineto que penetra na parede do intestino dos insetos vetores, fixando-se na sub-serosa, onde amadurece e origina o oocisto por um processo denominado esporogonia. No interior do oocisto, formam-se os esporocistos que contém inúmeros esporozoítos. A ruptura dos esporocistos possibilita a liberação de esporozoítos que migram para a glândula salivar, onde os esporozoítos completam sua maturação, acumulando-se por fim nos túbulos excretores e sendo assim inoculados, com a saliva, no hospedeiro vertebrado, e deste modo, fechando o ciclo biológico (GARNHAM, 1966; MC GHEE et al., 1988).

2.3.2 Gênero *Leucocytozoon*

Parasitas do gênero *Leucocytozoon* são encontrados em células sanguíneas e teciduais, sendo exclusivo de aves domésticas e silvestres, apresentando como característica grande especificidade de hospedeiro (GARNHAM, 1966). Afeta aves em qualquer idade, porém, em animais jovens a morbidade pode ser elevada com alta taxa de mortalidade (VALKIÛNAS, 2005).

A merogonia não ocorre nas células sanguíneas. No sangue das aves observa-se apenas a presença de gametócitos, que são grandes e alongados, chegando na maioria das vezes a alterar a estrutura da célula. Os gametócitos desenvolvem-se em eritroblastos, eritrócitos e leucócitos mononucleares (VALKIÛNAS, 2005).

Segundo Valkiūnas (2005) o gênero *Leucocytozoon* ocupa a seguinte posição taxonômica:

Reino: Protozoa

Sub-Reino: Alveolata

SuperPhylum: Apicomplexa

Phylum: Sporozoa

Classe: Haemosporidea

Ordem: Haemosporida

Família: Leucocytozoidae

Gênero: *Leucocytozoon*

Existem cerca de 60 espécies do gênero *Leucocytozoon* (BENNET et al., 1994) todas elas específicas para um determinado hospedeiro, pelo menos a nível de família (PEIRCE,

2000). Dentro deste gênero, encontramos apenas 2 subgêneros, sendo eles: *Leucocytozoon* e *Akiba* (VALKIŪNAS, 2005), e são caracterizados da seguinte maneira:

Leucocytozoon: gametócitos são arredondados e/ou fusiformes, e são encontrados em eritrócitos e/ou leucócitos mononuclear.

Akiba: gametócitos somente arredondados e são encontrados apenas em eritrócitos.

Parasitas do gênero *Leucocytozoon* são transmitidos por mosquitos do gênero *Simulium*. A infecção só ocorre se o vetor existir (REIS; NOBREGA, 1956).

O ciclo de parasitos do gênero *Leucocytozoon*, de modo geral, pode ser explicado da seguinte maneira: Através da picada, os esporozoítos presentes na glândula salivar do mosquito caem na circulação do hospedeiro vertebrado e atingem o parênquima hepático, onde a primeira geração de esquizontes se desenvolve. As gerações seguintes de esquizontes podem se desenvolver no cérebro, coração, pulmões, rins, intestino ou nos outros tecidos linfóides, formando megaloesquizontes. Nos megaloesquizontes ocorre o desenvolvimento dos merozoítos e quando esses estão maduros são liberados para corrente sanguínea e infectam monócitos, linfócitos e eritrócitos imaturos, originando os gametócitos (macrogametócito e microgametócito). Ao realizar o repasto em uma ave infectada, o inseto vetor ingere essas células produtoras de gametas. No estômago do mosquito, o microgametócito passa por um processo de exflagelação dando origem a microgametas que se fundem a um macrogametócito formando o zigoto, este dá origem a uma forma móvel, o oocineto que penetra na parede do intestino dos insetos vetores onde amadurece e origina o oocisto. No interior do oocisto, formam-se os esporocistos que contém inúmeros esporozoítos. A ruptura dos esporocistos possibilita a liberação de esporozoítas que migram para a glândula salivar sendo inoculados, com a saliva, no hospedeiro vertebrado, fechando, desta maneira o ciclo biológico (SCHMIDT; ROBERTS, 2007).

2.4 Patogenia da malária aviária

As infecções causadas por hemoprotozoários demonstram ser bastante variáveis, apresentando desde expressão assintomática a casos de óbito. Esses protozoários parecem ter relação comensal com a maioria de seus hospedeiros apresentando patogenicidade somente sob circunstâncias especiais (JULIAN; GALT, 1980). De maneira geral, parasitos causadores da malária aviária podem ter um forte impacto negativo em seus hospedeiros especialmente quando a espécie de ave é exposta a este parasito pela primeira vez, quando ocorrem casos de imunossupressão gerada por um fator qualquer e também pelo nível de parasitemia (GARNHAM, 1966). Apesar das parasitoses serem responsáveis por extinções de espécies silvestres, na maioria das vezes causa de mortalidade só tem sido identificada *a posteriori* (MCCALLUM; DOBSON, 1995).

A infecção nas aves em geral cursa com um quadro de anemia, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos (sonolência, parestia das patas, balançar de cabeça e tremores) e, nos casos de altas parasitemias, prostração e morte (GRIM et al., 2003, VASHIST et al., 2009). Além disso, Atkinson et al. (2000) verificaram experimentalmente que aves infectadas por *Plasmodium relictum* apresentaram significativo declínio no consumo de alimentos e perda de peso após 60 dias de infecção.

2.5 Diagnóstico da malária aviária

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela análise de esfregaços sanguíneos obtidos por venopunção, principalmente. Geralmente, os esfregaços são fixados em metanol e corados em Giemsa. Os caracteres morfológicos e morfométricos dos estágios evolutivos presentes no sangue como forma, tamanho dos esquizontes, número de esquizontes e forma dos gametócitos do hemoparasito auxiliam na identificação da espécie. Apesar deste método

apresentar algumas desvantagens como a dificuldade de identificação do hemoparasito durante as fases crônicas ou latentes, que correspondem à situação da maioria das aves infectadas, ele ainda é considerado essencial para a detecção do parasito na ave, sendo utilizado extensivamente como método de diagnóstico padrão (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991).

Clinicamente a malária aviária causa curso semelhante à leucose linfóide aviária, tifo aviário, doença de Marek na forma visceral, colibacilose, borreliose e outras doenças infecciosas (HOFSTAD 1978, SOUZA, 1998), daí a importância do diagnóstico diferencial baseado no exame laboratorial.

Técnicas de biologia molecular também podem ser utilizadas para o diagnóstico da malária aviária, mas em geral esta técnica é mais laboriosa e cara em relação às análises hematológicas e imunológicas, e é utilizada quando há dúvida a respeito da espécie de hemoparasito em questão ou em estudos de filogenia. Para isto, podem ser utilizados o gene da região do ribossomo nuclear e gene mitocondrial para a caracterização molecular do parasito (ELISEI, 2005).

2.6 Controle e tratamento da malária aviária

Para evitar que as aves recém chegadas aos centros de reabilitação venham a óbito é importante estabelecer medidas de controle e tratamento que, apesar de serem simples, dificilmente são adotadas pelas entidades responsáveis por recolher pinguins. De modo geral, minimizar o estresse e proporcionar nutrição, substrato e ventilação adequados são essenciais para aves saudáveis (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

O manejo adequado e bem sucedido de pinguins em cativeiro está intimamente relacionado às condições do recinto, por isso é importante deixar à disposição das aves uma piscina e uma área de sombra, área seca e livre de fungos, área para construção de ninhos e boa ventilação (VANSTREELS et al., 2011). Além disso, deve-se evitar a exposição das aves aos mosquitos devido à sua alta sensibilidade às hemoparasitoses, dentre elas a mais temida malária aviária, e tal ação pode ser tomada por meio da instalação de telas e dedetização dos arredores do recinto com inseticidas piretróides a cada três semanas (RUPPOLO et al., 2004).

Além do controle e erradicação de vetores deve-se detectar e tratar precocemente as aves infectadas que serviriam como fonte de infecção para os mosquitos. Assim como na malária humana, os principais tratamentos da malária aviária são os derivados do quinino, como a cloroquina (VASHIST et al. 2009), que é a droga mais comumente utilizada no tratamento de todas as formas de malária por ser eficaz, acessível e de baixo custo (KRETTLI et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pinguins Amostrados

Foram amostrados neste estudo 44 pinguins-de-magalhães (*S. magellanicus*) mantidos no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (Fundação RIOZOO). Foram realizadas duas coletas em anos distintos, uma em outubro de 2008 onde foram avaliadas 27 aves que estavam no zoológico há mais de dois meses, e outra coleta em julho de 2011 onde foram avaliadas 17 aves recolhidas nas praias litorâneas do Rio de Janeiro e regiões limítrofes na noite anterior ao dia da coleta. No momento da coleta, todas as aves foram observadas quanto ao estado de saúde e aos sinais clínicos decorrentes das infecções por hemoparasitos como, prostração, palidez, paralisia, incoordenação motora, flacidez muscular, falta de propriocepção, presença de higromas, penas eriçadas e aparência das fezes (coloração, consistência e presença de sangue).

3.2 Esfregaços Sanguíneos

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de cada uma das 44 aves para análise parasitológica. Os esfregaços foram fixados com metanol por três minutos, corados segundo o método de Giemsa e analisados em microscópio fotônico (Olympus CX 41[®]). Os parasitos encontrados foram fotografados em microscópio Olympus BX51[®] com câmera acoplada.

Para avaliação da prevalência e da parasitemia de cada ave, foram analisados 100 campos por lâmina.

A prevalência foi calculada segundo Margolis et al., (1982):

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{nº de hospedeiros infectados}}{\text{nº de hospedeiros examinados}} \times 100$$

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

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados} \times 100}{10.000} \therefore \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados}}{100}$$

3.3 Amostras Sanguíneas

Foram coletadas amostras sanguíneas de apenas cinco pinguins-de-magalhães para a realização de análises moleculares, pois as 39 aves restantes apresentaram-se extremamente debilitadas não permitindo a coleta de sangue. Foram coletados 3mL de sangue por meio de venipunção metatarsal medial utilizando seringa de 5mL e agulha hipodérmica 0,80x25mm após contenção manual. O sangue foi armazenado em tubos tipo Vacutainer[®] contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético de sódio) como anticoagulante e mantido em freezer a temperatura de -20°C. Das outras 39 aves, foram confeccionados esfregaços sanguíneos em duplicata para extração do DNA genômico do sangue fixado na lâmina.

3.4 Caracterizações Morfológicas e Morfométrica das Formas Evolutivas

Foram realizadas análises morfológicas descritivas e morfométricas, utilizando-se os esfregaços sanguíneos de todas as aves parasitadas. Foram mensurados o diâmetro maior (dM) e diâmetro menor (dm), ambos utilizados para o cálculo do índice morfométrico (IM=dm/DM) (ELISEI et al., 2001). As formas evolutivas foram observadas em microscópio fotônico (Olympus BX 51[®]), medidas com auxílio do programa Image Pro-plus 5.0 e fotografadas com câmera Sony Cyber-shot[®].

3.5 Extração do Material Genômico (DNA)

Para extração do DNA genômico utilizou-se o kit para extração de sangue de mamíferos Promega[®] Madison, WI, USA com algumas adaptações. Para a extração do DNA oriundo das amostras sanguíneas de lâmina utilizou-se uma lâmina de bisturi aço de carbono n° 15 Solidor[®] para a raspagem do esfregaço; todo o conteúdo resultante da raspagem foi colocado dentro de microtubos de polipropileno (Axygen[®]) com capacidade máxima de 1,5ml devidamente identificados contendo 200µl PBS, pH 7,2 (Tampão fosfato-salino). A mistura foi homogeneizada por 10 minutos em *vortex* e, em seguida, adicionaram-se 20µl de proteinase K (20mg/mL). Os tubos foram homogeneizados em *vortex* novamente por 20 segundos. Após essa etapa, 200µl da solução CLD foi adicionado em cada tubo e homogeneizado em *vortex* por 20 segundos. Cada amostra foi incubada em banho-maria à 56°C por 1 hora, sendo que, a cada 10 minutos o conteúdo era homogeneizado por inversão. Foram adicionados 250µl da solução Binding Buffer (BBA) ao tubo e homogeneizado em *vortex* por 20 segundos. Todo o conteúdo presente no microtubo foi transferido para a coluna Reliaprep[™] Binding acoplada a um tubo de coleta e centrifugado a 14.500rpm por 1 minuto permitindo que todo o líquido passasse pela coluna e ficasse armazenado no tubo de coleta. O tubo de coleta foi removido e o líquido nele presente foi descartado. Novamente, o tubo coletor foi acoplado a coluna Reliaprep[™] Binding e 500µl de solução Col Wash Solution (CWD) foi adicionado para uma nova centrifugação a 14.500rpm por 3 minutos. Esta etapa anterior foi realizada mais 2 vezes para fazer a lavagem do DNA presente na coluna totalizando ao término 3 lavagens. Finalmente, a coluna Reliaprep[™] Binding foi acoplada a um microtubo de polipropileno (Axygen[®]) com capacidade máxima de 1,5ml e 50µl de água livre de nucleases foi adicionado a coluna e aguardado um tempo de 15 minutos. O conjunto coluna e microtubo foi centrifugado a 14.500 rpm por 1 minuto.

Para a extração do DNA oriundo das amostras de sangue total (220µL) foi utilizado o kit ReliaPrep[™] Blood gDNA Miniprep System (Promega[®] Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 Quantificação e Pureza do Material Genômico (DNA)

A determinação da concentração e pureza do DNA total das amostras foram feitas em espectrofotômetro Life Science Analyser (Boeco[®]) sob absorvância de 280nm (A_{280}). A relação de absorvância 260nm (A_{260})/280nm(A_{280}) forneceu a pureza do DNA genômico, sendo considerada amostra pura com relação superior a 1,8. Com base nas concentrações obtidas das quantificações, não foi necessário diluir as amostras para utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR), uma vez que todas estavam em uma concentração final estimada em 30ng/µl.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Visualização dos Produtos Amplificados

As amostras de DNA, extraído de lâminas, das cinco aves mais parasitadas e das cinco aves cujo DNA foi extraído de sangue total, foram submetidas à PCR para amplificação de um fragmento de 160pb do gene mitocondrial genérico para espécies de *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Para essa análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 213 GAGCTATGACGCTATCGA-F e 372 GGAATGAGAGTTCACCGTTA-R (BEADELL; FLEISCHER, 2005). Como controle positivo, foi utilizado sangue de uma ave (*Gallus gallus*) infectada com *Plasmodium juxtannucleare* mantida na Estação para Pesquisa Parasitológica W. O. Neitz, e como controle negativo, foi utilizado água ultrapura. Todas as reações foram realizadas com volume final de 25µL, contendo: 6,5µL de água ultrapura, 12,5µL de Master Mix (Promega[®] Madison, WI, USA), 0,6µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3µL (aproximadamente 90ng) de DNA total. O mix das reações de PCR foi preparado em câmara de fluxo laminar vertical (Trox[®] technik), a fim de evitar riscos de contaminação. O programa de

amplificação foi composto por um passo de desnaturação inicial a 94°C por 8 minutos seguidos de 45 ciclos de amplificação a 92°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Todos os produtos amplificados gerados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen[®]), sendo aplicados 8µl do produto da amplificação junto com 2µl de tampão da amostra do tipo III (6X), respectivamente, por canaleta do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por uma hora e 15 minutos a 100 volts, com tampão tris – EDTA – acetato, pH 8,0 (TAE - 1X) como fluido condutor de corrida. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um padrão de peso molecular 1Kb DNA Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]). O gel foi corado em solução de brometo de etídio 5µg/µL (Ludwig-Biotec[®]) por 10 minutos, colocado em água destilada por 30 minutos e por fim, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (U.V.) em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia[®]).

3.8 Diferenciação entre os Gêneros: *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* e *Plasmodium*

As amostras que amplificaram um fragmento de 160pb na PCR foram submetidas à técnica de análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) que consiste no uso de enzimas de restrição para a diferenciação entre os gêneros de parasitos, para identificação do gênero *Leucocytozoon* é visualizada uma banda de aproximadamente 109pb e exatamente 54pb, para o gênero *Haemoproteus* uma banda de exatamente 121pb e para o gênero *Plasmodium* é visualizada uma banda de aproximadamente 160pb. Para identificar o gênero *Leucocytozoon* foi utilizada a enzima de restrição *XbaI* (Promega[®] Madison, WI, USA), conforme Beadell; Fleischer (2005). Todas as reações foram realizadas com um volume final de 20µL em microtubos de polipropileno de 0,6mL (Axygen[®]) contendo: 9,3µL de água ultrapura, 2µL de tampão 10X, 0,2µL de soro bovino (BSA), 0,5µL (5U) de enzima de restrição *XbaI* e 8µL do produto de PCR. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria à 37°C por 3 horas para a etapa de digestão. Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% (Invitrogen[®]), sendo aplicados 6µl do produto junto com 2µl de tampão da amostra do tipo III (6X) por canaleta do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por uma hora e 15 minutos 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 foi adicionado um padrão de massa molecular 50 bp DNA Ladder (Invitrogen[®]). O gel foi corado em solução de brometo de etídio 5µg/µL (Ludwig-Biotec[®]) por 10 minutos, colocado em água destilada por 30 minutos e por fim, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (U.V.) em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia[®]).

Para a diferenciação entre os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* foi utilizada a enzima de restrição *XmnI* (Promega[®] Madison, WI, USA), conforme descrito por Beadell e Fleischer (2005). Todas as reações foram realizadas com um volume final de 20µL em microtubos de polipropileno (eppendorf[®]) com capacidade máxima de 0,6µL contendo: 9,3µL de água ultrapura, 2µL de tampão 10X, 0,2µL de soro bovino (BSA), 0,5µL (5U) de enzima de restrição *XmnI* e 8µL do produto de PCR. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 3 horas para a etapa de digestão. Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% (Invitrogen[®]), sendo aplicados 6µl do produto junto com 1µl de tampão da amostra do tipo III (6X) por canaleta do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por uma hora e 15 minutos a 100 volts. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 5µg/µL (Ludwig-Biotec[®]) por 10 minutos, colocado em água destilada por 30 minutos e por fim, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (U.V.) em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia[®]).

3.9 Purificação e Sequenciamento das Amostras

As amostras positivas na PCR foram submetidas novamente a amplificação de um fragmento de 160pb do gene mitocondrial. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50µL seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.7.

Os produtos de PCR foram purificados através do Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega® Madison, WI, USA) com algumas adaptações. Dentro de microtubos de polipropileno (Axygen®) com capacidade máxima de 1,5ml foi adicionado 95µL do produto de PCR juntamente com 95µL da solução Blind Solution e a mistura foi homogeneizada com uma pipeta. Em seguida, a solução foi transferida para uma coluna Reliaprep™ Binding acoplada a um tubo coletor e aguardou-se 1 minuto. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado a 16.000g por 1 minuto a temperatura de 20°C. O tubo de coleta foi removido e o líquido nele presente foi descartado. Em seguida, o tubo coletor foi acoplado mais uma vez a coluna Reliaprep™ Binding e 700µl da solução de lavagem (Wash Solution) foi adicionado. O tubo foi centrifugado a 16.000g por 5 minutos a temperatura de 20°C; descartou-se o líquido nele presente e o tubo foi acoplado novamente a coluna Reliaprep™ Binding para mais uma lavagem com 500µl da solução de lavagem. Novamente, os tubos foram centrifugados a 16.000g por 5 minutos a temperatura de 20°C e em seguida descartou-se o líquido juntamente com o tubo de coleta. Finalmente, a coluna Reliaprep™ Binding foi acoplada a um microtubo de polipropileno (Axygen®) com capacidade máxima de 1,5ml e o conjunto centrifugado a 16.000g por 2 minutos a temperatura de 20°C; após essa etapa, aguardou-se dois minutos e adicionou-se 30µL da solução Nuclease. Incubou-se o tubo por 7 minutos a temperatura ambiente e após esse tempo, foi centrifugado a 16.000g a temperatura de 20°C por 1 minuto. Ao final da purificação, a concentração dos produtos da PCR das amostras foi aferida em espectrofotômetro NanoDrop 2000 utilizando 2µL de cada amostra.

As amostras purificadas foram enviadas para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). Os eletroesferogramas foram analisados por meio do software Sequencer Scanner v. 1.0 e as sequências obtidas foram editadas utilizando o software Mega v. 4.0 (TAMURA et al., 2005). A identidade do fragmento de 160pb do gene mitocondrial genérico para *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* sequenciado foi analisada através do alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta Basic Alignment Search Tool (BLAST).

3.10 Análises Filogenéticas

Após o alinhamento, as sequências dos produtos correspondentes das PCRs obtidas com o primer 213/372 foram comparadas com as outras sequências do gene mitocondrial depositadas no GenBank (Tabela 1) por médias de múltiplos alinhamentos utilizando-se o Algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1999). A árvore filogenética foi inferida utilizando-se a análise Neighbor-joining, pela média do software MEGA4 com um bootstrap de 1.000 replicações e distâncias evolutivas ajustadas segundo o parâmetro Kimura-2 de substituição de nucleotídeo (TAMURA et al., 2007).

Tabela 1. Parasitos utilizados na análise filogenética para o gene mitocondrial com seu respectivo número de acesso no GenBank.

Parasito	Nº de acesso GenBank
<i>Plasmodium relictum</i>	AY733088
<i>Plasmodium relictum</i>	AY733089
<i>Haemoproteus</i>	AY733087
<i>Plasmodium vivax</i>	NC_007243.1
<i>Plasmodium simium</i>	NC_007233.1
<i>Plasmodium knowlesi</i>	NC_007232.1
<i>Leucocytozoon caulleryi</i>	NC_015304.1
<i>Leucocytozoon majoris</i>	FJ168563.1
<i>Leucocytozoon fringillinarum</i>	FJ168564.1
<i>Leucocytozoon majoris</i>	NC_012450.1
<i>Leucocytozoon sabrazezi</i>	NC_009336.1
<i>Plasmodium vivax</i>	JN788776.1
<i>Plasmodium vivax</i>	JN788772.1
<i>Plasmodium vivax</i>	JN788742.1
<i>Plasmodium reichenowi</i>	NC_002235.1
<i>Plasmodium falciparum</i>	NC_002375.1
<i>Plasmodium berghei</i>	NC_015303.1
<i>Plasmodium falciparum</i>	GQ282129.1
<i>Plasmodium falciparum</i>	GQ282077.1
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	NC_008288.1
<i>Plasmodium juxtannucleare</i>	NC_008279.1

4 RESULTADOS

4.1 Aves Amostradas

Dos 44 pinguins-de-magalhães amostrados, 17 eram recém chegados ao RIOZOO, recolhidos nas praias do Rio de Janeiro e regiões limítrofes, essas aves encontravam-se sujas de óleo e pesando em média 1,5kg, o estado de saúde geral das aves era grave, apresentando-se prostradas, anêmicas e com fezes aquosas (Figura 6). A alimentação era forçada.



Figura 6. *Spheniscus magellanicus* recém chegados ao RIOZOO.

4.2 Análise dos Esfregaços Sanguíneos

A análise dos esfregaços sanguíneos das aves amostradas revelou a presença de formas evolutivas parasitando eritrócitos, sugestivas de parasitos do gênero *Plasmodium*.

Dos 44 pinguins-de-magalhães amostrados 21 estavam parasitados, apresentando prevalência de 47,73%. Das 21 aves parasitadas, todas estavam no zoológico há mais de dois meses, nenhum pinguim recém-chegado ao RIOZOO apresentou algum parasito malárico. A parasitemia dos pinguins-de-magalhães amostrados encontra-se na Tabela 2. Foram encontrados todas as formas evolutivas de plasmódios: gametócitos (Figura 7), trofozoítos (Figura 8) e esquizontes (Figura 9). As formas evolutivas encontradas por ave amostrada encontram-se na Tabela 3. Verificou-se em três pinguins amostrados uma alta ocorrência de gametócitos (aves número 2, 6 e 11), no entanto, nas demais aves amostradas prevaleceu a ocorrência de trofozoítos.

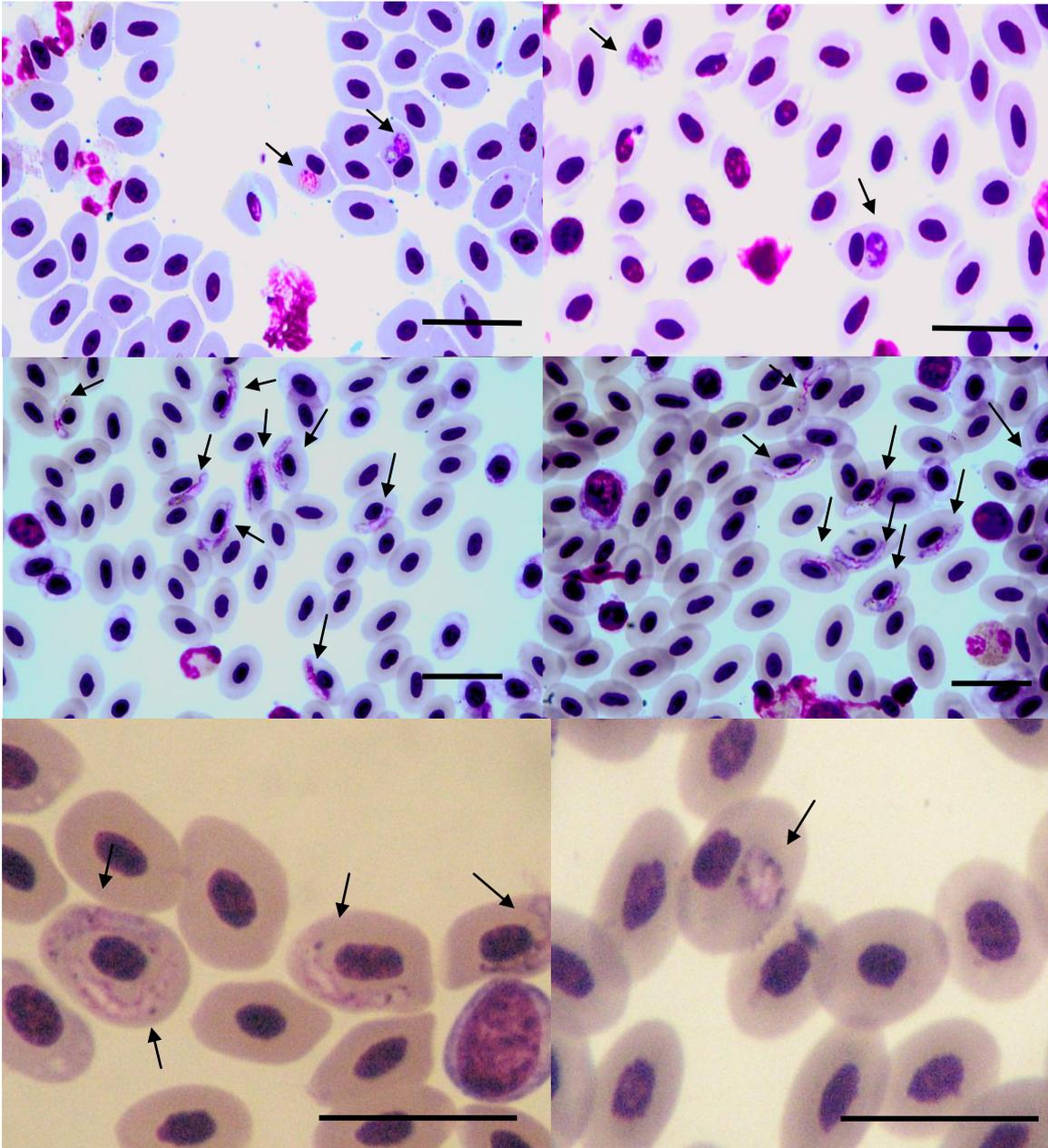


Figura 7. Gametócitos de Plasmódio encontrado em *S. magellanicus* mantidos no RIOZOO (Barra=20µm).

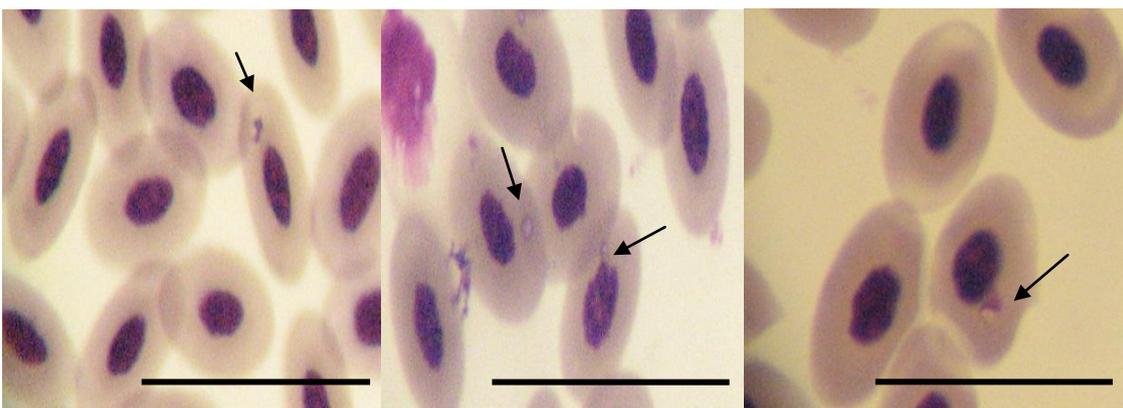


Figura 8. trofozoítos de Plasmódio encontrado em *S. magellanicus* mantidos no RIOZOO (Barra=20µm).

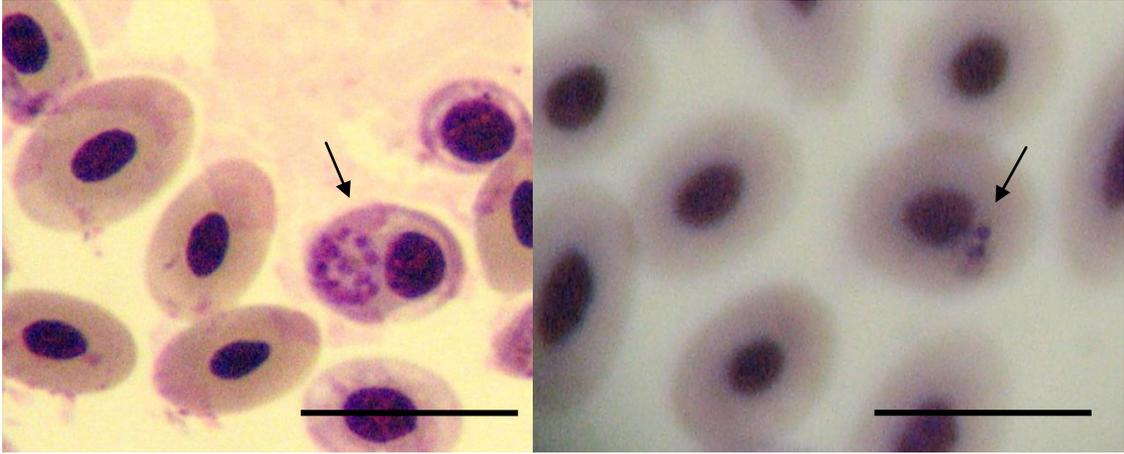


Figura 9. Esquizontes de Plasmódio encontrado em *S. magellanicuss* mantidos n RIOZOO (Barra=20 μ m).

Tabela 2. Parasitemia de *S. magellanicus* amostrados.

Pinguim (n°)	Parasitemia (%)
1	0,06
2	6,1
3	0,07
4	0,01
5	0
6	1,57
7	0,02
8	0,02
9	0,06
10	0,02
11	0,67
12	0,04
13	0,09
14	0,05
15	0,07
16	0,02
17	0,11
18	0,04
19	0
20	0
21	0,1
22	0,08
23	0,06
24	0
25	0
26	0
27	0,01
28	0
29	0
30	0
31	0
32	0
33	0
34	0
35	0
36	0
37	0
38	0
39	0
40	0
41	0
42	0
43	0
44	0

Tabela 3. Formas evolutivas do gênero *Plasmodium* encontradas em *S. magellanicus* mantidos no RIOZOO.

Pinguim (n°)	Trofozoíto	Esquizonte	Gametócito
1	5	0	1
2	7	17	586
3	1	3	3
4	0	0	1
5	0	0	0
6	11	12	134
7	1	0	1
8	2	0	0
9	5	0	1
10	0	2	0
11	5	1	65
12	4	0	0
13	9	0	0
14	5	0	0
15	6	1	0
16	2	1	0
17	9	2	0
18	4	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	7	2	1
22	7	1	0
23	3	2	1
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	1	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0

4.3 Caracterizações Morfológica e Morfométrica das Formas Evolutivas

Morfologicamente, os trofozoítos apresentaram-se ovais ou piriformes, esquizontes irregularmente esféricos com cerca de 14 merozoítos por esquizontes, os macrogametócitos e microgametócitos possuíam formato arredondado ou alongado. As formas predominantes foram as alongadas.

Devido à escassez de trofozoítos e esquizontes e predominância de gametócitos, as caracterizações morfométricas utilizando a medida de 30 formas foram feitas apenas para esta última forma e o resultado da análise segue na Tabela 4. Oito trofozoítos de plasmódio foram medidos e a média encontrada foi de 2,14 μ m para o diâmetro maior e 1,46 μ m para o diâmetro menor. Já para esquizonte, apenas um foi medido, apresentando como diâmetro maior 9,14 μ m e 8 μ m como diâmetro menor.

Tabela 4. Morfometria dos plasmódios encontrados em *S. magellanicus* mantidos no RIOZOO.

Formas evolutivas	Morfometria (Médias)		
	dM*	dm*	IM*
Microgametócitos	11 μ m	2,04 μ m	0,18 μ m
Macrogametócitos	10,15 μ m	2,39 μ m	0,23 μ m

* dM= diâmetro maior, dm= diâmetro menor, IM= índice morfométrico (dm/dM).

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase revelou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 160pb apenas para as amostras oriundas da raspagem de lâmina, o que permite afirmar que o parasito visualizado é um parasito malárico (Figura 10). Nenhuma amplificação foi observada nas amostras oriundas do sangue total, confirmando o resultado negativo feito por meio da análise do esfregaço sanguíneo.

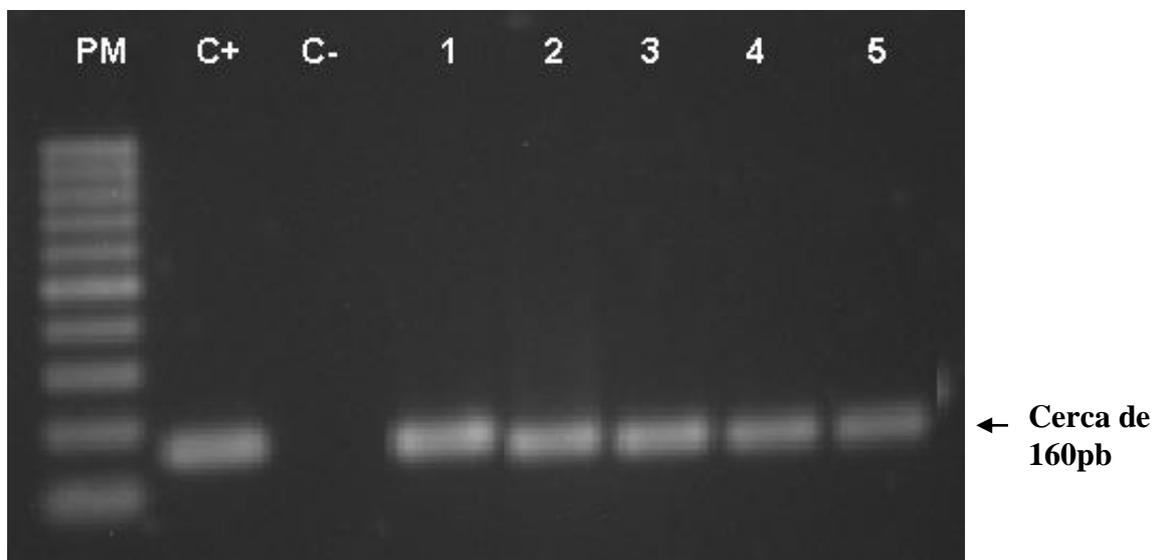


Figura 10. Perfil de bandas da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores do gene mitocondrial completo genérico para *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. (PM): peso molecular, [C+]: controle positivo, [C-]: controle negativo, [1-5]: amostras positivas (pinguins n° 152, 167, 118, 117 e 173).

4.5 Diferenciação entre os Gêneros Pesquisados

A digestão dos produtos da PCR das amostras positivas com a enzima de restrição *XbaI* revelou que não havia a presença de hemoparasitos do gênero *Leucocytozoon* nas amostras amplificadas, uma vez que não verificou o corte de um fragmento de aproximadamente 109pb e exatamente 54pb e sim, um único corte de aproximadamente 160pb.

A digestão com a enzima *XmnI* também confirmou a presença de apenas parasitos do gênero *Plasmodium* nas amostras positivas para o primer utilizado, pois não se observou a amplificação de uma banda de exatamente 121pb que corresponderia ao gênero *Haemoproteus*.

4.6 Sequenciamento das Amostras e Análise Filogenética

O resultado do sequenciamento revelou que as amostras positivas correspondem a parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo que a maioria das amostras apresentaram alta identidade com a espécie *Plasmodium relictum*. O resultado do sequenciamento consta na Figura 11 e o parentesco evolutivo entre os isolados na Figura 12.

Número da amostra	Número da sequência	Sequência	Grau de similaridade
6	24	GAGCTATGACGCTATCGA TTTTGA CAAGCGGGTAAATTCTTTCATAGA ACTTAACGTACCATCTTCCATACAA AGATAAACGGTAGATAGGGAACAA ACTGCCTCAAGACGTCTACCAGTCA TTTCACGCATCGCTTC TAACGGTGA ACTCTCATTC	94% de similaridade com <i>Plasmodium relictum</i> e 94% com <i>Plasmodium gallinaceum</i>
11	25	GAGCTATGACGCTATCGA TTTTGACA AGGCGGGTAAATTCTTTCATAGA TAACGTACCATCTTCCATACAAAGAT AAAACGGTAGATAGGGAACAACTGC CTCAAGACGTCTACCAGCCAGTTCAC GCATCGCTTC TAACGGTGA ACTCTCATTC	95% de similaridade com <i>Plasmodium gallinaceum</i> , 95% com <i>Plasmodium floridense</i> e 95% com <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e 95% com <i>Plasmodium relictum</i> .
2	26	GAGCTATGACGCTATCGA TTTTGACAA GGCGGGTAAATTCTTTCATAGA AACGTATCATCTTCCATACATAGATA AAACGGTAGATAGGGAACAACTGCC TCAAGACGTCTAGCAGCCATTTACG CATCGCTTC TAACGGTGA ACTCTCATTC	95% de similaridade com <i>Plasmodium floridense</i> , 95% com <i>Plasmodium relictum</i> , 95% com <i>Plasmodium mexicanum</i> e 95% com <i>Plasmodium gallinaceum</i>
13	27	GAGCTATGACGCTATCGA TTTTGACAA GGCGGGTAAATTCTTTCATAGA AACGTATCATCTTCCATGCAAAGATA AAACGGTAGATAGGGAACAACTGCC TCAAGACGTTCTTAACCCAGCTCAG CATCGCTTC TAACGGTGA ACTCTCATTC	100% de similaridade com <i>Plasmodium relictum</i> , 98% com <i>Plasmodium gallinaceum</i> e 98% com <i>Plasmodium floridense</i> .

Figura 11. Sequenciamento e grau de identidade dos isolados sanguíneos de pinguins-de-magalhães mantidos no RIOZOO.

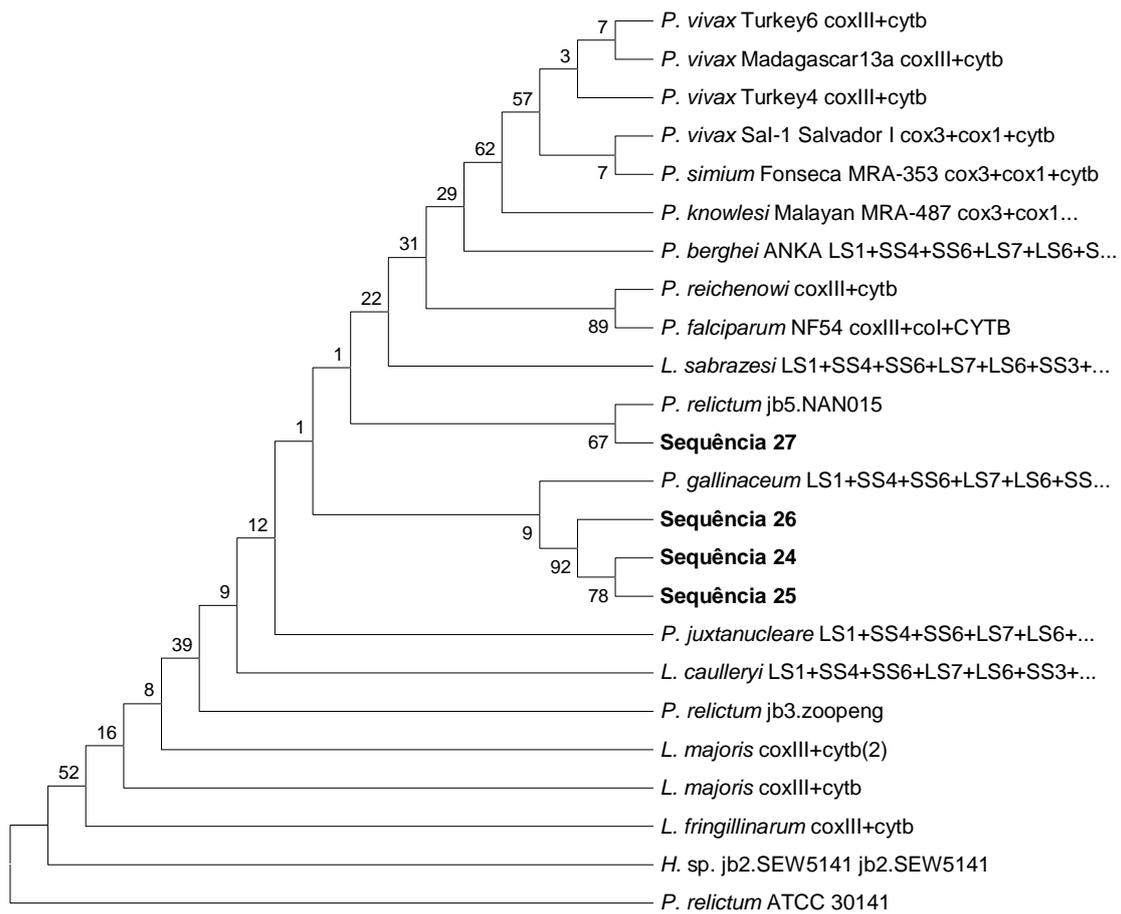


Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir do gene mitocondrial completo de quatro isolados de parasitos de pinguins-de-magalhães comparados com outras sequências correspondentes depositadas no GenBank.

5 DISCUSSÃO

A maioria dos pinguins amostrados eram jovens, caracterizados pela plumagem juvenil presente, em geral são estes que chegam a costa brasileira (RUPOLLO et al., 2006; VEGA et al., 2010).

Todas as aves apresentaram estado clínico grave em virtude da desidratação, baixo peso, contaminação por óleo e infecções parasitárias. Em estudo realizado por Campos et al. (2011) em pinguins, foi detectado ao exame clínico mucosas hipocoradas em aproximadamente 50% dos animais avaliados e peso abaixo do esperado, além de intensa dispnéia, desidratação e eventualmente lesões sugestivas de trauma em diferentes regiões do corpo. Os animais apresentavam, ainda, alterações gastrointestinais, evidenciadas por mudança na coloração das fezes. De acordo com Vega et al. (2010) pode ocorrer perda de músculos e gordura. As aves debilitadas costumam regurgitar o alimento administrado via sonda (FIX et al., 1988), o que também foi observado neste estudo.

É comum encontrar na costa sudeste e sul brasileira a presença de pinguins-de-magalhães contaminados por óleo, como foi reportado por Tavares e Nascimento (2009) com relação à costa de São Paulo, onde, dos 109 indivíduos, 80% encontravam-se mortos e 12% ainda vivos. Desses, apenas 32% estabilizaram o quadro clínico e 68% vieram a óbito durante o tratamento. As aves, ao se contaminarem com o óleo, têm o sistema imunológico comprometido, expondo-se a infestações e infecções por parasitos e também à hipotermia ocasionada pela perda da tensão entre as penas que preservam a temperatura ótima do corpo, além da alta toxicidade do petróleo (STEPHENSON, 1997; VALIM et al., 2004). Quando intoxicadas, procuram as praias para descansar, como uma alternativa de recuperar da oleosidade de suas penas. Entretanto, intoxicam-se com o óleo impregnado (MICHELS-SOUZA et al., 2010).

A prevalência de parasitos do gênero *Plasmodium* em pinguins neste estudo foi de 47,73%, o que pode ser considerada alta quando comparada com outros estudos de pinguins em cativeiro (GRACZYK et al., 1994). Graczyk et al. (1995) estudando diferentes populações de pinguins verificou uma prevalência de parasitos do gênero *Plasmodium* em torno de 33%.

Através da análise dos resultados obtidos nesta pesquisa e levando-se em conta que as aves amostradas neste estudo eram mantidas em recintos abertos, sem proteção por telas e ao lado de outras aves que também estavam positivas para parasitos do gênero *Plasmodium*, acredita-se que pinguins-de-magalhães adquirem os parasitos maláricos quando são levados para Jardins zoológicos e centros de reabilitação e ali são mantidos juntamente com outras aves e em um ambiente com presença de vetores da família Culicidae. De acordo com Jones e Shellam (1999) infecções que foram relatadas em pinguins de cativeiro são consideradas como tendo sido adquiridas localmente ou quando os pinguins estavam em trânsito.

A parasitemia de algumas aves amostradas nesta pesquisa também é considerada alta. Bueno et al. (2010), verificou mortalidade de pinguins-de-magalhães mantidos em cativeiro no Brasil causada por *Plasmodium relictum* com parasitemia média de 0,8%, número muito inferior a parasitemia por *Plasmodium* encontrada neste estudo.

Com exceção de três aves amostradas, a forma evolutiva de *Plasmodium* que prevaleceu foi trofozoíto. Este dado corrobora com de outros autores que estudaram o parasitismo por *Plasmodium*, tanto em infecção natural quanto experimental (MASSARD; MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; ELISEI, 2005; VASHIST, 2011).

Os trofozoítos, esquizontes e gametócitos encontrados nas lâminas de esfregaços sanguíneos dos pinguins se assemelham à descrição feita por Garnham (1966) e Valkiunas (2005), trofozoítos ovais, ou piriformes, podendo ser amebóides, esquizontes irregularmente esféricos, com cerca de 14 merozoítos por esquizontes, gametócitos arredondados ou ovais,

podendo ser alongados dependendo da espécie hospedeira. Neste estudo as formas prevaescentes de microgametócito e macrogametócito foram as alongadas. Os gametócitos encontrados eram grandes, macrogametócito (10,15x 2,39 μm) e microgametócito (11x 2,04 μm), e às vezes deslocavam o núcleo do eritrócito parasitado. Há grande variação na forma e diâmetro das diferentes subespécies de *P. relictum*, essas podem apresentar desde grande a reduzido tamanho de gametócitos (GARNHAM, 1966). A morfologia e morfometria das formas evolutivas pode estar relacionada à espécie hospedeira e à cepa envolvida.

O sequenciamento revelou que as amostras positivas correspondem a parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo que a maioria das amostras apresentaram alta identidade com a espécie *P. relictum*, um plasmódio muito comum em passeriformes. Também apresentaram identidade com espécies como *P. gallinaceum*, *P. floridense*, *P. mexicanum* e *P. juxtannucleare*. A espécie *P. relictum* já foi relatada parasitando pinguins na Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos e Brasil (FANTHAM; PORTER, 1944; FIX et al., 1988; BROSSY, 1992; BUENO et al., 2010) como principal causa de morbidade e mortalidade destes animais. Estudos envolvendo análises morfológicas e moleculares confirmaram a presença deste patógeno em diferentes espécies de pinguins. *P. juxtannucleare* também já foi relatado em pinguins da pata preta (*Spheniscus demersus*) na África como agente causador de óbito (GRIM et al., 2003). Não há relatos na literatura de *P. gallinaceum*, *P. floridense* e *P. mexicanum* parasitando pinguins. Outra espécie de plasmódio frequente em pinguins é *P. elongatum* (HUFF; SHIROISH, 1962, BEIER; STOSKOPF, 1980), mas este não fora encontrado no sangue dos pinguins amostrados neste estudo. *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* não foram relatados neste estudo provavelmente pela ausência dos vetores próprios no ambiente em que estavam alojados os pinguins.

6 CONCLUSÕES

- Malária aviária ocorre em pinguins-de-magalhães mantidos na Fundação RIOZOO, apresentando alta prevalência;
- A infecção por parasitos da malária aviária provavelmente ocorre quando as aves estão mantidas no cativeiro;
- *Plasmodium relictum* é o principal agente causador da malária aviária em pinguins-de-magalhães mantidos na Fundação RIOZOO;
- Os gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* não foram diagnosticados em pinguins-de-magalhães mantidos na Fundação RIOZOO.

7 REFERÊNCIAS

- ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K.L. et al. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of wildlife diseases*, v. 36, n. 2, p. 197-204, 2000.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: LOYE J.E.; ZUK M. (Eds.) *Blood-parasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour*, Oxford University Press, Oxford, U.K., 1991, p. 19-47.
- BEADELL, J. S.; FLEISCHER, R. C. A Restriction Enzyme-Based Assay to Distinguish Between Avian Hemosporidians. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 3, p. 683-685, 2005.
- BENNET, G.F. Gallinaceos species of *Plasmodium*. *Journal of Parasitology*, v. 56, p. 27 (section II), 1970.
- BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. *Bioscience*, v.58, p. 597-607, 2008.
- BROSSY, J.J. Malaria in wild and captive Jackass Penguins *Spheniscus demersus* along the southern African coast. *Ostrich*. v. 63, p.10-12, 1992.
- BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; 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*, v. 173, p.123-127, 2010.
- CAMPOS, S. D. E.; SILVA, L. G.; PEREIRA, B. B. N.; MAGALHÃES, B. S. N.; PIRES, J. R.; BRENER, B.; ALMOSNY, N. R. P. Aspectos Hematológicos da Infecção Por *Plasmodium* spp. em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus Magellanicus*) capturados no litoral do Rio de Janeiro. In: 38° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet), Florianópolis – SC. *Anais do 38° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet)*, p. 1-3. 2011.
- CUBAS, Z. S. Natural diseases of freeracing birds in South America. In: Fowler, M. E. (Ed.): *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 3 ed. Philadelphia: P.A., W.B. Saunders Co., 1992, p. 169-172.
- DEVICHE, P.; GREINER, E. C.; MANTECA, X. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *Journal of Experimental Zoology*, v. 289, n. 1, p.456-466, 2001.
- EARLÉ, R. A.; BENNETT, G. F.; BROSSY, J.J. First African record of *Leucocytozoon tawaki* (Apicomplexa: Leucocytozooidea) from the jackass penguin *Spheniscus demersus*. *South African Journal Of Zoology*, v. 27, p. 89-90, 1992.
- ELISEI, C.; SOUZA, P. C. A. ; MASSARD, C. L.; OLIVEIRA, C. S. Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Boletín chileno de parasitología*, v. 25, n. 1-2, p. 12-18, 2001.

ELISEI, C. O. 2005. *Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de Plasmodium juxtannucleare e uma nova proposta filogenética dos Gêneros Plasmodium, Haemoproteus e Hepatocystis*. 2005. 105f. (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

FANTHAM, H. B.; PORTER, A. On a *Plasmodium* (*Plasmodium relictum* var. *spheniscidae*, n. var.), observed in four species of penguins. *Proceedings of the Zoological Society of London*, v. 114, p. 279-292, 1944.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of wildlife diseases*, v. 24, p. 610-619, 1988.

FLEISCHMAN R.W., SLADEN W.J.L.; MELBY E.C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.153, p.928-935, 1968.

FONSECA, V. S.; PETRY, M. V.; JOST, A. H. Diet of the Magellanic Penguin on the coast of Rio Grande do Sul, Brasil. *Waterbirds*, v. 24, p.290-293, 2001.

FRERE, E.; GANDINI, P.; LICHTSCHEIN, V. Variación latitudinal en la dieta del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en la costa Patagónica, Argentina. *Ornitología Neotropical*, v. 7, p.35-41, 1996.

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

GRACZYK, T.K.; SHAW, M. L.; CRANFIELD, M. R.; BEALL, F. B. Hematologic characteristics of avian malaria cases in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) during the first outdoor exposure season. *The Journal of Parasitology*, v. 80, n. 2, p. 302-308, 1994.

GRACZYK, T.K.; BROSSY, J.J.; PLÖS, A.; STOSKOPF, M.K. Avian malaria seroprevalence in Jackass Penguins (*Spheniscus demersus*) in South Africa. *The Journal of Parasitology*, v.81, p. 703-707, 1995.

GRIM, K.C.; MERWE, V. E.; SULLIVAN, M. B.A.; PARSONS, N.; Mc CUTCHAN, T.F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.34, n. 3, p. 250-253, 2003.

HERMAN, C. M.; KOCAN, R. M.; SNYDER, E. L.; KNISLEY Jr, J. O. *Plasmodium elongatum* from a penguin. v. 4, p 1, 1968.

HOFSTAD, M.S. *Diseases of poultry* (7 ed.). Iowa State University Press, Ames IA, 1978.

JONES, H.I.; SHELLAM, G.R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. *Marine Ornithology*, v. 27, p. 181-184, 1999.

JULIAN, R. J.; GALT, D. E. Mortality In Muscovy Ducks (*Cairina moschata*) caused by *Haemoproteus* infection. *Journal of wildlife diseases*, v. 16, p. 39-44, 1980.

KRETLI, A.U; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96 n. 8, p. 1033-1042. 2001.

LEVIN, I.I.; OUTLAW, D.C.; VARGAS, F.H.; PARKER, P.G. Plasmodium blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biological Conservation*, v.142, p.3191–3195, 2009.

MARGOLIS, L.; ESCH, G.W.; HOLMES, J.C. KURIS, A.M. & SCHAD, G. A. 1982. The use of ecological terms in parasitology (reports of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists) *Journal of Parasitology*, v. 68, n. 1, p. 131-133. 1982.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

MCCALLUM, H.; DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 10, p.190-194, 1995.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H.; GREGOR, MC.I. Major animal models in malaria research. *Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology*, v. 2, p. 1545-1567, 1988.

MICHELS-SOUZA, M. A.; CRUZ, P. B. S.; JORDAN WALLAUER, J.; SILVA, G. S. Pinguins-de-magalhães (*spheniscus magellanicus* forster, 1781) contaminados por petróleo encontrados na ilha de Santa Catarina, Brasil. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 16, n. 1, 2010.

MURATTA, K. Prevalence of blood parasite in Japanese wild birds. *Parasitology Research*, v. 64, n. 9, p. 785-790, 2002.

PEIRCE, M. A.; GREENWOOD, A. G.; STIDWORTHY, M. F. Leucocytozoon in captive penguins. *The Veterinary Record*, v. 17, p. 819-820, 2005.

PINTO, M. B. L. C.; SICILIANO, S.; DI BENEDETTO, P. M. Stomach contents of the Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil. *Marine Ornithology*,v. 35, p.77-78, 2007.

REIS, J.; NOBREGA, P. Tratado de doenças das aves: doenças produzidas por protozoários e artrópodes parasitas. 2 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1956. 416p.

RUPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA, R. P. Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. *Clínica Veterinária*, n. 51, p. 78-83, 2004.

SCHMIDT, G. D.; ROBERT'S, L. S. Foundations of parasitology. 7 ed. McGraw-Hill, 2007. 670p.

- SICK, H.,1997. (Ed.) *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 862p.
- SILVA-FILHO, R.P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pingüim). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. São Paulo, SP: Roca, 2006. p.309-323.
- 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*. 1998. 137f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.
- STEPHENSON, R. Effects of oil and other surface-active organic pollutants on aquatic birds. *Environmental Conservation*, v. 24, n. 2, p. 121–129. 1997.
- STOSKOPF, M.K.; BEIER, J.R. Avian malaria in African Black-footed Penguins. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 175, p. 944-947, 1979.
- TAMURA,K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, n. 8, p.1596–1599, 2007.
- TAVARES, T. L.; NASCIMENTO, M. S. Registros de *Spheniscus magellanicus* (Foerster 1781) (Aves: Sphenisciformes) no ano de 2008 entre Pratigí, Ituberá – BA a Rio de Contas, Itacaré – BA. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, São Lourenço – MG. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, p. 1-2. 2009.
- THOMPSON, J. D., PLEWNIAK, F., POCH, O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 13, p. 2682-2690, 1999.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.
- VALIM, M. P.; SILVA, L. H. M.; AMORIM, M.; SERRAFREIRE, N. M. Encontro de *Spheniscus.mangellanicus* (Forster, 1781) (Aves: Sphenisciformes) parasitado por *Austrogoniodes bifasciatus* (Piaget, 1885) (Ishnocera:Phlopteridae) na região dos lagos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Entomol. Vect.*, v.11, n.1, p. 191-194, 2004.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Florida: Boca Raton,2005, 946 p.
- VAN RIPPER III, C.; ATKINSON, C.T.; SEED, M.T. 1994. Plasmodia of birds, p. 73-140. In: KREIER, J.P. *Parasitic Protozoa*. vol. 7, 2 ed, Academic Press, New York, USA.
- VANSTREELS, R.E.T.; ADORNES, A.; CABANA, A.; NIEMEYER, C.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; DANTAS, G.; ARAUJO, J.; CATÃO-DIAS, J. L.; GROCH, K.; SILVA, L.; REISFELD, L.; BRANDÃO, M.L.; XAVIER, M.; VIEIRA, O.; SERAFINI, P.; BALDASSIN, P.; CANABARRO, P.; HURTADO, R.; SILVA-FILHO, R. P.; CAMPOS, S.; RUOPPOLO, V. *Manual de Campo para Colheita e Armazenamento de Informações e*

amostras Biológicas provenientes do Pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). São Paulo: CEMAVE, 2011 (Manual de Campo), 62 p.

VASHIST, U. ; CARVALHAES, R. ; D' AGOSTO, M. ; DA SILVA, A. D. Antimlarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in *Linnaeus*, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare* in *Gallus gallus*. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 74, p. 434-437, 2009.

VASHIST, U. 2011. *Avaliação Biológica, Bioquímica E Histopatológica Das Infecções Experimentais Causadas Por Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 E Borrelia anserina Sakharoff, 1891 Em Gallus gallus L. 1758*. 2011. 86f. (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

VEGA,C.M.; SICILIANO,S.; BARROCAS, P. R. G.; HACON, S. S.; CAMPOS,R. C.; JACOB, S. C.; OTT, P. H. Levels of Cadmium, Mercury, and Lead in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) Stranded on the Brazilian Coast. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.58, n. 2, p. 460-468, 2010.

VOOREN, C. M.; BRUSQUE, L. F., 1999. *As aves do ambiente costeiro do Brasil: Biodiversidade e conservação*. Rio Grande: PRONABIO.

WALDENSTROM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S.; HASSELQUIST, D.; OTTOSSON, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular ecology*, v. 11, n. 8, 2002.

WILLIAMS, T. D.; BOERSMA, P. D.; STOKES, D. L.; WILSON, P. R.,1995. (Ed.) *The penguins*. London: Oxford University Press.

ANEXO I

– Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.



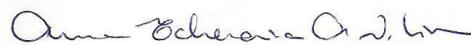
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 125/2011

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Estudo hemoparasitológico e molecular em pinguins *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781, originários da Patagônia recolhidos na costa brasileira*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Luiz Massard do Departamento de Parasitologia Veterinária do Instituto de Veterinária, processo 23083.005909/2011-48, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais em experimentação.

UFRRJ, 11/08 /2011.


Prof. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação