



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. EM
ARARAS MANTIDAS EM CATIVEIRO NO DF**

ROBERTA RENDY RAMOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2012



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. EM
ARARAS MANTIDAS EM CATIVEIRO NO DF**

ROBERTA RENDY RAMOS

ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO

PUBLICAÇÃO: 058/2012

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL
BRASÍLIA/DF
JUNHO/2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. EM ARARAS
MANTIDAS EM CATIVEIRO NO DF**


ROBERTA RENDY RAMOS

DISSERTAÇÃO DE Mestrado
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO (UnB)
(ORIENTADORA)



RAFAEL VERÍSSIMO MONTEIRO
(AVALIADOR INTERNO)



ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
(AVALIADOR EXTERNO)

BRASÍLIA, 26 DE JUNHO DE 2012

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RAMOS, R.R. **Estudo da Infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro no DF**, Universidade de Brasília, 2012, p. 86. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ramos, Roberta Rendy

Estudo da Infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro no DF / Roberta Rendy Ramos. Orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2012. p.86: Il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Malária aviária. 2. *Plasmodium*. 3. Araras. 4. Psitacídeos. 5. Hemograma. 6. bioquímicos séricos. I. Paludo, R.P. II. Título

CDD ou CDU
Agris/FAO

DEDICATÓRIA

Às aves, seres admiráveis que nos encantam com sua beleza e são fundamentais para o equilíbrio do nosso Planeta.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada a Deus por tudo que tem me concedido.

Aos meus queridos pais Renato e Eliana por todo amor, carinho e atenção que sempre me deram! E à minha querida irmã Renata, a anestesista oficial do meu projeto, por estar presente em todos os momentos bons e ruins sempre me ajudando e confortando. Sem você tudo seria mais difícil! Agradeço aos três por compartilharem comigo o amor pelos animais! Amo vocês!

Ao meu noivo Marcelo por ser meu companheiro, por compreender os inúmeros momentos que estive ausente (as coisas vão melhorar!) e por incentivar meu crescimento profissional. Amo você!

A professora Giane Regina Paludo que me orientou desde a residência e agora no mestrado. Obrigada pela paciência, atenção e conhecimentos repassados!

Ao professor Rafael Veríssimo Monteiro que com sua experiência em aves me auxiliou no delineamento e desenvolvimento do projeto e deu uma “força” na análise estatística.

Ao professor Ricardo Miyasaka de Almeida por compartilhar as informações relacionadas à anestesia em aves com a equipe do projeto.

Ao professor Estevam Guilherme Lux Hoppe por gentilmente participar da banca avaliadora.

Aos criadouros que permitiram a colheita de amostras de seus animais para este trabalho: Criadouro de Aves Apoena (Rebecca e Pedro), Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Ana Cristina e Jaqueline) e Zoobotânica Abreu e Lima (Érico). Muito obrigada pela receptividade!

Aos tratadores de todos os criadouros pela ajuda na captura das araras.

Aos colegas que participaram das saídas de campo: Jairo, Renan, Robson e Sérgio.

Aos companheiros de laboratório Larissa e Rômulo por dividirem comigo a “pressão” do mestrado.

Às estagiárias Marcelle e Mariana por me ajudarem na pesquisa. Vocês vão longe meninas!

A todos que “tiraram” minhas amostras do termociclador!

Minhas queridas amigas Ana Bárbara, Anita, Gisele, Laís, Nárjara, Nayara e Thaís pela amizade verdadeira e apoio na vida pessoal e profissional. Amo vocês meninas!

À minha amiga e grande parceira Ana Carolina por tudo que tem feito por mim!

À minha amiga Raphaela por me ensinar as técnicas de PCR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Kelly Cristina do Reis pela ajuda nos assuntos administrativos e burocráticos complicados de resolver.

Às araras que, involuntariamente, participaram do projeto.

Aos meus cachorros Mike e Dori pelo carinho e por alegrarem meus dias!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	1
Introdução	1
Referencial teórico	2
Objetivos	29
Referências	30
CAPÍTULO II	43
Introdução	43
Materiais e Métodos	44
1. Animais	44
2. Delineamento experimental	46
3. Análise estatística	52
Resultados	52
Discussão	65
Conclusões	75
Referências	76
CAPÍTULO III	82
Considerações Finais	82
Anexos	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas espécies mais procuradas por colecionadores particulares e zoológicos, e os respectivos preços estimados praticados no mercado internacional.	Página 4
Tabela 2. Algumas espécies de araras com seu tamanho, distribuição e situação na natureza.	Página 5
Tabela 3. Número de espécies por família de parasitos hemospórideos que foram descritos em ordens de aves.	Página 8
Tabela 4. Espécies de <i>Plasmodium</i> aviário que já foram descritas em algumas ordens de aves.	Página 13
Tabela 5. Algumas causas de anemia em aves.	Página 23
Tabela 6. Seqüências de oligonucleotídeos, gene amplificado, tamanho dos produtos da amplificação e fonte consultada nas reações de PCR utilizadas neste trabalho.	Página 49
Tabela 7. Distribuição por grupos das araras incluídas na estatística conforme a espécie.	Página 52
Tabela 8. Distribuição por grupos das araras excluídas da estatística conforme a espécie.	Página 53
Tabela 9. Distribuição de araras conforme o sexo nos grupos.	Página 54
Tabela 10. Número de araras positivas para hemoparasitos por método de diagnóstico (microscopia óptica (M.O.) e PCR).	Página 55
Tabela 11. Número de araras positivas para hemoparasitos detectados em cada método de diagnóstico utilizado (microscopia óptica - M.O. e PCR) distribuídas por espécie em cada grupo.	Página 56
Tabela 12. Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais positivos e negativos na PCR "Haem" (<i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i>) dos grupos G1, G2 e G3 (n=96 araras).	Página 57
Tabela 13. Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais positivos e negativos na PCR "rPLU" (<i>Plasmodium</i>) dos grupos G1, G2 e G3 (n=96 araras).	Página 58

Tabela 14. Número de araras positivas para hemoparasitos na microscopia óptica (M.O.) e PCR por sexo.	Página 58
Tabela 15. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nas araras positivas e negativas para a infecção por hemoparasitos de todos os criadouros amostrados.	Página 59
Tabela 16. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos das quatro principais espécies de araras amostradas.	Página 60
Tabela 17. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de araras amostradas nos diferentes criadouros.	Página 61
Tabela 18. Resultados obtidos em exames de amostras colhidas em momentos diferentes de um mesmo espécime infectado por hemoparasitos.	Página 62
Tabela 19. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos das araras da espécie <i>Ara rubrogenis</i> amostradas.	Página 63
Tabela 20. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímica sérica da arara da espécie <i>Ara glaucogularis</i> amostrada.	Página 64
Tabela 21. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos das araras híbridas amostradas.	Página 65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. I, II – merogonia exoeritrocitária primária; III - merogonia eritrocitária; IV – merogonia exoeritrocitária secundária e V – fase sexuada no vetor. Página 16
- Figura 2.** Localização dos criadouros amostrados (Google Earth, 2012). A - Criadouro de Aves Apoena; B - Fundação Jardim Zoológico de Brasília; C - Zoobotânica Abreu e Lima. Página 45
- Figura 3.** *Ara chloroptera* contida quimicamente por meio de anestesia inalatória. Página 46
- Figura 4.** Punção de veia jugular em *Anodorhynchus hyacinthinus*; B - Punção de veia braquial em *Ara ararauna*. Página 47
- Figura 5.** Resultado de PCR para sexagem de aves. Página 53
- Figura 6.** Resultado de PCR para detecção de hemoparasitos. Página 55
- Figura 7.** Gametócitos de hematozoário em eritrócitos de arara e grânulos de hemozoína. Página 55

RESUMO

As araras possuem grande importância epidemiológica relacionada às doenças aviárias, pois estão entre as espécies que mais transitam no comércio legal e ilegal de animais silvestres e têm sido incluídas em programas de permuta entre instituições e de reintrodução da fauna à natureza. Essas aves podem ser acometidas pela malária aviária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos por mosquitos hematófagos da família Culicidae. A infecção pode ter curso subclínico e até casos com morte súbita e alterações laboratoriais como anemia hemolítica e leucocitose. Este estudo teve como objetivos determinar a ocorrência da infecção por *Plasmodium* spp. em araras oriundas de criadouros do Distrito Federal e Goiás por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) e microscopia óptica bem como comparar o perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados com aquele dos animais não infectados. Foram analisadas 96 amostras de sangue das espécies *Ara ararauna*, *A. chloroptera*, *A. macao* e *Anodorhynchus hyacinthinus* para realização de hemograma, bioquímicos séricos e pesquisa da infecção por *Plasmodium* por meio de *nested* PCR e microscopia óptica. Os resultados demonstraram a ocorrência da infecção em 7,29% (7/96) e 4,16% (4/96) das amostras por meio de PCR e microscopia óptica, respectivamente. A infecção não causou alterações significativas no hemograma e perfil bioquímico, com exceção da albumina, que é uma proteína de fase aguda negativa, e sua concentração pode ter reduzido devido ao processo infeccioso. Esses resultados denotam que a ocorrência de infecção por *Plasmodium* spp. nas regiões é baixa e sugerem que as cepas dos protozoários que parasitam essas araras são pouco patogênicas. Contudo, existe a necessidade de mais estudos a cerca dos plasmódios no que diz respeito à distribuição, transmissão, patogenia, manifestação clínica e patologia clínica para melhor compreender o ciclo biológico desses protozoários nas araras.

Palavras-chaves: malária aviária, *Plasmodium*, araras, psitacídeos, hemograma, bioquímicos séricos.

ABSTRACT

The macaws have great epidemiological importance in relation to avian diseases. They are among the most sought out species in the legal and illegal trade of wild animals and have been included in exchange programs between institutions and reintroduction of wildlife. These birds can be affected by avian malaria, which is caused by a protozoa of the genus *Plasmodium*, transmitted by bloodsucking mosquitoes of the Culicidae family. The infection may be subclinical and even lead to sudden death with laboratory abnormalities such as hemolytic anemia and leukocytosis. This study aimed to determine the occurrence of infection with *Plasmodium* spp. from breeding macaws in the Distrito Federal and Goiás via polymerase chain reaction (PCR) and optical microscopy, as well as to compare the hematological and biochemical profile of animals infected with that of uninfected animals. Clinical hematology, serum biochemistry and research of *Plasmodium* infection by PCR and microscopy were analyzed in a total of 96 blood samples of *Ara ararauna*, *A. chloroptera*, *A. macao* and *Anodorhynchus hyacinthinus*. The results demonstrated the presence of infection in 7.29% of the samples (7/96) by PCR and 4.16% of the samples (4/96) by optical microscopy. The infection did not cause significant changes in blood count and biochemical parameters, except for albumin, that is a negative acute phase protein, and its concentration can be reduced due to the infection process. These results show that the occurrence of *Plasmodium* spp. in the research area is low and suggests that the strains of the protozoa that parasitize these macaws are mildly pathogenic. However, more studies are needed on this parasite, with regard to distribution, transmission, pathogenesis, clinical manifestation and clinical hematology, to better understanding of the life cycle of these protozoa in macaws.

Keywords: avian malaria, *Plasmodium*, macaws, psittacidae, hemogram, serum biochemistry.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As araras e outros psitacíformes são belas aves que habitam regiões tropicais, principalmente o Hemisfério Sul do globo terrestre (Guedes e Scherer, 2001; Godoy, 2007). São animais extremamente interessantes por suas características peculiares (Snyder et al. 2000) e representam um dos grupos mais ameaçados na natureza devido a destruição do habitat, caça clandestina ou captura para o tráfico de aves (Grajal, 2000).

Esses animais podem ser acometidos pela malária aviária, mundialmente distribuída, que tem como agentes causadores diversos protozoários do gênero *Plasmodium*, os quais são transmitidos por espécies de dípteros hematófagos da família Culicidae (Soares et al. , 1999; Valkiūnas, 2005). Os plasmódios podem ter uma relação harmônica com seus hospedeiros, caracterizando uma infecção assintomática. Entretanto, podem ocorrer infecções graves (Julian e Galte 1980) resultando em diminuição da produtividade, apatia, depressão, fraqueza, letargia, dispnéia, alterações neurológicas, convulsões, febre, perda de peso, esplenomegalia, edema pulmonar, morte súbita (Greiner e Harrison, 1994; Campbell, 1995; Fowler e Fowler, 2001; Paraense 2004; Williams, 2005; Almosny e Monteiro, 2006; Peirce, 2008). Alterações laboratoriais como anemia hemolítica, leucocitose, hemoglobínúria e modificações na bioquímica sérica (proteínas e suas frações e enzimas hepáticas) podem ser também observadas (Graczyk et al., 1995; Williams, 2005; Harr, 2006).

A infecção por *Plasmodium* pode ser influenciada por três fatores: (a) presença do vetor apropriado, (b) presença da ave hospedeira e (c) capacidade imunológica 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 (Valkiūnas, 2005). É interessante salientar que as araras possuem grande importância epidemiológica relacionada à malária aviária considerando que pertencem a um dos grupos (Psittaciformes) que mais transita no comércio legal e ilegal de animais silvestres e participam de programas de permuta entre criadouros e de reintrodução na natureza (RENCTAS, 2001; Instituto Arara Azul, 2009). Assim os animais infectados podem carrear os parasitos e introduzir a doença em uma região ou plantel o que gera risco à saúde das outras aves (Belo et al., 2009).

O diagnóstico da infecção por plasmódios pode ser obtido com auxílio de visualização do parasito em esfregaço sanguíneo por microscopia óptica, reação de polimerase em cadeia (PCR) e exames sorológicos (Atkinson et al., 2001; Valkiūnas, 2005; Bensch et al., 2009).

No Brasil existem muitos trabalhos relacionados à epidemiologia de *Plasmodium* em aves, porém a maioria dos estudos é direcionada às aves passeriformes (Woodworth-Lynas et al., 1989; Ribeiro et al., 2005; Fecchio, 2011; Sebaio et al., 2012), sendo escassos os dados acerca desse assunto em psittaciformes (Belo et al., 2009; Silva, 2011).

Em virtude dessas informações, o presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência da infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro por meio de PCR e microscopia óptica, bem como comparar o perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados com aquele dos animais não infectados.

REFERENCIAL TEÓRICO

Histórico

Ordem Psittaciforme

As aves da ordem Psittaciforme são classificadas em três famílias com seis subfamílias: Psittacidae (subfamílias Nestorinae, Micropsittinae, Psittacinae e Strigopinae); Cacatuidae (subfamílias Cacatuinae e Nymphicinae) e Loriidae. Dentre os animais dessa ordem estão as araras, os papagaios, periquitos, maracanãs, cacatuas e calopsitas (Guedes e Scherer, 2001).

A maioria dos psittaciformes está distribuída na zona tropical do globo terrestre, mais concentrados no Hemisfério Sul, porém algumas espécies são encontradas em áreas frias como a Argentina e Chile (Guedes e Scherer, 2001; Godoy, 2007). Na América do Sul existem aproximadamente 118 espécies, das quais 70 são registradas no Brasil possui, sendo considerado o país mais rico do mundo em aves dessa ordem, seguido pela Colômbia com 52 espécies, Venezuela com 49, Peru com 47 e Bolívia com 47 (Sick, 1997; Allgayer e Cziulik, 2007). Essa riqueza de espécies no Brasil já era evidenciada na época do descobrimento pelos europeus, pois em um mapa do ano de 1.500 três araras vermelhas estão representadas e o nosso país era designado como “Terra dos Papagaios” (*Brasilia sive terra papagallorum*) (Sick, 1997; Godoy, 2007).

Quanto à anatomia, embora os Psittaciformes variem extremamente de tamanho conforme a espécie, essas espécies possuem características comuns e muito marcantes que facilitam seu reconhecimento imediato. Estas características incluem o bico alto, curvado e potente, maxila móvel, osso tarso curto e pés do tipo zigodáctilo, com o quarto dedo é deslocado posteriormente junto ao primeiro, asas compridas e fortes e penas com cores variadas. A maxila articulada ao crânio possibilita movimentos extras e habilidosos, o que lhes confere grande potência para quebrar sementes e cocos. Essas aves ainda possuem língua grossa, sensível e papilas gustativas numerosas e as mais diferenciadas entre todas as aves (Sick, 1997; Mahecha et al., 2005; Allgayer e Cziulik, 2007).

São as aves tropicais mais impressionantes, devido à sua beleza, às suas cores variadas, à sua inteligência, facilidade em se adaptar ao convívio com o homem e capacidade de imitar sua linguagem (Sick, 1997; Snyder et al., 2000). Tais características fazem com que seja um dos grupos mais populares e procurados como animais de estimação depois dos cães e gatos (RENCTAS, 2001). Por esses motivos, os psittaciformes há séculos são capturados e representam um dos grupos de aves mais ameaçados de extinção do mundo (Sick, 1997). Os principais fatores que os ameaçam são a destruição do hábitat (perda e fragmentação), caça

clandestina ou captura para o tráfico (penas, ovos, filhotes, adultos) (Grajal, 2000) e, segundo a Birdlife International (2000), o comércio ilegal dessas aves movimentava milhões de dólares por ano (Tabela 1). A fragmentação do habitat resulta em distribuição geográfica restrita das populações, endogamia e adensamentos populacionais, o que favorece a transmissão direta de doenças e pode causar estresse aos indivíduos devido ao aumento da competição ou a redução de alimento, tornando-os mais suscetíveis às doenças (Guedes, 2004; Andriolo, 2007; Godoy, 2007; Sehgal, 2010). Ainda, em regiões agrícolas, algumas espécies são exterminadas por serem consideradas pragas das lavouras que avançam sobre seus habitats naturais (Collar, 1997).

Tabela 1. Algumas espécies mais procuradas por colecionadores particulares e zoológicos, e os respectivos preços estimados praticados no mercado internacional.

Nome comum	Nome científico	Valor em U\$\$ (unidade)
Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	60.000
Arara-azul	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	25.000
Arara-caniné	<i>Ara ararauna</i>	4.000
Papagaio-de-cara-roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	6.000

Fonte: RENCTAS, 2001.

Araras

As araras são as maiores aves pertencentes à ordem Psittaciformes (Sick, 1997) e estão distribuídas desde o Sul da América do Norte (México) até a América do Sul. Na família Psittacidae existem três gêneros: *Anodorhynchus* com três espécies, *Cyanopsitta* com uma espécie e *Ara* com 15 espécies (Guedes e Scherer, 2001). Estão listadas na Tabela 2 algumas espécies de araras que ocorrem nas Américas Central e Sul. Na fauna brasileira são encontrados representantes de todos os gêneros, e é onde também se observa o maior número de espécies. Nela existem quatro espécies do gênero *Ara*: *A. macao*, *A. chloroptera*, *A. ararauna* e *A. severus*, três espécies do gênero *Anodorhynchus*: *A. leari*, *A. glaucus*, *A. hyacinthinus* e a única espécie do gênero *Cyanopsitta*: *C. spixii* (Instituto Arara Azul, 2009; IUCN, 2011).

Cabe salientar que nove espécies de araras são consideradas como vulneráveis ou em perigo, e acredita-se que duas estão em vias de extinção na

fauna mundial (Guedes, 2004), como é o caso da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixi*) que até recentemente conhecia-se apenas um espécime na natureza, mas em outubro de 2000 foi considerada como desaparecida. Entretanto, em todo o mundo, cerca de 71 indivíduos ainda vivem em cativeiro (IUCN, 2011).

Tabela 2. Algumas espécies de araras com seu tamanho, distribuição e situação na natureza.

Nome científico	Tamanho	Distribuição	Situação na natureza
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	93 cm	Bolívia, Brasil e Paraguai	Em perigo
<i>Ara ararauna</i>	80 cm	Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela, e Porto Rico.	Pouco preocupante
<i>Ara macao</i>	89 cm	Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela e Porto Rico.	Pouco preocupante
<i>Ara chloroptera</i>	90 cm	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Porto Rico.	Pouco preocupante
<i>Ara rubrogenis</i>	60 cm	Bolívia	Em perigo
<i>Ara glaucogularis</i>	85 cm	Bolívia	Criticamente em perigo

Fonte: Sick, 1997; Mahecha et al, 2005 e IUCN, 2011.

Determinação do sexo em araras

Em geral, as espécies de psitacídeos são monomórficas, ou seja, é muito difícil distinguir machos e fêmeas considerando apenas as características físicas. Alguns métodos empíricos de sexagem como diferenças de comportamento, biometria da cabeça e palpação da região da cloaca são falhos, apesar de ainda serem utilizados (Allgayer e Cziulik, 2007).

Um método de sexagem é a laparoscopia ou celioscopia, um procedimento cirúrgico que permite a visualização das gônadas masculinas e femininas na cavidade celomática. As desvantagens dessa técnica são o procedimento cirúrgico, a anestesia e o pós-cirúrgico que podem colocar em risco a vida do animal (Griffithis e Phil, 2000).

A cariotipagem, que é uma técnica citogenética, permite a identificação dos pares cromossômicos sexuais em metáfase, quando os cromossomos estão bem visíveis e separados. Diferentemente dos mamíferos, as fêmeas das aves são heterozigotas (ZW) e os machos homozigotos (ZZ) e os cromossomos diferem no tamanho, sendo o Z maior que o W (Dubiec e Zagalska-Neubauer, 2006). O material utilizado nessa técnica é a polpa das penas. É um exame muito demorado, pois depende de cultura celular que nem sempre se desenvolve, sendo uma técnica pouco utilizada (Griffithis e Phil, 2000).

Outra maneira para determinar o sexo em aves é a técnica de radioimunoensaio, em que a mensuração de metabólitos de esteróides sexuais é realizada em excretas cloacais por uma reação de antígeno-anticorpo. Contudo, uma série de fatores pode interferir na acurácia da técnica, como a alimentação, o fotoperíodo, o comportamento reprodutivo, a idade e a adaptação ao recinto, que alteram os níveis de esteróides das excretas (Dias, 2003).

O desenvolvimento das técnicas moleculares para sexagem constituiu um avanço em confiabilidade e rapidez na identificação do sexo em aves (Dubiec e Zagalska-Neubauer, 2006). Tal método foi revolucionado com a descoberta do gene ligado ao sexo localizado no cromossomo W, por Griffiths & Tiwari em 1995. Depois, uma cópia muito parecida desse gene foi encontrada também no cromossomo Z (Griffiths e Korn, 1997). O gene mais universal que tem sido detectado é o *CHD* ("chromo-helicase-DNA-binding") e é encontrado em quase todas as aves com exceção das ratitas. O gene *CHD-Z* é ligado ao cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos, e o gene *CHD-W* localiza-se no cromossomo W, presente somente nas fêmeas (Griffiths et al., 1998). Esse gene é a base da PCR que irá funcionar em todas as espécies (exceto nas ratitas), porque é um gene funcional e sua sequência de DNA é conservada, sendo encontrado em espécies filogeneticamente distantes. O exame pode ser realizado com amostras de sangue, penas e tecidos, permitindo que seja uma técnica minimamente invasiva, além de ser um procedimento simples, barato e confiável para determinação do sexo (Griffithis e Phil, 2000).

Aspectos hematológicos das aves

Colheita de sangue

O volume de sangue a ser punccionado de uma ave depende do seu peso e condição de saúde. Em aves saudáveis é possível colher um volume de sangue correspondente a no máximo 1% do seu peso corporal sem prejudicar a saúde do animal (Campbell, 1995; Samour e Howlett, 2008; Clark et al., 2009). O local mais apropriado para o acesso venoso em aves dependerá da espécie, do volume de sangue necessário e o método de contenção (Clark et al., 2009). Em animais de médio e grande porte a punção de sangue pode ser feita nas veias do plexo do membro peitoral (asa – basílica e braquial), do membro pélvico (tarsais e tibiais) ou jugular, com preferência à direita por ter maior calibre nas aves (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006). Em pequenas aves a colheita de sangue deve ser feita por meio de corte de unha ou punção na pele conhecido também por lancetamento (Campbell, 1995; Santos e Cubas, 2006).

As amostras podem ser acondicionadas em tubos ou capilares com anticoagulante. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é preferível para análises hematológicas em geral, entretanto pode ocorrer hemólise nas amostras de algumas aves. Já a heparina lítica é preferível quando o volume de amostras é limitado, permitindo que análises bioquímicas sejam obtidas na mesma amostra. O inconveniente da heparina é que pode interferir na coloração celular e causar aglomeração de células (Almosny e Monteiro, 2006; Santos e Cubas, 2006; Clark et al., 2009).

Hemograma

A avaliação do hemograma de aves tem se tornado uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças aviárias (Campbell, 1995). A abordagem na hematologia aviária é semelhante àquela da hematologia humana e de outros mamíferos, mas algumas características diferentes como as hemácias nucleadas, trombócitos e granulócitos heterófilos requerem modificações nos procedimentos hematológicos (Campbell, 2006). Nesse exame são avaliadas a série eritrocitária e leucocitária, a contagem de trombócitos e a morfologia de eritrócitos (Campbell, 1995).

A primeira etapa na realização de hemograma é a confecção do esfregaço sanguíneo, em que é realizado o diferencial leucocitário ao microscópio óptico e é possível observar a morfologia das células e a presença de hemoparasitos (Almosny e Monteiro, 2006) e preferencialmente deve ser corado com colorações do tipo

Wright, Giemsa ou Leishman (Campbell, 1995; Thrall, 2006; Samour e Howlett, 2008).

O volume globular, que mensura a porcentagem ocupada pelas células vermelhas no sangue, é obtido por meio da centrifugação de tubos capilares para microhematócrito em rotação de 10.000 a 12.000g durante 5 minutos (Clark et al., 2009). A contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos deve ser realizada manualmente com o auxílio de hematocitômetros (câmara de Neubauer^{improved®}) e microscópio óptico, após a diluição do sangue em solução fisiológica, solução de Gower ou de Natt-Harrick (Almosny e Monteiro, 2006). A hematimetria é obtida pela contagem das células em 5 quadrados centrais da câmara em aumento de 400x, multiplicando o número encontrado pelo fator de correção que varia de acordo com a diluição utilizada, resultando no número de hemácias por microlitro de sangue e a contagem de leucócitos e trombócitos é realizada nos quatro quadrantes obtendo o valor total com o fator de correção (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006).

A mensuração da concentração de hemoglobina no sangue é obtida pelo método manual com diluição em solução de Drabkin (método cianometahemoglobina) seguido por centrifugação e analisado em espectrofotômetro ou por método automatizado (Samour e Howlett, 2008).

Hemácias

Os eritrócitos maduros das aves são células elípticas com um núcleo central também elíptico. A cromatina nuclear é agregada e se torna mais condensada com o avanço da idade. Em esfregaços corados pelo Wright, o núcleo apresenta coloração púrpura e o citoplasma róseo-alaranjado com aspecto uniforme (Campbell, 1995; Thrall, 2006). Hemácias policromatófílicas (penúltimo estágio de maturação) são freqüentemente encontradas em pequena quantidade (até 5%) em muitas aves e apresentam o citoplasma mais basofílico e cromatina nuclear menos condensada. O aumento do grau de policromasia associado à presença de eritrócitos imaturos redondos pode indicar anemia regenerativa (Campbell, 2006; Clark et al., 2009). A diminuição da quantidade de hemácias no sangue pode ter diversas causas (Tabela 5) e resulta em anemia e menor oxigenação tecidual (Thrall, 2006)

Tabela 5: Algumas causas de anemia em aves:

Tipo de anemia	Causas
Anemia por perda de sangue	Injúria traumática
	Parasitismo
	Coagulopatia primária (raramente relatada em aves)
	Coagulopatia por por intoxicação (aflatoxicose e dicumarínicos)
Anemia hemolítica (regenerativa)	Desordens orgânicas (úlceras neoplásica ou gastrintestinal, ruptura de órgão)
	Hemoparasitos
	Septicemia bacteriana
	Intoxicação (mostarda, derivados de petróleo)
Anemia depressiva (arregenerativa)	Imunomediada (raramente relatada em aves)
	Doenças crônicas
	Hipotireoidismo
	Intoxicação (chumbo, aflatoxina)
	Deficiência nutricional (ferro e ácido fólico)
	Leucemia

Fonte: Campbell, 1994.

Trombócitos

Os trombócitos, ao contrário das plaquetas dos mamíferos que são fragmentos de citoplasma de megacariócitos, são oriundos de células mononucleares antecessoras. São células arredondadas ou ovais, pouco menores que os eritrócitos com núcleo central e cromatina densa, de coloração basofílica intensa, citoplasma hialino e com freqüência formam agregados em esfregaços sanguíneos. Têm como função participar do mecanismo hemostático e demonstram capacidade fagocitária (Grecchi et al., 1980 Almosny e Monteiro, 2006; Campbell, 2006a). Trombocitose pode ocorrer em infecções bacterianas e trombocitopenia por supressão da medula óssea ou excessiva demanda (Doneley, 2010).

Leucócitos

Os leucócitos presentes no sangue de aves são linfócitos, monócitos e granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) (Wakenell, 2010) e são as células de defesa do organismo. Leucocitose pode estar associada à situações de estresse sofridas pelo animal e à processos inflamatórios agudos infecciosos ou não infecciosos (Campbell, 2006). A leucopenia pode acontecer em inflamação crônica e em graves infecções bacterianas ou virais (Doneley, 2010).

Os heterófilos são o tipo mais comum de células encontradas nas aves, possuem grânulos eosinofílicos alongados que podem ser ovais ou arredondados em algumas espécies e núcleo lobulado com aspecto grosseiro e sua função é similar a dos neutrófilos de mamíferos, participando ativamente nas reações inflamatórias (Clark et al., 2009).

Os eosinófilos são células de mesmo tamanho dos heterófilos, de forma redonda a irregular dependendo da espécie, possuem o núcleo lobulado e citoplasma azul-claro com grânulos ovais eosinofílicos que se coram mais que os grânulos de heterófilos, entretanto, podem ser influenciados pelo tipo da coloração Romanowsky podendo parecer maiores, intumescidos, incolores ou azul-claros e o aumento de eosinófilos circulantes pode ser interpretado como uma resposta a presença de endoparasitas no organismo ou a exposição de antígenos que induzam hipersensibilidade (Campbell, 2006).

Nas aves, os basófilos são células redondas com grânulos extremamente basofílicos e metacrômicos no citoplasma, possuem o núcleo central azul claro que geralmente fica recoberto pelos grânulos, assemelhando-se aos mastócitos de mamíferos e é uma das primeiras células a participarem de uma resposta inflamatória aguda ou reação de hipersensibilidade (Wakenell, 2010).

Os linfócitos são o tipo de leucócitos mononucleares mais abundantes no sangue de algumas espécies de aves, podem ser classificados de acordo com o tamanho (pequenos, médios e grandes) sendo que os mais comuns são os pequenos e médios. São células tipicamente redondas assim como seu núcleo central de cromatina densa, possui citoplasma escasso levemente basofílico e ocasionalmente pode apresentar projeções conhecidas como “blebs” (Campbell, 1995). Linfopenia tem sido relatada em resposta aguda a corticosteroides em aves e também em certas doenças virais, já a linfocitose pode ser esperada associada a estimulação por certas infecções (Campbell, 2006).

Monócitos são grandes leucócitos mononucleares pleomórficos podendo apresentar formas arredondadas ou amebóides, a cromatina do núcleo é mais frouxa que a dos linfócitos e o citoplasma é azul acinzentado podendo apresentar vacúolos ou finos grânulos eosinofílicos (Campbell, 1995; Clark et al., 2009). Monocitose pode ser observada em certas doenças que produzem agentes quimiotáticos para os monócitos (clamidiose, infecção fúngica ou bacteriana e tecidos em necrose) e ainda em aves com deficiência de zinco (Campbell, 2006).

Bioquímica sérica

Os exames bioquímicos são comumente utilizados para avaliar o estado de saúde dos animais (Almosny e Monteiro, 2006). Os níveis de concentração de enzimas, metabólitos e minerais no sangue são influenciados por condições ambientais, processos fisiológicos e patológicos. As variações por motivo fisiológico podem ocorrer devido à idade, sexo, estado nutricional e espécie. Já nos processos patológicos, as alterações são devidas a dano celular ou função anormal de um órgão ou sistema (Doneley, 2010).

Alanina Aminotransferase (ALT)

A atividade sérica de ALT é um teste inespecífico para detecção de doença hepatocelular em aves, pois ocorre em diferentes tecidos (ex. músculo esquelético) (Campbell, 2006b). Em muitos casos, pacientes com severos danos hepáticos tem atividade de ALT normal, refletindo o baixo nível da enzima nas células hepáticas em certas espécies. Elevadas atividades são difíceis de interpretar e essa enzima tem limitada utilidade por aumentar em alterações mórbidas em quase todos os tecidos. A atividade de ALT em eritrócitos é 1,6 vezes maior do que no plasma, portanto hemólise pode ser causa de aumento dessa enzima. A elevação idade-dependente (aumenta com a idade) da enzima tem sido descrita em aves. Em aves de rapina, variação sazonal tem sido relatada associada com atividade reprodutiva (Hochleithner, 1994).

Aspartato Aminotransferase (AST)

Alta atividade de AST tem sido descrita no fígado, músculo esquelético, coração, cérebro e rins. A distribuição dessa enzima em tecidos de aves varia em função das espécies e atividade elevada é geralmente indicativa de dano hepático ou muscular. Em geral, considera-se aumento de AST valores acima de 275UI/L (Campbell, 2006b). Atividade de AST provê melhores informações quando associada a testes mais específicos, como a mensuração de creatinoquinase (CK), para excluir o dano muscular como causa de aumento da enzima. Os valores de AST são idade-dependente e variam entre espécies. Atividades anormais têm sido

relacionadas à deficiência de vitamina E, selênio, ou metionina, danos hepáticos (psitacose ou Doença de Pacheco), intoxicações por pesticidas e dano muscular (Hochleithner, 1994). Harr (2006) citou outras causas de aumento de AST, tais como infecções por bactérias, fungos, vírus (herpes vírus, adenovírus), hemoparasitos, intoxicações por aflatoxina e plantas tóxicas (*Gossypium* sp., *Brassica napus*, *Ricinus communis*) e neoplasias.

Fosfatase alcalina (FA)

A atividade de fosfatase alcalina tem sido encontrada no intestino, fígado, rins e ossos e não aumenta com uma simples injúria hepática (Harr, 2006). Baixas atividades de FA foram relatadas no fígado de pombas, psitacídeos, galinhas e perus. Aves jovens têm atividade de FA alta por causa do crescimento ósseo ou isso pode acontecer em animais com processo de consolidação de fraturas e em galinhas pode acontecer devido à postura de ovos. Embora a atividade de FA no fígado seja baixa, elevação de FA pode indicar dano hepático. Intoxicação por Aflatoxina B com destruição massiva do fígado em pombas, cacatuas e corujas não demonstraram aumentar FA (Hochleithner, 1994).

Proteínas totais e frações

O teor de proteínas plasmáticas normal é essencial para a manutenção da pressão osmótica que preserva o pH e o volume sanguíneo normais. As principais frações protéicas são albumina e globulinas (Bailey, 2008). A concentração plasmática normal em aves é menor que a de mamíferos. A albumina representa 40 a 70% da concentração total de proteínas sendo sintetizada no fígado. As imunoglobulinas sintetizadas pelos linfócitos B e plasmócitos são importantes componentes da proteína total sérica (Campbell, 2006b). A mensuração de proteínas pode auxiliar o diagnóstico de doenças gastrintestinais, hepáticas, renais ou infecciosas (Lumeij, 2008). As proteínas de fase aguda em caso de inflamação tipicamente resultam em aumento de globulinas e conseqüentemente das proteínas totais (Campbell, 2006b). A relação albumina/globulina pode estar diminuída em inflamações, nefropatias com perda de proteínas, hepatopatias e em fase de postura de ovos (Harr, 2002).

Hipoproteinemia pode refletir síntese reduzida causada por hepatopatias crônicas, mal absorção devido a enteropatias (enterites, tumores, parasitismo), perda de proteína por nefropatia, perda de sangue, tumores malignos, má nutrição e hiperidratação. Já a hiperproteinemia pode ser induzida por doenças infecciosas agudas ou crônicas por estimular a produção de globulinas e desidratação (Hochleithner, 1994).

Ácido úrico

Nas aves o produto final do metabolismo nitrogenado que se apresenta em maior quantidade é o ácido úrico (Almosny e Monteiro, 2006). É sintetizado no fígado e túbulos renais e cerca de 90% é eliminado por meio de secreção tubular renal e por isso é útil para avaliar função renal em aves (Hochleithner, 1994).

Entretanto, valores normais não garantem a ausência de nefropatia, pois é necessário que haja a perda de cerca de 75% da função do órgão para que o níveis de ácido úrico se elevem. Os valores plasmáticos de ácido úrico variam conforme a espécie, idade, dieta alimentar entre outros fatores. Em animais jovens os valores são menores que em adultos e os das aves carnívoras são mais elevados que os das granívoras (Almosny e Monteiro, 2006). Quando a concentração de ácido úrico é excessiva, esse metabólito pode se precipitar nos tecidos, principalmente articulações e vísceras, tal condição é conhecida como “gota” (Campbell, 2006).

A hipoureemia é raramente descrita nas aves, porém quando ocorre pode ser sugestiva de doença hepática (Hochleithner, 1994). Já a hiperuricemia pode acontecer no período de ovulação e pós-prandial, desidratação, nefropatias, hipervitaminoses A e D (Bailey, 2008).

Embora o teor sanguíneo de ácido úrico possa ser utilizado como indicador de função renal, ele não define o diagnóstico, mas pode ser útil para a monitoração do tratamento ou da evolução da doença, quando é obtida uma série de mensurações (Campbell, 2006).

Creatinina

A creatinina é um produto do catabolismo da creatina (encontrada no tecido muscular). A excreção da creatinina é feita somente pelos rins que a filtra livremente

e reabsorve nos túbulos (Harr, 2006). Em aves, a creatina é excretada na urina antes de ser convertida em creatinina. Isso pode ser a razão para que os níveis de creatinina sérica não resultem em um bom teste para avaliar a função renal. Em consequência, existe uma margem discreta entre os níveis fisiológicos e patológicos de creatinina. Com isso, esse parâmetro não é sensível para diagnóstico em aves e na maioria das espécies que tem sido investigada os intervalos de referência ficam entre 0,1 – 0,4 mg/dL, sem diferenças significativas. Em casos de injúrias severas nos rins pode ser observado aumento dos níveis de creatinina, especificamente se a taxa filtração está diminuída (Hochleithner, 1994). Elevações também têm sido descritas relacionadas com peritonites, septicemia, trauma renal ou drogas nefrotóxicas (Bailey, 2008).

Creatinina-quinase (CK)

A creatinina-quinase está localizada nos músculos esqueléticos, coração e cérebro. No músculo, essa enzima disponibiliza o ATP para a contração muscular. Elevações dessa enzima acontecem principalmente em danos de células musculares e as alterações fisiológicas de CK são bem conhecidas em aves (Hochleithner, 1994). O aumento da atividade de CK no plasma pode ser resultado de dano muscular associado à captura e contenção do animal (Lumeij, 2008). Os níveis de CK no sangue podem aumentar em até 72 horas após a injúria muscular (Harr, 2006). Aumentos nos níveis de CK tem sido relacionados à necrose muscular, convulsões, injeções intramusculares, deficiência de vitamina E e selênio e neuropatias (Hochleithner, 1994; Bailey, 2008).

Cálcio

Como o principal componente dos ossos, o cálcio desempenha um papel vital na estrutura do corpo. Ele também tem importante função fisiológica na transmissão de impulsos nervosos, ativação de enzimas (cascata de coagulação sanguínea), calcificação de cascas de ovos e contração uterina durante a oviposição (Bailey, 2008). O cálcio total pode ser interpretado associado às concentrações de albumina, pois cerca de 30 a 50% do cálcio plasmático está ligado a essa proteína. O teor de cálcio total diminui em hipoalbuminemia e aumenta em situações de hiperproteinemia (Campbell, 2006). Galinhas em ovulação apresentam níveis de

cálcio significativamente mais alto que as fêmeas não ativas reprodutivamente (Harr, 2002) e aves jovens geralmente têm menores concentrações de cálcio em relação aos adultos. Na síndrome hipocalcêmica ocorre diminuição de cálcio por hipoparatiroidismo, em que o cálcio não é devidamente liberado dos ossos. A terapia com glicocorticóides podem diminuir a concentração total de cálcio e em dietas com severa deficiência de cálcio o paratormônio mobilizará esse mineral dos ossos para mantê-lo em concentrações fisiológicas. Hipercalcemia tem sido observada em dietas com excesso de vitamina D, tumores ósseos, desidratação, hiperparatiroidismo (Hochleithner, 1994).

Hemoparasitos e a ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Parasitos são freqüentemente encontrados em esfregaços de sangue periférico de aves (Campbell, 1995). Nas últimas décadas, pesquisas tornaram cada vez mais claro que parasitos desempenham um papel decisivo na dinâmica e evolução das populações (Ricklefs 1992; Lively & Dybdahl 2000). Eles podem influenciar na sobrevivência e no sucesso reprodutivo, até mesmo causar a extinção de populações (Ricklefs, 1992) pelo fato de que os indivíduos mais parasitados podem ser mais suscetíveis aos predadores e menos hábeis para estabelecer territórios (Anderson e May, 1979).

Dentre os hemoparasitos de aves estão os filarídeos, os protozoários flagelados (*Trypanossoma*) e esporozoários intracelulares (Apicomplexa: Haemosporida) (Garnham, 1966). No último grupo estão classificadas as famílias Haemoproteidae, Plasmodiidae, Leucocytozoidae e Garniidae (Valkiūnas, 2005) (Tabela 3). Esses protozoários hemosporídeos são cosmopolitas, e podem ser encontrados desde montanhas de 3.000 metros de altura até ao nível do mar e já foram descritos parasitando diversos grupos de aves em todos os continentes exceto na Antártida (Valkiūnas, 2005; Sehgal, 2010).

Os hemosporídeos possuem grande importância ecológica e são amplamente utilizados em investigações da relação parasita-hospedeiro (Lively e Dybdahl, 2000; Krone et al., 2008). Estes servem como modelos para estudos ecológicos de especiação simpátrica (Pérez-Tris et al., 2007), ocasionam doenças em aves domésticas assim como a diminuição da produtividade e elevadas taxas de mortalidade (Valkiūnas, 2005). Aproximadamente 45% da avifauna mundial tem sido

analisada para infecção por hemoparasitos. Há registros do gênero *Haemoproteus* em cerca de 50% e *Plasmodium* e *Leucocytozoon* em 30% das aves investigadas (Tabela 3) (Valkiūnas, 2005).

Os hemosporídeos são heteroxenos obrigatórios, ou seja, desenvolvem-se em dois grupos de hospedeiros. Animais vertebrados como répteis, aves e mamíferos são seus hospedeiros intermediários e insetos dípteros hematófagos são os hospedeiros definitivos (vetores) (Kreiner, 1994). A necessidade de que parte do ciclo dos hemosporídeos ocorra em vetores dípteros, influencia na baixa prevalência ou ausência dos parasitos em regiões áridas, salinas, de elevada altitude, ou com baixas temperaturas, devido à escassez dos insetos nesses locais (Bennett et al., 1992; Valera et al., 2003). As aves que vivem em condições climáticas extremas e em áreas onde o vetor é ausente, somente são encontradas infectadas quando são transferidas para outros locais como zoológicos, programas de reprodução em cativeiro ou por serem animais de estimação. Tais aves são freqüentemente suscetíveis a infecção por parasitos que podem ser muito patogênicos para esses animais (Peirce, 2008).

Tabela 3. Número de espécies por família de parasitos hemosporídeos que foram descritos em ordens de aves.

Ordem	Haemoproteidae	Plasmodiidae	Leucocytozoidae	Garniidae
Sphenisciformes	0	2	1	0
Struthioniformes	0	0	1	0
Tinamiformes	0	3	0	0
Pelecaniformes	0	1	1	0
Ciconiiformes	4	4	2	1
Anseriformes	2	9	1	0
Falconiformes	6	5	1	0
Galliformes	9	17	7	0
Turniciformes	0	1	0	0
Gruiformes	5	8	1	0
Charadriiformes	5	2	2	0
Columbiformes	6	11	1	1
Psittaciformes	2	5	0	0
Cuculiformes	1	2	1	0
Musophagiformes	1	1	1	0
Strigiformes	2	5	1	0
Caprimulgiformes	1	3	1	0
Apodiformes	4	3	0	0
Coliiformes	1	0	1	0
Trogoniformes	1	0	0	0
Coraciiformes	10	4	4	0
Piciformes	9	8	1	0
Passeriformes	63	16	7	0

Fonte: modificado de Valkiūnas, 2005.

No Brasil, as pesquisas relacionadas aos hemosporídeos foram iniciadas pelo médico e parasitologista Adolpho Lutz, que estudou esses hemoparasitos no período entre 1893 e 1907, e designou maior atenção às aves. Este pesquisador, juntamente com sua equipe, examinou cerca de vinte ordens de aves e, em nove delas, encontrou hematozoários dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Pouco tempo depois, Henrique Aragão e Wladimir Lobato Paraense se dedicaram aos estudos a respeito de *Haemoproteus* e *Plasmodium*, respectivamente, e realizaram descobertas importantes acerca desses parasitos (Sá, 2011).

O Gênero *Plasmodium*

Plasmodium é o gênero de hemosporídeos mais estudado e conhecido, pois nele estão incluídos os agentes da malária humana (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), doença que ainda ocorre em muitas pessoas que vivem em países tropicais. Por isso, a infecção por *Plasmodium* em aves é conhecida como malária aviária (Valkiūnas, 2005). A palavra malária tem origem no idioma italiano medieval, no século XVII, significando “mau ar”, pois naquela época o agente etiológico ainda não havia sido descoberto e vinculava-se a doença ao odor fétido exalado dos pântanos (Cox, 2002). Entretanto, as espécies de *Plasmodium* que acometem aves são filogeneticamente mais próximas às espécies de *Haemoproteus* do que às espécies de *Plasmodium* de mamíferos (Pérez-Tris et al., 2005) e ainda as formas de plasmódios aviários são transmitidas por mosquitos da espécie *Culex*, enquanto os vetores das formas de mamíferos são da espécie *Anopheles* (Ricklefs, 2010).

Plasmódios podem ser patogênicos em canários, pingüins, galinhas domésticas, patos, pombas e falcões. Por outro lado, muitas aves, especialmente passeriformes, são freqüentemente carreadores assintomáticos (Greiner e Harrison; 1994, Campbell, 1995). Esses hemoparasitos devem ser considerados quando aves domésticas e silvestres são translocadas para regiões em que *Plasmodium* não seja endêmico, mas onde as condições para a transmissão dos mesmos são favoráveis. Por isso, os projetos de reintrodução de espécies raras e aves em desaparecimento para as regiões do seu habitat são freqüentemente ameaçados devido à transmissão ativa de espécies patogênicas desses parasitas. É interessante notar

que os serviços de quarentena de muitos países não incluem a malária aviária em seus programas (Valkiūnas, 2005).

Taxonomia

Os plasmódios aviários são taxonomicamente classificados na seguinte forma (Valkiūnas, 2005):

Reino Protista (Haeckel, 1866)

Filo Apicomplexa (Levine, 1970)

Ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gênero *Plasmodium* (Marchiafava e Celli, 1885)

Subgênero *Haemamoeba* (Grassi e Feletti, 1890)

- P. relictum* (Grassi and Feletti, 1891)
- P. cathemerium* (Hartman, 1927)
- P. matutinum* (Huff, 1937)
- P. gallinaceum* (Brumpt, 1935)
- P. giovannolai* (Corradetti, Verolini e Neri, 1963)
- P. lutzii* (Lucena, 1939)
- P. subpraecox* (Grassi e Feletti, 1892)
- P. griffithsi* (Garnham, 1966)
- P. tejeraei* (Gabaldon e Ulloa, 1977)
- P. coturnixi* (Bano e Abbasi, 1983)

Subgênero *Giovannolaia* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)

- P. lophurae* (Coggeshall, 1938)
- P. circumflexum* (Kikuth, 1931)
- P. polare* (Manwell, 1934)
- P. gundersi* (Bray, 1962)
- P. octamerium* (Manwell, 1968)
- P. pinottii* (Muniz e Soares, 1954)
- P. pedioecetae* (Shillinger, 1942)
- P. formosanum* (Manwell, 1962)
- P. durae* (Herman, 1941)
- P. hegneri* (Manwell e Kuntz, 1966)
- P. anasum* (Manwell e Kuntz, 1965)
- P. leanucleus* (Huang, 1991)
- P. fallax* (Schwetz, 1930)
- P. garnhami* (Guindy, Hoogstraal e Mohammed, 1965)
- P. gabaldoni* (Garnham, 1977)

Subgênero *Novyella* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)

- P. vaughani* (Novy e MacNeal, 1904)
- P. rouxi* (Sergent, Sergent e Catanei, 1928)
- P. hexamerium* (Huff, 1935)
- P. nucleophilum* (Manwell, 1935)
- P. dissanaikei* (Jong, 1971)
- P. bertii* (Gabaldon e Ulloa, 1981)
- P. columbae* (Carini, 1912)
- P. paranucleophilum* (Manwell e Sessler, 1971)
- P. kempfi* (Christensen, Barnes e Rowley, 1983)

Subgênero *Huffia* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)

- P. elongatum* (Huff, 1930)
- P. hermani* (Telford e Forrester, 1975)
- P. huffi* (Muniz, Soares e Batista, 1951)

Subgênero *Bennettini* (Valkiūnas, 1997)

- P. juxtannucleare* (Versiani e Gomes, 1941)

Cabe salientar que os subgêneros foram classificados conforme as características morfológicas e biológicas dos estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos (Valkiūnas, 2005).

Distribuição dos plasmódios

A malária aviária tem distribuição mundial e sua grande importância econômica está relacionada com a indústria avícola, pois tais hematozoários podem causar taxas significativas de morbidade e mortalidade em criações de aves domésticas (Soares et al., 1999). *Plasmodium* spp. já foi descrito em praticamente todos os continentes, exceto na Antártida (Garnham, 1966) e foram detectados em vários países como: República de Madagascar (Bennett e Blancou, 1974; Savage et al., 2009), Uganda (Bennett et al., 1974), Espanha (Valera et al., 2003), Alemanha (Krone et al., 2008), Escandinávia (Bensch e Akesson, 2003), Nova Zelândia (Howe et al., 2011), Japão (Murata, 2002), Malásia (Bennett e Warren, 1966), Estados Unidos (Califórnia e Alaska) (Martins et al., 2008; Yohannes et al., 2009), México (Carlson et al., 2011), Colômbia (Valkiūnas et al., 2003) e no Brasil (Paraense, 1949; Woodworth-Lynas et al., 1989; Soares et al., 1999; Ribeiro et al., 2005; Belo, 2011; Fecchio, 2011; Sebaio et al., 2012).

Algumas pesquisas relacionadas à infecção por *Plasmodium* em psitacídeos no Brasil já foram realizadas. Dentre esses estudos, Belo e colaboradores (2009) avaliaram a ocorrência de malária aviária em papagaios e araras mantidos em condições de cativeiro em dois estados no Brasil (Minas Gerais e Ceará), por meio de exame microscópico de esfregaços sanguíneos e amplificação do gene 18SSU rRNA de *Plasmodium*, e obtiveram alta ocorrência de *Plasmodium* spp. (36% das aves). No Rio de Janeiro, Silva (2011) pesquisou os aspectos clínicos e laboratoriais da malária aviária, assim como sua prevalência em araras-canindé (*Ara ararauna*) cativas, e observou em microscopia óptica de esfregaços sanguíneos que 30,19% dos animais apresentaram infecção por plasmódios, porém com baixa parasitemia individual.

Hospedeiros aviários

Os hemosporídeos filogeneticamente relacionados podem parasitar espécies hospedeiras de aves distantemente relacionadas, assim como espécies de parasitos distantemente relacionados podem partilhar uma única espécie de hospedeiro (Beadell et al., 2004; Peirce, 2008; Njabo et al., 2010). Por exemplo, alguns plasmódios apresentam alta especificidade por seus hospedeiros aviários, como o *Plasmodium juxtannucleare* que foi descrito somente em galinhas domésticas (*Gallus gallus*), entretanto outras espécies podem ser encontradas em diferentes ordens de aves, como é o caso do *P. relictum* que já foi encontrado parasitando Passeriformes, Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Psittaciformes, entre outros (Garnham, 1966; Valkiūnas, 2005). Em um estudo, Waldenström e colaboradores (2002) observaram que 44% das 18 linhagens de hemosporídeos analisadas foram detectadas em mais de uma espécie de hospedeiro, indicando que é possível o compartilhamento de hospedeiro por mais de um parasito (Tabela 4).

Tabela 4: Espécies de *Plasmodium* aviário que já foram descritas em algumas ordens de aves:

Ordem de aves	Espécie de <i>Plasmodium</i>
Passeriformes	<i>P. relictum</i>
	<i>P. cathemerium</i>
	<i>P. matutinum</i>
	<i>P. giovannolai</i>
	<i>P. fallax</i>
	<i>P. circumflexum</i>
	<i>P. polare</i>
	<i>P. pinottii</i>
	<i>P. octamerium</i>
	<i>P. leanucleus</i>
	<i>P. vaghani</i>
	<i>P. rouxi</i>
	<i>P. hexamerium</i>
<i>P. nucleophilum</i>	
<i>P. paranucleophilum</i>	
<i>P. elongatum</i>	
Anseriformes	<i>P. relictum</i>
	<i>P. circumflexum</i>
	<i>P. polare</i>
	<i>P. anasum</i>
	<i>P. hegneri</i>
	<i>P. gabaldoni</i>
	<i>P. vaghani</i>
	<i>P. nucleophilum</i>
<i>P. elongatum</i>	
Columbiformes	<i>P. relictum</i>
	<i>P. cathemerium</i>
	<i>P. circumflexum</i>
	<i>P. polare</i>
	<i>P. lophurae</i>
	<i>P. gabaldoni</i>
	<i>P. vaghani</i>
	<i>P. columbae</i>
<i>P. nucleophilum</i>	
<i>P. dissanaikei</i>	
Falconiformes	<i>P. relictum</i>
	<i>P. fallax</i>
	<i>P. circumflexum</i>
	<i>P. polare</i>
	<i>P. elongatum</i>
Psittaciformes	<i>P. relictum</i>
	<i>P. circumflexum</i>
	<i>P. vaghani</i>
	<i>P. nucleophilum</i>
	<i>P. dissanaikei</i>

Fonte: Valkiūnas, 2005 (modificada).

Vetores

As espécies de vetores não são determinadas para a maioria de hemosporídeos. Os plasmódios se desenvolvem somente em espécies de dípteros hematófagos da família Culicidae. O grande número de espécies de *Plasmodium* estudados é transmitido por representantes do gênero *Culex*, *Culiseta*, *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Wyeomyia* (Valkiūnas, 2005). Alterações climáticas podem afetar a distribuição de espécies de vetores, devido à modificação das condições de reprodução e alimentação e conseqüentemente são fatores que influenciam a transmissão da doença (Cook e Karesh, 2008). Em adição, surtos de *Plasmodium* podem ocorrer esporadicamente em áreas endêmicas e principalmente em locais onde ocorre aumento da população de mosquitos transmissores (Campbell, 1995).

A introdução de espécies de mosquitos pode causar sérios danos ao ecossistema invadido, conforme pôde ser observado no Havaí, onde a malária aviária era considerada ausente e surgiram casos da doença a partir do século XIX após a introdução do mosquito *Culex quinquefasciatus* nas ilhas havaianas. Esse acontecimento causou conseqüências dramáticas, pois o parasito *Plasmodium relictum* carregado provavelmente por aves migratórias e transmitido às aves nativas por meio do vetor introduzido desempenhou um importante papel na diminuição populacional ou até mesmo a extinção de várias espécies de aves endêmicas da família Drepanidae (Warner, 1968; Van Riper III et al., 1986).

Ciclo biológico

O conhecimento atual do ciclo biológico de plasmódios foi acumulado principalmente entre as décadas de 1930 a 1950, pois esses hematozoários foram amplamente utilizados em modelos experimentais para estudos da malária humana. O ciclo de vida do *Plasmodium* é heteroxeno obrigatório, portanto depende de um hospedeiro invertebrado (definitivo), que são as fêmeas de dípteros hematófagos em que ocorre o processo sexual do parasito, e um hospedeiro vertebrado (intermediário) (Valkiūnas, 2005).

O desenvolvimento do parasito nas aves pode ser dividido em merogonia exoeritrocítica, merogonia eritrocítica e formação de gametócitos. A merogonia

exoeritrocítica é dividida em primária (pré-eritrocítica) e secundária (pós-eritrocítica). A merogonia exoeritrocítica primária consiste em duas gerações de merontes que são chamadas de criptozoítos e metacriptozoítos, respectivamente. A merogonia exoeritrocítica secundária inclui várias gerações de merontes, que são chamadas de fanerozoítos (Paraense, 1944; Valkiūnas, 2005).

A Figura 1 esboça o ciclo biológico do *Plasmodium* em que a transmissão do parasito ocorre quando o vetor se alimenta do sangue de uma ave infectada e ingere formas sexuadas denominadas gametócitos que irão formar o estágio de oocisto no estômago do vetor. Por meio da esporogonia são desenvolvidos nos oocistos os esporozoítos que são liberados na hemocele para seguirem em direção às glândulas salivares e dessa forma, infectar o hospedeiro vertebrado ao ser picado pelo vetor. Os esporozoítos penetram nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) presentes no local da inoculação e, posteriormente, nas células do SFM da camada endotelial dos capilares sanguíneos cerebrais, do baço, fígado, rins, pele e de outros órgãos dependendo da espécie de parasito. A partir dos esporozoítos são originados a primeira geração de merontes primários exoeritrocíticos (criptozoítos) e estes não têm a capacidade de infectar células sanguíneas. Os merozoítos desenvolvidos em criptozoítos induzem a segunda geração de merozoítos exoeritrocíticos (metacriptozoítos), que se desenvolvem em macrófagos presentes em muitos órgãos. Os merozoítos formados nos metacriptozoítos são capazes de infectar as células eritrocíticas. Uma parte dos merozoítos desenvolvidos nos metacriptozoítos induz a próxima geração de metacriptozoítos e fanerozoítos, enquanto a outra parte invade os eritrócitos, originando aos estágios agâmicos que são os gametócitos. Alguns metacriptozoítos que penetram em eritrócitos jovens e/ou maduros originam formas do parasito chamadas de trofozoítos. Uma parte dos merozoítos formados em merontes eritrocíticos induz o próximo ciclo de merogonia eritrocítica e originam os gametócitos enquanto os demais penetram nas células endoteliais dos capilares de muitos órgãos incluindo o cérebro. O número de merozoítos dentro de cada meronte é uma das principais características na identificação dos plasmódios (Paraense, 1944; Valkiūnas, 2005; Peirce, 2008). Os merontes eritrocíticos contêm pigmentos granulares de coloração dourada, marrom ou preta, que se agrupam nos merontes maduros. Esse pigmento é um produto insolúvel resultante do processo de degradação da hemoglobina pelo *Plasmodium*, conhecido como hemozoína

(pigmento malarial) e são bastante refringentes na microscopia óptica (Yamada e Sherman, 1979).

O tempo de maturação desde a inoculação dos esporozoítos na ave até a maturação da primeira geração de metacriptozoítos é chamado de período pré-patente, que não excede 120 horas para o *Plasmodium relictum* (Valkiūnas, 2005). A maturação da primeira geração de fanerozoítos geralmente coincide com o período agudo da parasitemia e os fanerozoítos junto com merontes eritrocíticos produzem merozoítos que mantêm a parasitemia durante a fase crônica da infecção. Ainda, os fanerozoítos são responsáveis pelas “recaídas”, em que uma parasitemia secundária ocorre após um período latente da infecção. Tais “recaídas” geralmente são sincronizadas com a época de reprodução das aves, que é importante para a infecção dos vetores e disseminação dos parasitos para os filhotes, o que contribui para a manutenção da malária na vida selvagem (Garnham, 1966).

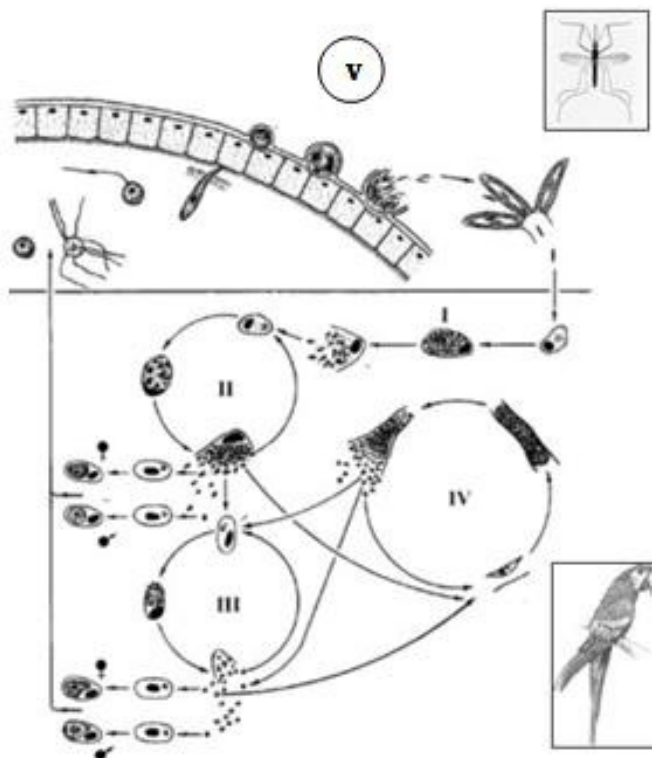


Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. I, II – merogonia exoeritrocitária primária; III - merogonia eritrocitária; IV – merogonia exoeritrocitária secundária e V – fase sexuada no vetor (modificado de Valkiūnas, 2005).

A ave uma vez infectada por *Plasmodium* mantém o parasito por muitos anos ou pela vida toda, atuando como fonte de infecção para os vetores (Valkiūnas, 2005). O ciclo de merogonia intraeritrocítico continua indefinidamente ou até que o sistema imune do hospedeiro intervenha ou ocorra a morte da ave (Peirce, 2008).

Patogenia da infecção por *Plasmodium*

As alterações mórbidas em aves causadas por infecção de espécies de plasmódios são diversas. Uma característica do desenvolvimento da primeira geração de merontes exoeritrocíticos é que geralmente não causam alterações graves nas aves, pois o número de merontes e seus tamanhos ainda são pequenos e, embora o desenvolvimento seja rápido, a reação inflamatória normalmente não é pronunciada (Valkiūnas, 2005). Entretanto, as alterações se tornam mais acentuadas nas fases seguintes de geração de merontes e a mais severa está associada com o bloqueio pelos fanerozoítos e algumas vezes pelos metacriptozoítos dos capilares cerebrais e de outros órgãos vitais, ocasionando anóxia tecidual seguida de morte celular e necrose significativa. Por isso, muitas vezes as aves infectadas apresentam paralisia cerebral, resultando em alterações neurológicas (Al Dabagh, 1961; Valkiūnas, 2005).

A conseqüência mais grave da malária é a ocorrência de destruição de hemácias e anemia. Uma causa geral dessa alteração é a 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; Valkiūnas, 2005). A destruição de eritrócitos também está associada com o desenvolvimento de numerosos merontes eritrocíticos, e, 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 e Manwell, 1977).

Outras características relacionadas à malária são a esplenomegalia e hepatomegalia associadas com hiperplasia de células linfóides macrófágicas e aumento da vesícula biliar, pois as formas exoeritrocíticas de *Plasmodium* se concentram nesses órgãos (Fowler e Fowler, 2001; Paraense 2004; Williams, 2005; Valkiūnas, 2005). Em infecções graves o órgão pode aumentar em até 20 vezes do volume normal, o que

pode causar sua ruptura. Pode ainda, ser observado o acúmulo de pigmento (hemozoína) em macrófagos e o baço e fígado podem adquirir aspecto enegrecido (Valkiūnas, 2005). Já foram descritas formas exoeritrocíticas de *Plasmodium* em outros órgãos como pulmões, coração e rins (Fix et al., 1988; Graczyk et al., 1995), além de ascite e edema pulmonar (Fowler e Fowler, 2001).

Diagnóstico clínico e laboratorial da malária aviária

Geralmente, os parasitos da malária aviária parecem ter uma relação comensal com a maioria de seus hospedeiros, mas podem se tornar patogênicos em condições especiais (Julian e Galte, 1980) e têm sido descritas cepas não-patogênicas que podem causar infecções assintomáticas em cacatuas e pássaros (Greiner e Harrison, 1994). Contudo, o *Plasmodium* pode ter um impacto negativo em seus hospedeiros especialmente quando são expostos pela primeira vez ao parasito. Mas, quando o animal consegue se recuperar da infecção, poderá adquirir resistência às recidivas posteriores, o que pode ser um aspecto benéfico. Além disso, a capacidade imunológica do hospedeiro influencia o tipo de infecção a ser desenvolvida (sintomática ou não) (Esparza et al., 2004). Por exemplo, pingüins têm pouca ou nenhuma resistência inata ao *Plasmodium* e podem sucumbir de forma grave à infecção (Fowler e Fowler, 2001). A interação de vários fatores (genética, condição imunológica, idade, fonte de alimentação, estresse e disponibilidade de abrigos) pode influenciar no desenvolvimento da infecção dos animais (Valkiūnas, 2005).

Os sinais clínicos de infecções por *Plasmodium* incluem apatia, depressão, fraqueza, letargia, dispnéia, alterações neurológicas, convulsões, febre, perda de peso, e morte súbita (Greiner e Harrison, 1994; Campbell, 1995; Fowler e Fowler, 2001; Williams, 2005; Almosny e Monteiro, 2006; Peirce, 2008).

Nos exames laboratoriais de aves com malária pode ser observado anemia hemolítica, leucocitose, linfocitose, hemoglobinúria, biliverdinúria. Na bioquímica sérica podem ocorrer alterações nas concentrações de proteínas séricas (redução de albumina e aumento de globulinas), aumento de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e diminuição de creatinina (Graczyk et al., 1995; Williams, 2005; Harr, 2006).

Métodos para diagnóstico de *Plasmodium*

Há mais de cem anos os plasmódios têm sido estudados com o auxílio da microscopia óptica. Grande parte do conhecimento atual relacionados a esses parasitos deve-se a esse tipo de exame (Valkiūnas, 2005).

A identificação de gênero de hemoparasitos aviários pode ser feita por microscopia óptica geralmente a partir das características morfológicas do organismo em um esfregaço de sangue periférico corado com colorações do tipo Romanowsky (Leishman e colorações Giemsa) e examinado por um profissional bem treinado (Campbell, 1995; Valkiūnas, 2005).

A detecção de *Plasmodium* é baseada na presença de gametócitos intraeritrocíticos (pigmentados), trofozoítos e esquizontes (Campbell, 1995). Em infecções iniciais, somente trofozoítos e esquizontes podem ocorrer nos eritrócitos, o que dificulta o diagnóstico específico. Em contrapartida, durante as infecções crônicas somente gametócitos podem estar presentes e se forem de espécie alongada, podem ser facilmente confundidas com *Haemoproteus* (Peirce, 2008).

O organismo também pode ser encontrado em trombócitos, leucócitos e células endoteliais. Certas espécies de *Plasmodium* têm gamontes redondos a irregulares que deslocam o núcleo da célula hospedeira, e outras espécies têm gamontes alongados que também podem realizar esse deslocamento. Macrogametócitos coram em azul mais intenso que microgametócitos. Os gametócitos contêm pigmentos granulares refringentes amarelos ou marrons (hemozoína) (Campbell, 1995).

Uma limitação do método de detecção de plasmódios por meio de microscopia óptica é a impossibilidade de identificar espécies na maioria dos esfregaços, mesmo por especialistas experientes. Sendo que para infecções por *Plasmodium* essa limitação aumenta devido à baixa parasitemia que geralmente é observada nesse tipo de infecção (Valkiūnas, 2005). E ainda, para a identificação de muitas espécies do parasito é necessário o exame de formas parasitárias colhidas durante todo o seu ciclo de vida, o que nem sempre é possível (Garnham, 1966).

Os exames sorológicos que detectam anticorpos para malária aviária têm sido utilizados como ferramenta de diagnóstico para a doença. Em um experimento realizado em passeriformes havaianos (*Hemignathus virens*) foi observado que os anticorpos foram detectáveis oito dias após a infecção por *Plasmodium* e até os

1.200 dias seguintes por meio do método “immunoblotting”, mesmo nos momentos em que os parasitos não eram facilmente encontrados na microscopia óptica devido à baixa parasitemia, com isso, concluíram que esse método sorológico é efetivo para identificar aves com infecção malarial crônica e de baixa intensidade (Atkinson et al., 2001). Em contrapartida, amostras de aves na Samoa Americana (Polinésia Central) que foram positivas em exame de PCR para *Plasmodium* spp. não mostraram reação na técnica de “immunoblotting” com o auxílio de extrato de eritrócitos infectados por *Plasmodium relictum* do Havaí, o que sugeriu uma possível diferença antigênica entre os isolados de *Plasmodium* de Samoa e do Havaí (Jarvi et al., 2006).

A quantidade de trabalhos relacionados às pesquisas de hemoparasitos em aves tem aumentado significativamente desde a introdução de métodos baseados na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a identificação do parasito (Bensch et al., 2009). A PCR é baseada em uma reação de polimerização em cadeia, onde se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua replicação exponencial. Assim, um gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado, podendo ser posteriormente visualizado como uma banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio de eletroforese (Silva-Pereira, 2003). Para os protozoários, o método utiliza o conhecimento da variação das seqüências para detectar linhagens específicas de diferentes parasitos permitindo que limitadas quantidades de amostra de um espécime seja analisada, como sangue por exemplo (Henning et al., 1999). Existem protocolos que são capazes de detectar infecções por hemosporídeos em um eritrócito entre 100.000 não infectados (Waldenström et al., 2002).

Investigações moleculares por meio de PCR adicionaram aspectos importantes no conhecimento a respeito da filogenia e especificidade pelo hospedeiro vertebrado (Ricklefs, 2004; Bensch et al., 2007; Krone et al., 2008). Diversos genes têm sido utilizados como alvos na PCR para identificação dos hemosporídeos, tais como o gene codificador do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA), mais especificamente da subunidade menor (SSU), do *Plasmodium* e o ácido desoxirribonucléico mitocondrial (gene do citocromo b), que são seqüências estáveis e bastante conservadas em espécies congênicas e não são encontradas no hospedeiro ou em outros patógenos comuns (Li et al., 1995; Bensch et al., 2004). O primeiro estudo realizado por meio de PCR para hemosporídeos foi realizado por

Feldman e colaboradores (1995) com a finalidade de amplificar *Plasmodium* de amostras de aves havaianas. Para isso, foram utilizados oligonucleotídeos para amplificar o gene codificador do 18S rRNA. Anos após, Bensch e colaboradores (2000) desenvolveram um protocolo que detecta *Plasmodium* e *Haemoproteus* conjuntamente por meio da sequência do citocromo b dos parasitos. O último protocolo já passou por modificações sutis (Hellgren et al. 2004; Waldenström et al. 2004) e atualmente é o mais utilizado (Bensch et al., 2009).

Uma análise foi realizada por Richard e colaboradores (2002), em que compararam quatro protocolos de PCR para detectar a presença de malária aviária no sangue de espécies de pássaros africanos. Dois protocolos eram compostos por oligonucleotídeos para o citocromo b e os outros utilizam como alvo o gene 18SSU rRNA e foi concluído que os protocolos que amplificaram o citocromo b mostraram ser mais confiáveis em relação aos que detectaram o gene ribossomal.

Embora a variação da sequência dos parasitos possa inibir o alinhamento específico de oligonucleotídeos e conseqüentemente, a amplificação de alguns indivíduos e possam ocorrer falsos negativos por insuficiente concentração de DNA do hematozoário, a PCR é considerada um recente avanço na detecção de malária, pois muitas desvantagens associadas à pesquisa do parasito por microscopia são amenizados, apresentando maior sensibilidade e resultados mais rápidos (Singh et al., 1999; Richard et al., 2002; Waldenström et al., 2004; Ribeiro et al., 2005). Entretanto alguns autores defendem a utilização da microscopia mostrando como o método pode ser eficiente e confiável para a detecção *Plasmodium* (Valkiūnas et al., 2008; Krone et al., 2008).

OBJETIVOS

O presente estudo teve como principais objetivos:

- Determinar a ocorrência da infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro por meio da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e microscopia óptica.
- Comparar os resultados da PCR com achados na microscopia óptica.

- Comparar o perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados por *Plasmodium* spp. com aquele dos animais não infectados.

REFERÊNCIAS

AL DABAGH, M.A. Symptomatic partial paralysis in chicks infected with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p.217–221, 1961.

ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.344-350, 2007.

ALMOSNY, N.R.P. e SANTOS, L.C. **Laboratory Support in Wild a Animal Medicine**. In: FOWLER, M., CUBAS, Z.S. Biology, Medicine and Surgery of South Wild Animals. Iowa State University, p. 503, 2001.

ALMOSNY, N.R.P. e 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**. v. 280, p. 361-367, 1979.

ANDRIOLO, A. **Desafios para a Conservação da Fauna**. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Selvagens. Roca, São Paulo, p. 19-25, 2007.

ATKINSON, C.T.; DUSEK, R.J.; LEASE, J.K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n.1, p. 20–27, 2001.

BAILEY, T.A. **Biochemistry**. In: SAMOUR, J. Avian Medicine. Elsevier 2^a ed., p. 52 – 62, 2008.

BEADELL, J.S.; GERING, E.; AUSTIN, J.; DUMBACHER, J.P.; PEIRCE, M.A.; PRATT, T.K.; ATKINSON, C.T.; FLEISCHER, R.C. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3829–3844, 2004.

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**, v. 88, 220–224, 2009.

BELO, N.O. **Prevalência e Diversidade de Haemosporida em aves silvestres de diferentes habitats no Brasil e na Venezuela**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. 119p. (Doutorado em Parasitologia).

BENNETT, G.F.; WARREN, M. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941. I. Description of the stages in the vertebrate host. **The Journal of Parasitology**. v. 52, n. 3, p. 565-569, 1966.

BENNETT, G.F.; EARLIE, R.A.; DU TOIT, H.; HUCHZERMEYER, F.W.. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-saharan birds. **Onderstepoort** , v. 59, p. 1–7, 1992.

BENNETT, G.F.; BLANCOU, J. A note on the blood parasites of some birds from the Republic of Madagascar. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 10, p. 239-240, 1974.

BENNETT, G.F.; OKIA, N.; CAMERON, M.F. AVIAN HEMATOZOA OF SOME UGANDAN BIRDS. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 10, p. 458-465, 1974.

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; ÖSTMAN, 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 the Royal Society of London Series B: **Biological Sciences**, v. 267, p. 1583–1589, 2000.

BENSCH, S.; AKESSON, S. Temporal and Spatial Variation of Hematozoans in Scandinavian Willow Warblers. **J. Parasitol.**, v.89, n.2, p. 388-391, 2003.

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**. v. 9, p. 1353–1358, 2009.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Threat birds of the world**. Barcelona/Cambridge: Lynx/Birdlife, 2000.

CAMPBELL, T.W. **Hematology**. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. Avian Medicine: Principles and Application. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida. Cap. 9. p. 177 – 198. 1994.

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

CAMPBELL, T.W. **Hematologia de Aves**. In: THRALL, M.A. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. ROCA, São Paulo, p. 215-247, 2006a.

CAMPBELL, T.W. **Bioquímica Clínica de Aves**. In: THRALL, M.A. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. ROCA, São Paulo, p. 449 – 460, 2006b.

CARLSON, J.S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, J.E.; CORNEL, A.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R.N. Implications of *Plasmodium* parasite infected mosquitoes on an insular avifauna: the case of Socorro Island, México. **Journal of Vector Ecology** , v. 36, n. 1, p. 213-220, 2011.

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

COLLAR, N.J. **Family Psittacidae (parrots)**. In: Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (Ed.). Handbook of the birds of the world:sandgrouse to cuckoos. Barcelona: Lynx Edicions, v.4, p.280-447, 1997.

COX, F. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 595-612, 2002.

COOK, R.A.; KARESH, W.B. **Emerging Diseases at the Interface of People, Domestic Animals, and Wildlife**. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R. E. Zoo And Wild Animal Medicine Current Therapy. Cap. 6, p. 55-65. Elsevier Inc. 2008

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo:Roca, 2006.

DONELEY, B. **Interpreting diagnostics tests**. In: DONELEY, B. Avian Medicine and Surgery in Practice Companion and aviary birds. 2010. Cap 4. p. 69 – 92.

DIAS, E.A. **Determinação do sexo em psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia de polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais**. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. (Dissertação de mestrado em Reprodução Animal).

DUBIEC, A.; ZAGALSKA-NEUBAUER, M. Molecular techniques for sex identification in birds. **Biological Letters**, v. 43, n. 1, p. 3-12, 2006.

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, p. 01–07, 2004.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E.M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, n. 3, p.127-135, 2007.

FECCHIO, A. **Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (*Haemoproteus e Plasmodium*) em aves do cerrado do Brasil**. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 2011. 116p. (Tese de doutorado em Biologia Animal).

FIX, A.S; WATERHOUSE, S.; 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, n. 4, p.610 – 619, 1988.

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.

FRIDOLFSSON, A.K.; ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology**, v. 30, p. 116-121, 1999.

GARNHAM, P.C.C. **Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., 1966.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; BICKNESE, E.J. Evaluation of serum chemistry values associated with avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitology Research**. v. 81, n. 4, p.316-319, 1995.

GRECCHI, R.; SALIBA, A. M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and

thrombocytes *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Pathology**, v. 130, n. 1, p. 23–31, 1980.

GODOY, S.N. **Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito)**. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Selvagens. Roca, São Paulo, p. 129, 2007.

GRAJAL, A. **The Neotropics (Americas)**. In: SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. Parrots. Status survey and conservation action plan 2000–2004. The World Conservation Union (IUCN), Gland, Switzerland & Cambridge, Oxford, UK. Cap. 7, p. 98-151, 2000.

GREINER, E.C. e 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.

GRIFFITHS, R.; KORN, R. A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. **Gene**, v. 197, p.225-229, 1997.

GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M.C.; ORR, K. e DAWSON, R.J.G. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071-1075, 1998.

GRIFFITHS, R.; PHIL, D. Sex Identification in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n.1, p. 14-26, 2000.

GUEDES, N.M.R.; SCHERER, P.N. **Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures)**. In: FOWLER, M., CUBAS, Z.S. Biology, Medicine and Surgery of South Wild Animals. Iowa State University, p. 146, 2001.

GUEDES, N.M.R. Management and conservation of the large macaws in the wild. **Ornitologia Neotropical**, v.15 (Suppl.), p. 279–283, 2004.

HARR, K.E. Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, 2002.

HARR, K.E. **Diagnostic Value of Biochemistry**. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Inc., Florida. Cap. 23 p. 616, 2006.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, e *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

HENNING, L.; FELGER, I.; BECK, H. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. **Acta Tropica**, v. 72, p.149–155, 1999.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian Medicine: Principles and Application*. 1994. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida. Cap. 11. p. 223 - 245.

HOWE, L.; CASTRO, I.C.; SCHOENER, E.R.; HUNTER, S.; BARRACLOUGH, R.; ALLEY, M.R. Malaria parasites (*Plasmodium* spp.) infecting introduced, native and endemic New Zealand birds. **Parasitology Research**, v. 110, n.2, p. 913-923, 2012.

INSTITUTO ARARA AZUL. Projeto Arara Azul, Araras brasileiras, 2009. <http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Ararasbrasileiras/tabid/310/Default.aspx> (acesso em 07/05/2012).

IUCN, INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Red List of Threatened Species, 2011. (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>) (acesso em 14/05/2012).

JARVI, S.I.; FARIAS, M.E.M.; BAKER, H.; FREIFELD, H.B.; BAKER, P.E.; VAN GELDER, E.; MASSEY, J. G.; ATKINSON, C.T. Detection of avian malaria (*Plasmodium* spp.) in native land birds of American Samoa. **Conservation Genetics** v. 4, p. 629–637, 2003.

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.

KREINER, J.P. **Parasitic protozoa**. Academic Press, New York, 1994.

KRONE, O.; WALDENSTRÖM, J.; VALKIUNAS, 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**, v. 94, n. 3, p. 709–715, 2008.

LUMEIJ, J.T. **Avian Clinical Biochemistry**. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6ed, Academic Press, San Diego, 2008.

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.

LIVELY, C.M. & DYBDAHL, M.F. Parasite adaptation to locally common host genotypes. **Nature**, v. 405, p. 679–681, 2000.

NJABO, K .Y.; CORNEL, A.J.; BONNEAUD, C.; TOFFELMIER, E.; SEHGAL, R.N.M.; VALKIŪNAS, G.; RUSSELL, A. F.; SMITH, T.B. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. **Molecular Ecology**, v.20, n. 5, p. 1049-61, 2011.

MAHECHA, J.V.R.; SUÁREZ, F.R.; ARZUZA, D.E.; HERNÁNDEZ, A.G. **Loros, Pericos e Guacamayas Neotropicales**. Conservación Internacional, 2005.

MARTINS, E.S.; BLUMBERG, B.J.; EISEN, R.J.; SCHALL, J.J. Avian Hemosporidian Parasites from Northern California Oak Woodland and Chaparral Habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 260–268, 2008.

MURATA, K. Prevalence of blood parasites in Japanese Wild Birds. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 9, p. 785-790, 2002.

PARAENSE, W.L. O ciclo eritrocitário dos parasitos da malária. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 47, n. 3, 1944.

PARAENSE, W.L. Um inquérito sôbre a ocorrência do "*Plasmodium juxtannucleare*" em Bambuí (Estado de Minas Gerais). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 47, p. 3 – 4, 1949.

PARAENSE, W.L. A Fragment of Malaria History. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.4, p. 439-442, 2004.

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

PÉREZ-TRIS, J.; HASSELQUIST, D.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. What are malaria parasites? **Trends In Parasitology**, v. 21, p. 209-211, 2005.

PÉREZ-TRIS, J.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENÉ, A.; WALDENSTRÖM, J.; SECONDI, J. et al. Within-Host Speciation of Malaria Parasites. **PLoS ONE** v. 2, n. 2, p 235, 2007.

QUINTANA, F.; LÓPEZ, G.C.; SOMOZA, G. A Cheap and Quick Method for DNA-based sexing of birds. **Waterbirds**. v. 31, n. 3, p. 485-488, 2008.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F.C.S.; 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**, v. 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**, v. 88, n. 4, p. 819–822, 2002.

RICKLEFS, R.E. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 89, p. 4722-4725, 1992.

RICKLEFS, R.A., 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. Host–pathogen coevolution, secondary sympatry and species diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 1139–1147, 2010.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S.; MARINI, M. Â.; VAGO, A. R.; BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261–267, 2005.

SÁ, M.R. Os estudos em malária aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945). **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v.18, n.2, p.499-518, 2011.

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

SANTOS, L.C.; CUBAS, P.H. Coleta e conservação de amostras biológicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo:Roca, 2006. pp. 931.

SAVAGE, A.F.; ROBERT, V.; GOODMAN, S.M.; RAHARIMANGA, V.; RAHERILALAO, M.J.; ANDRIANARIMISA, A.; ARIEY, F.; GREINER, E.C. Blood Parasites In Birds From Madagascar. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 907–920, 2009.

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M.A.. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 7-15, 2012.

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

SEHGAL, R. N. M. Deforestation and avian infectious diseases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 955-960, 2010.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Vol. 1, p. 291—314, 1997.

SILVA-PEREIRA, I. **Amplificação de DNA por PCR**. In: AZEVEDO, O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T Técnicas básicas em Biologia Molecular. Ed. Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2003, Cap.VI, p. 99-100.

SILVA, L.G. **Determinação da prevalência de infecção, por meio da identificação por microscopia óptica, das espécies do gênero *Plasmodium* em araras-canindé (*Ara ararauna*) mantidas em cativeiro no Estado do Rio de Janeiro e seus achados no hemograma e bioquímicas séricas**. Niterói: UFF, 2011. 110p. (Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária – Clínica e Reprodução Animal).

SINGH, B.; BOBOGARE, A.; COX-SINGH, J.; SNOUNOU, G.; ABDULLAH M.S.; RAHMAN, H.A. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 687–692, 1999.

SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. **Parrots**. Status survey and conservation action plan 2000–2004. The World Conservation Union (IUCN), Gland, Switzerland & Cambridge, Oxford, UK. 2000.

SOARES, C.O.; SOUZA, P.C.A.; MOTA, R.A.; FONSECA, A.H.; MASSARD, C.L. Parasitismo de leucocitos y trombocitos de *Gallus gallus* L. por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (APICOMPLEXA:PLASMODIIDAE). **Parasitología al día**, v.23, n.1-2, 1999.

THRALL, M.A. **Classificação e Diagnóstico de Anemia**. In: THRALL, M.A. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. ROCA, São Paulo, pp. 65-77, 2006.

VALERA, F.; CARRILLO, C.; BARBOSA, A.; MORENO, E. Low prevalence of haematozoa in Trumpeter finches *Bucanetes githagineus* from south-eastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. **Journal of Arid Environments**, v. 55, p. 209–213, 2003.

VALKIŪNAS, G. Bird Haemosporida. **Acta Zoologica Lituanica**, (In Russian). v. 3, p.1-607, 1997.

VALKIŪNAS, G.; SALAMAN, P.; IEZHOVA, T.A. Paucity of hematozoa in Colombian birds. **Journal of Wildlife Diseases**., v. 39, n. 2, p.445-448, 2003.

VALKIŪNAS, G. Avian Malaria Parasite and other Haemosporidia. CRC press, Boca, Raton, Florida, 2005.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; KRIZANAUSKIENE, 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**, v. 94, n. 6, p. 1395–1401, 2008.

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

YAMADA, K.A.; SHERMAN, I.W. *Plasmodium lophurae*: composition and properties of hemozoin, the malaria pigment. **Experimental Parasitology**, v. 48, p. 61–74, 1979.

YOHANNES, E.; KRIZANAUSKIENÉ, A.; VALCU, M.; BENSCH, S.; KEMPENAERS, B. Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebird species with different winter habitat distribution. **Journal of Ornithology**, v. 150, p. 287–291, 2009.

WAKENELL, P.S. Hematology of Chickens and Turkeys. In: Weiss, D.J.; WARDROP K.J.. Schalm's veterinary hematology. 6^a ed Blackwell Cap. 122. p. 958 – 967 (2010).

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S.; HASSELQUIST, D.; OTTOSSON, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. **Mol. Ecol.**, v. 11, p. 1545–1554, 2002.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D., ÖSTMAN, Ö. A new nested PCR method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 191–194, 2004.

WARNER, R.E.. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. **Condor**, v. 70, p. 101-120, 1968.

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**, v. 84, n. 4, p. 515-526, 1989.

CAPÍTULO II

Estudo da ocorrência de *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro e suas prováveis alterações laboratoriais

INTRODUÇÃO

Hemoparasitos são freqüentemente encontrados em esfregaços de sangue periférico de aves, inclusive nas araras (Campbell, 1995; Belo et al., 2009; Silva, 2011). Esses protozoários desempenham um papel decisivo na dinâmica e evolução da avifauna (Ricklefs 1992; Lively e Dybdahl, 2000), podendo influenciar na sobrevivência, no sucesso reprodutivo, na suscetibilidade dos indivíduos aos predadores, na habilidade de estabelecer territórios e até mesmo causar a extinção de populações (Anderson e May, 1979; Ricklefs, 1992). Por outro lado, na avicultura, os hematozoários também possuem importância econômica por ocasionarem taxas significativas de morbidade e mortalidade em aves domésticas (Soares et al., 1999).

Dentre esses parasitos está o gênero *Plasmodium* que é o mais estudado e conhecido em relação aos outros hemosporídeos, pois nele estão incluídos os agentes da malária humana (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), ficando assim conhecida como malária aviária (Valkiūnas, 2005). Os plasmódios já foram descritos em praticamente todos os continentes, exceto na

Antártida (Garnham, 1966) e o ciclo de vida desses protozoários é heteroxeno obrigatório, composto por um hospedeiro invertebrado (definitivo), que são as fêmeas de dípteros hematófagos e um hospedeiro vertebrado (intermediário) (Valkiūnas, 2005).

A detecção de *Plasmodium* em sangue de aves por meio de microscopia óptica é baseada na presença de gametócitos intraeritrocíticos, trofozoítos e esquizontes (Campbell, 1995). Os exames moleculares também podem auxiliar o diagnóstico de malária aviária (Bensch et al., 2009) e atualmente tem sido utilizados diferentes genes como alvos na reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação dos parasitos, tais como o ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) e o ácido desoxirribonucleico mitocondrial (citocromo b) do protozoário (Li et al., 1995; Bensch et al., 2004).

Apesar da existência de vários trabalhos relacionados com a infecção por *Plasmodium* em aves no Brasil (Woodworth-Lynas et al., 1989; Ribeiro et al., 2005; Fecchio, 2011; Sebaio et al., 2012), esses parasitos foram pouco estudados em psitacíformes (Belo et al., 2009; Silva, 2011). Considerando a importância epidemiológica das araras na participação no ciclo dos plasmódios por serem animais que transitam com frequência entre localidades (Belo et al., 2009) é importante o desenvolvimento de pesquisas a respeito da malária aviária para contribuir na elucidação dessa doença em araras.

Diante dessas informações, este estudo teve como objetivos utilizar a PCR e microscopia óptica para determinar a ocorrência da infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro, assim como confrontar os resultados desses meios de diagnóstico e comparar o perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados com aquele dos animais não infectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram obtidas amostras de sangue de 106 araras adultas, mantidas em cativeiro classificadas em três grupos conforme o criadouro de origem:

- Grupo 1 (G1): 41 amostras de araras das espécies *A. ararauna* (21 espécimes), *A. chloroptera* (13) e *Anodorhynchus hyacinthinus* (7) do Criadouro de

Aves Apoena localizado em Corumbá de Goiás/GO, a aproximadamente 100 Km de Brasília/DF (15°49'13,80"S e 48°28'25,56"O);

- Grupo 2 (G2): 42 amostras de araras das espécies *A. ararauna* (22 espécimes), *Ara chloroptera* (9), *A. hyacinthinus* (3), *A. rubrogenis* (2), *Ara glaucogularis* (1), *Ara macao* (5) do plantel da Fundação Jardim Zoológico de Brasília – Brasília/DF (15°50'23,50"S e 47°55'54,95"O);

- Grupo 3 (G3): 23 amostras de araras das espécies *A. ararauna* (10 espécimes), *A. chloroptera* (2), *A. macao* (4) e híbridas (7) do criadouro comercial Zoobotânica Abreu e Lima - Brasília/DF (15°49'20,62"S e 47°44'27,36"O).

A Figura 2 indica a localização dos criadouros amostrados neste trabalho.



Figura 2: Localização dos criadouros amostrados (Google Earth, 2012). A - Criadouro de Aves Apoena; B - Fundação Jardim Zoológico de Brasília; C - Zoobotânica Abreu e Lima.

As amostras foram colhidas independentemente de espécie, sexo, idade e condição clínica e os métodos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (UnBDOC nº 62.084/2010)

Colheita de sangue

Os procedimentos de colheita de sangue foram realizados nas instalações dos próprios criadouros. Os animais foram contidos manualmente e rapidamente seguiram para a contenção química com a utilização de anestesia inalatória (Figura 1). Esse tipo de contenção química foi escolhido por ser considerado um método seguro e de rápido retorno anestésico, reduzindo assim, o estresse dos animais. Para isso, foi aplicado o fármaco isoflurano¹ por meio de uma máscara e/ou sonda endotraqueal acopladas a um aparelho de anestesia inalatória² (Figura 3). Após a colheita de sangue, o peso de cada animal foi mensurado em balança digital³. Cabe ressaltar que as araras foram manipuladas quando não estavam em fase reprodutiva.

Foram colhidas amostras de sangue (aproximadamente 3 mL, que representa menos de 1% do peso corporal das araras) por venopunção das veias jugular (Figura 4A) ou braquial (Figura 4B) e acondicionadas em tubos com e sem anticoagulante (EDTA potássico), que foram mantidos em caixa térmica com gelo até o processamento que foi realizado em no máximo 2 horas após a obtenção das amostras. No momento da colheita foram confeccionados esfregaços sanguíneos para garantir uma melhor preservação da morfologia das células.



Figura 3: *Ara chloroptera* contida quimicamente por meio de anestesia inalatória (Arquivo pessoal).

¹ Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, SP.

² Conques Slim®, HB Hospitalar Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP.

³ Modelo EK 3550, DayHome Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

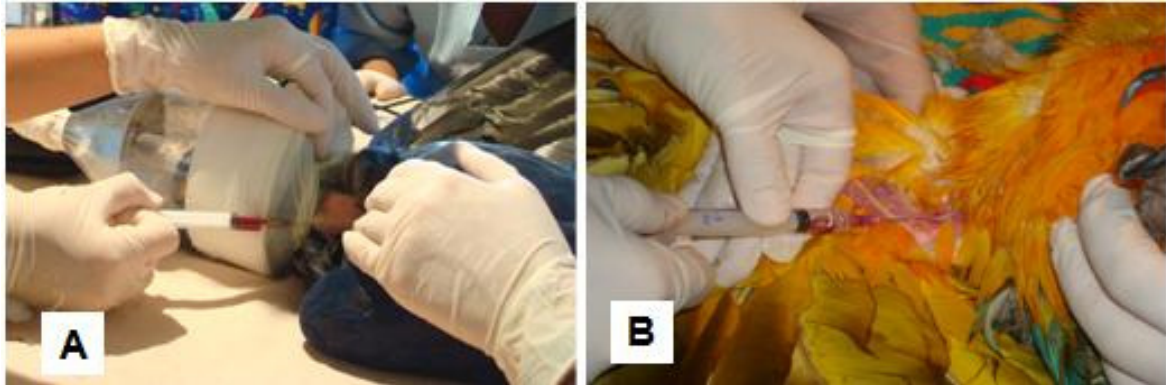


Figura 4: A – Punção de veia jugular em *Anodorhynchus hyacinthinus*; B - Punção de veia braquial em *Ara ararauna* (Arquivo pessoal).

Hemograma

Os hemogramas foram realizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal. As amostras de sangue foram diluídas com Natt & Herrick na proporção 1:200 e as células (hemácias, leucócitos e trombócitos) foram contadas em Câmara de Neubauer^{Improved®}. A hemoglobina foi mensurada pelo método cianometahemoglobina⁴ em aparelho analisador de bioquímicos semi-automático⁵. O volume globular (VG) foi determinado pela técnica do microhematócrito. O diferencial de leucócitos foi obtido por microscopia óptica a partir da contagem de 100 células em esfregaço sangüíneo corado com *May-Grunwald-Giemsa* e as proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro manual (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006). A pesquisa por *Plasmodium* spp. foi realizada durante 15 minutos por microscopia óptica em aumento de 1000X nos campos em que as células estavam uniformemente distribuídas (Krone et al, 2001) e a intensidade da infecção foi estimada em porcentagem por meio da contagem do número de parasitas em cada 10.000 eritrócitos examinados (Godfrey et al, 1987).

⁴ Kit comercial da LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil.

⁵ Bio-2000®, Bioplus – Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

Extração DNA

Após a realização do hemograma, o restante das amostras com EDTA foi mantido a -20 °C para posterior extração do DNA e realização da reação de polimerização em cadeia (PCR).

O DNA foi extraído a partir de 10 µL de sangue com o auxílio de kits comerciais⁶, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas acondicionadas a -20 °C até o momento da realização da PCR.

PCRs e oligonucleotídeos

Os exames moleculares foram realizados no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal.

Foram realizados três tipos de exames moleculares em cada amostra obtida. Após as extrações, todas as amostras foram submetidas a PCR para a determinação do sexo e detecção de hemoparasitos (uma para gênero – *Plasmodium* spp. / *Haemoproteus* spp. e outra somente para *Plasmodium* spp.), utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos (Tabela 6).

Em todas as reações utilizou-se o mesmo aparelho termociclador⁷ e os produtos gerados nas PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio e observado sob transiluminador de fluorescência ultravioleta. Um marcador molecular de 100pb (Invitrogen®) foi incluído em cada eletroforese para a determinação do tamanho dos produtos da PCR amplificados em cada reação. O surgimento de produtos na altura dos pares de bases esperados foi considerado o parâmetro para classificar as amostras como positivas.

⁶ Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit®, GE Healthcare do Brasil Ltda, São Paulo, SP.

⁷ MyCycler, Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc., Califórnia, EUA.

Tabela 6. Seqüências de oligonucleotídeos, gene amplificado, tamanho dos produtos da amplificação e fonte consultada nas reações de PCR utilizadas neste trabalho:

Reação	Oligonucleotídeos	Nome / Autores	Gene / Tamanho do produto
Sexagem	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	2550F (Fridolfsson e Ellegren, 1999)	<i>CHD1-W</i> / 450 bp
	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	2718R (Fridolfsson e Ellegren, 1999)	<i>CHD1-Z</i> / 650 bp
<i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. (1ª etapa)	CATATATTAAGAGAAITATGGAG	HaemNFI (Hellgren et al., 2004)	Citocromo b / 617 bp
	ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC	HaemNR3 (Hellgren et al., 2004)	
<i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. (2ª etapa)	ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG	HaemF (Bensch et al., 2000)	Citocromo b / 527 bp
	GCATTATCTGGATGTGATAATGG	HaemR2 (Bensch et al., 2000)	
<i>Plasmodium</i> spp. (1ª etapa)	TCA AAG ATTAAG CCA TGC AAG TGA	rPLU1 (Ribeiro et al., 2005)	18S SSU rRNA / 610 bp
	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC	rPLU5 (Ribeiro et al., 2005)	
<i>Plasmodium</i> spp. (2ª etapa)	TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT	rPLU3 (Ribeiro et al., 2005)	18S SSU rRNA / 240 bp
	TACCCG TCATAGCCATGTTAG GCCAATACC	rPLU4 (Ribeiro et al., 2005)	

PCR Sexagem

Considerando que as araras são animais monomórficos, foi necessária a realização de PCR das aves para determinação do sexo. Tal exame também foi útil para excluir a presença de possíveis inibidores da reação durante o processo de extração de DNA das amostras sanguíneas. Nessa PCR foram utilizados os oligonucleotídeos 2550F e 2718R (Tabela 6) para detecção dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z*. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes na mistura foram: 2,0µL de DNA, 1X tampão de PCR, 2 mM MgCl₂, 1,2 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25µL. Na amplificação da reação foram utilizadas as condições

do protocolo seguido por Quintana e colaboradores (2008) com adaptações. Na etapa inicial, as amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos para ocorrer a desnaturação. Em seguida, as amostras passaram por 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 54°C por 45 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão das fitas. Ao término, foi realizada a extensão final a 72°C por 5 minutos. Essa PCR pode gerar dois produtos finais com diferença de aproximadamente 200 pares de bases de diferença e, então quando os dois tamanhos de pares de base foram observados o animal foi considerado como fêmea (ZW) e quando somente houve a visualização de um produto a ave foi considerada como macho (ZZ) (Quintana et al, 2008).

PCR *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. (“Haem”)

Para a detecção de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. nas amostras de sangue das araras foi realizada *nested* PCR. Para a 1ª etapa desse ensaio foram utilizados os oligonucleotídeos HaemNFI e HaemNR3 (Tabela 6). A mistura de reagentes foi composta por: 5,0µL de DNA; 1X tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,6 mM de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25µL. A segunda etapa foi realizada com os oligonucleotídeos HaemF e HaemR2 (Tabela 6) com a seguinte mistura de reagentes: 2,0µL de produto da primeira reação, 1X de tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25µL. Para a amplificação da reação foram utilizadas as seguintes condições no termociclador modificadas de Hellgren e colaboradores (2004): na fase de desnaturação as amostras foram incubadas a 95°C por 3 minutos. Em seguida, as amostras passaram por 40 ciclos de: 95°C por 45 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 48°C por 45 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 45 segundos para a extensão das fitas. Ao término, foi realizada a extensão final a 72°C por 10 minutos. Na 1ª etapa foi obtido um produto de 617 bp e na 2ª um produto de 527 bp nas amostras positivas.

PCR *Plasmodium* spp. (“rPLU”)

Com o DNA das araras também foi realizada *nested* PCR para detectar infecção ocasionada somente por *Plasmodium* spp. Para isso foram utilizados na 1ª etapa os oligonucleotídeos rPLU1 e rPLU5 (Tabela 6) e a seguinte mistura de reagentes: 2,0µL de DNA, 1X de tampão, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo; 1U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25µL. A segunda etapa foi realizada com os oligonucleotídeos rPLU3 e rPLU4 (Tabela 6) adicionados a mistura de 2,0µL de produto da primeira reação; 1X de tampão, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo; 1 U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25µL. Para a amplificação na primeira etapa a mistura foi submetida às seguintes condições (Ribeiro et al., 2005): uma fase de desnaturação a 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 53°C por 1 minuto para a hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas, finalizando com extensão a 72°C por 4 minutos. As condições da 2ª etapa foram as mesmas, exceto a temperatura de hibridização que foi ajustada para 62°C. Nas amostras positivas foram obtidos produtos de 610bp (1ª etapa) e 240bp (2ª etapa).

Em todas as PCRs foram utilizados como controle negativo água miliQ (estéril e desprovida de DNA) e como controle positivo amostra de sangue de galinha (*Gallus gallus domesticus*) infectada por *Plasmodium* spp. cedida gentilmente por Laís Grego Silva da Universidade Federal de Niterói (UFF).

Bioquímica sérica

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos para a obtenção do soro e realização de ensaios bioquímicos (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina, globulinas, ácido úrico, creatinina, creatinofosfoquinase (CK) e cálcio). Os testes bioquímicos foram mensurados nas amostras por aparelho analisador de bioquímicos semi-automático⁸ utilizando kits comerciais⁹, seguindo as recomendações do fabricante.

⁸ Bio-2000®, Bioplus – Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁹ Kit comercial da LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil

Análise estatística

Na análise estatística, foram excluídas duas *Ara rubrogenis*, uma *Ara glaucogularis* e sete araras híbridas, totalizando 10 indivíduos com a finalidade de evitar que o número escasso de amostras e as particularidades das espécies desses animais interferissem nos resultados. Por isso, 96 espécimes foram estatisticamente avaliados. Inicialmente foi realizada a verificação da normalidade das amostras e como o conjunto de dados era composto por aproximadamente 100 indivíduos a análise teve como base o teorema do limite central. Com o auxílio do software R[®] foram utilizadas análises de variância multifatorial para testar a influência dos seguintes fatores: (a) infecção, (b) local e (c) espécie. O intervalo de confiança considerado foi de 95%.

RESULTADOS

As quantidades de indivíduos, que foram incluídos e excluídos da análise estatística, bem como a sua origem, estão relacionadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente. Cabe salientar que as araras excluídas não apresentaram infecção.

Tabela 7. Distribuição por grupos das araras incluídas na estatística conforme a espécie:

Espécie	G1 (número de indivíduos)	G2 (número de indivíduos)	G3 (número de indivíduos)
<i>A. ararauna</i>	21	22	10
<i>A. chloroptera</i>	13	9	2
<i>A. hyacintinus</i>	7	3	0
<i>A. macao</i>	0	5	4
Total	41	39	16

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoena; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

Tabela 8. Distribuição por grupos das araras excluídas da estatística conforme a espécie:

Espécie	G2 (número de indivíduos)	G3 (número de indivíduos)
<i>Ara rubrogenis</i>	2	NA
<i>Ara glaucogularis</i>	1	NA
Híbridas	NA	7

Onde (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima; NA: Não se aplica, pois o criadouro não possuía a espécie.

Na PCR para sexagem das amostras de 96 araras em que foram utilizados os oligonucleotídeos 2550F e 2718R houve amplificação dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* que resultaram em produtos com tamanho de aproximadamente 350pb e 550 pb, respectivamente. Contudo os produtos de sexagem da amostra proveniente de uma galinha que foi utilizada como controle positivo para *Plasmodium* spp. foram um pouco menores dos produtos das araras (Figura 5). As fêmeas apresentaram dois produtos de ambos os tamanhos (ZW) e os machos apenas o produto de 550 pb (ZZ). No exame foram identificadas 40,6% (39/96) de araras fêmeas e 59,4% (57/96) de araras machos. A distribuição dos animais por sexo em cada grupo está demonstrada na Tabela 9. Esse exame também serviu para excluir a presença de possíveis inibidores da PCR durante o processo de extração de DNA das amostras sanguíneas.

Nos exames moleculares, 16,66% das amostras (16/96) foram positivas para hemoparasitos em alguma das reações realizadas. Sendo que na reação que utilizou os oligonucleotídeos “Haem” para detectar juntamente *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. foram observadas 13,54% (13/96) amostras positivas e na PCR que utilizou os oligonucleotídeos “rPLU” para identificar somente *Plasmodium* spp. foram encontradas 7,29% (7/96) araras positivas. Cabe salientar que três animais foram positivos somente na PCR para *Plasmodium* spp. ou seja, não amplificaram na PCR para *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e quatro amostras foram positivas nas duas reações utilizadas. Nas amostras positivas obtidas por meio da *nested* PCR “Haem” foi observado um produto de 617pb na 1ª etapa e na 2ª etapa um produto de 527pb. Na *nested* PCR específica para *Plasmodium* spp. as amostras positivas geraram produtos de 610pb e 240pb nas 1ª e 2ª etapas, respectivamente (Figura 6). É importante notar que todas as araras que apresentaram hemoparasitos no esfregaço sanguíneo foram positivas em algum ou nos dois testes moleculares.

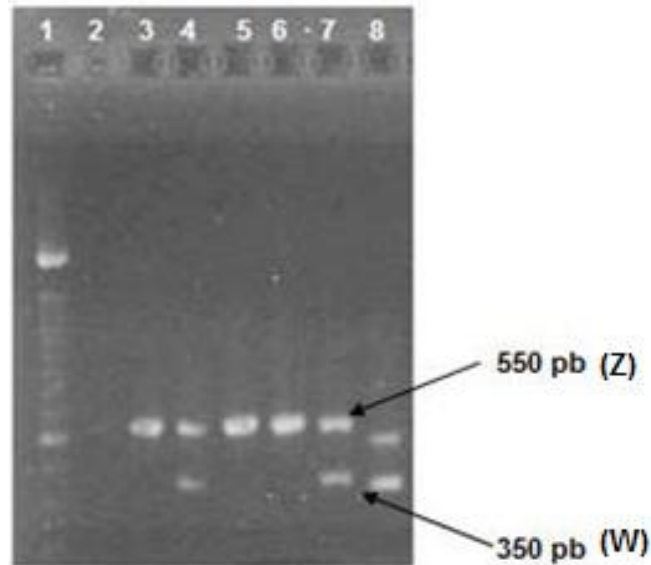


Figura 5: Resultado de PCR para sexagem de aves. 1 – Marcador de peso molecular¹⁰ (100pb); 2, 3, 5 e 6 – araras machos (ZZ); 4 e 7 – araras fêmeas (ZW); 8 – galinha (ZW) (amostra infectada por *Plasmodium* que foi utilizada como controle positivo nas reações de PCR). Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Tabela 9. Distribuição de araras conforme o sexo nos grupos:

Grupo	Fêmeas	Machos
G1 (41/96)	15	26
G2 (39/96)	14	25
G3 (16/96)	10	6
Total	39	57

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

Com o auxílio da microscopia óptica foram analisados esfregaços sanguíneos de 96 araras para a presença de hematozoários. Foram encontradas hemácias parasitadas em 4,16% (4/96) dos animais (Tabela 10), mas não foi possível identificar o gênero e a espécie dos protozoários considerando a morfologia. A intensidade de infecção de eritrócitos detectada variou entre 0,01 e 0,09% (média 0,04%), a maioria dos estágios observados foram gametócitos (Figura 7) e não foi possível distinguir algumas formas.

A tabela 10 mostra o número de araras infectadas por hematozoários detectados por cada método de diagnóstico (microscopia óptica e PCR).

¹⁰ 100 bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-LineSM, E.U.A.

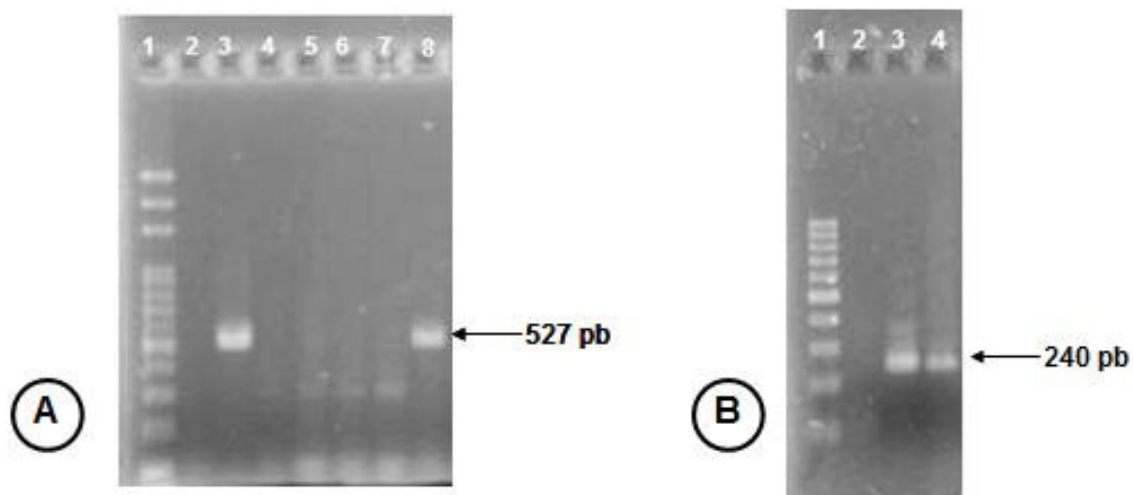


Figura 6: Resultado de PCR para detecção de hemoparasitos. A: 2ª etapa da PCR “Haem”, 1 – Marcador de peso molecular (100pb); 2 – controle negativo (água); 3 – controle positivo; 4, 5, 6 e 7 – araras negativas ; 8 – arara positiva para *Plasmodium/Haemoproteus*. B: 2ª etapa da PCR “rPLU”, 1 – Marcador de peso molecular¹¹ (100pb); 2 – controle negativo (água); 3 – controle positivo; 4 - animal positivo para *Plasmodium*. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Tabela 10: Número de araras positivas para hemoparasitos por método de diagnóstico (microscopia óptica (M.O.) e PCR:

Método	Positivas
M.O.	4,16% (4/96)
PCR “Haem”	13,54% (13/96)
PCR “rPLU”	7,29% (7/96)

Onde: “Haem”: PCR para *Plasmodium* spp/*Haemoproteus* spp.; “rPLU”: PCR para *Plasmodium* spp.

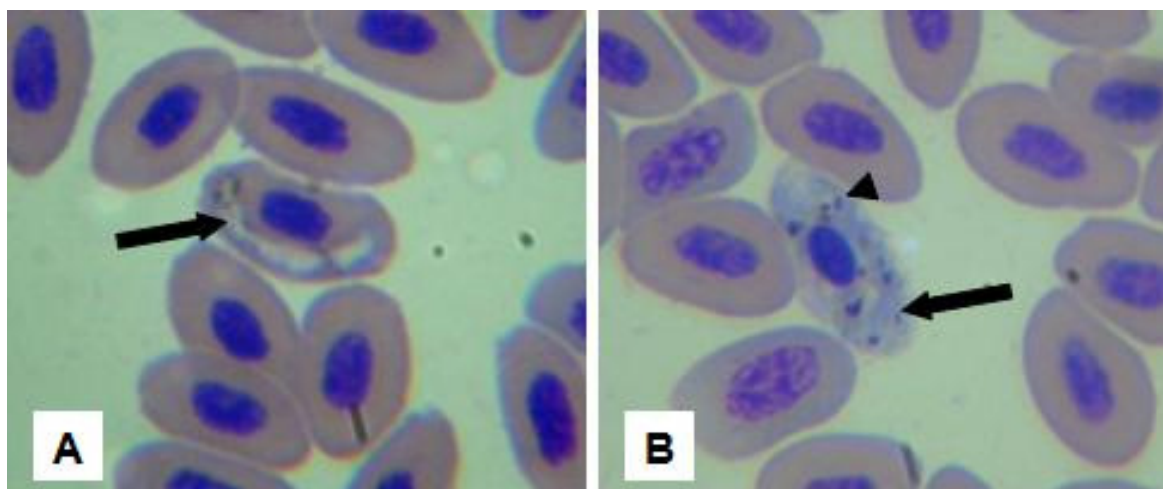


Figura 7: A e B – Gametócitos de hemsporídeo em eritrócitos de arara (seta); B - Grânulos de hemozoína (cabeça de seta). 1000x May-Grunwald-Giemsa (arquivo pessoal).

¹¹ 100 bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-LineSM, E.U.A.

A distribuição de animais infectados por hemoparasitos em cada método de diagnóstico utilizado de acordo com a espécie em cada grupo está relacionada na tabela 11.

Na análise estatística realizada entre os hemogramas e bioquímicos de animais positivos e negativos para hemoparasitos a maioria dos parâmetros não mostrou distribuição normal, entretanto nos resultados foi observada normalidade nos valores de concentração de hemoglobina, eosinófilos, proteína total sérica, globulinas, AST e cálcio. Na avaliação dos fatores “local” e “espécie” foi observado que são variáveis de efeito e influenciaram a maioria dos resultados considerados, mas o fator “infecção”, com exceção da albumina, praticamente não se comportou da mesma forma (Tabelas 12 e 13). Quanto ao sexo das aves, o fator gênero não se mostrou estatisticamente significativo relacionado à chance de o animal estar infectado (Tabela 14).

Tabela 11: Número de araras positivas para hemoparasitos detectados em cada método de diagnóstico utilizado (microscopia óptica - M.O. e PCR) distribuídas por espécie em cada grupo:

	M.O.	PCR "Haem"	PCR "rPLU"
G1 (n=41)			
<i>A. ararauna</i> (21/41)	0	2,4% (1/41)	2,43% (1/41)
<i>A. chloroptera</i> (13/41)	0	4,87% (2/41)	4,87% (2/41)
<i>A. hyacintinus</i> (7/41)	2,43% (1/41)	4,87% (2/41)	0
Total	2,43% (1/41)	12,19% (5/41)	7,31% (3/41)
G2 (n=39)			
<i>A. ararauna</i> (22/39)	0	7,69% (3/39)	0
<i>A. chloroptera</i> (9/39)	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)
<i>A. hyacintinus</i> (3/39)	0	0	0
<i>A. macao</i> (5/39)	5,12% (2/39)	5,12% (2/39)	7,69% (3/39)
Total	7,69% (3/39)	15,38 (6/39)	10,25% (4/39)
G3 (n=16)			
<i>A. ararauna</i> (10/16)	0	6,25% (1/16)	0
<i>A. chloroptera</i> (2/16)	0	0	0
<i>A. macao</i> (4/16)	0	6,25% (1/16)	0
Total	0	12,50% (2/16)	0
Total (n=96)	4,16% (4/96)	13,54% (13/96)	7,29% (7/96)

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

Tabela 12. Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais positivos e negativos na PCR “Haem” (*Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.) dos grupos G1, G2 e G3 (n=96 araras).

	Parâmetros	Média	Desvio padrão	Infecção (Haem)	Local	Espécie
Hemograma	VG (%)	40,97	3,66	NS	NS	**
	Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,64	0,54	NS	*	NS
	Hemoglobina (g/dL)	14,01	1,52	NS	***	NS
	Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	36,07	14,40	NS	***	**
	PPT (g/dL)	4,30	0,63	NS	NS	***
	Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	13,57	6,94	NS	NS	***
	Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	8,15	4,7	NS	***	***
	Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	4,84	3,87	NS	NS	**
	Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,091	0,23	NS	NS	*
	Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,32	0,51	NS	**	***
	Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,17	0,21	NS	*	NS
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,21	0,59	NS	NS	**
	Albumina (g/dL)	0,98	0,24	NS	***	NS
	Globulina (g/dL)	2,22	0,51	NS	NS	***
	Razão A/G	0,47	0,17	NS	**	**
	Creatinina (mg/dL)	0,26	0,09	NS	*	***
	ALT (UI/L)	56,75	46,21	NS	***	***
	AST (UI/L)	176,03	106,64	NS	***	NS
	FA (UI/L)	130,11	81,69	NS	***	***
	Ácido úrico (mg/dL)	4,08	2,56	NS	*	*
	CK (UI/L)	361,51	416,59	NS	NS	NS
	Cálcio (mEq/L)	8,73	1,45	NS	NS	NS

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Não Significativos (NS); Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK).

Tabela 13. Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais positivos e negativos na PCR “rPLU” (*Plasmodium* spp.) dos grupos G1, G2 e G3 (n=96 araras).

	Parâmetros	Média	Desvio padrão	Infecção (rPLU)	Local	Espécie
Hemograma	VG (%)	40,97	3,66	NS	NS	**
	Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,64	0,54	NS	*	NS
	Hemoglobina (g/dL)	14,01	1,52	NS	***	NS
	Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	36,07	14,40	NS	***	**
	PPT (g/dL)	4,30	0,63	NS	NS	***
	Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	13,57	6,94	NS	NS	***
	Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	8,15	4,7	NS	***	***
	Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	4,84	3,87	NS	NS	**
	Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,091	0,23	NS	NS	*
	Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,32	0,51	NS	**	***
	Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,17	0,21	NS	*	NS
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,21	0,59	NS	NS	**
	Albumina (g/dL)	0,98	0,24	*	***	NS
	Globulina (g/dL)	2,22	0,51	NS	NS	***
	Razão A/G	0,47	0,17	NS	**	**
	Creatinina (mg/dL)	0,26	0,09	NS	*	***
	ALT (UI/L)	56,75	46,21	NS	***	***
	AST (UI/L)	176,03	106,64	NS	***	NS
	FA (UI/L)	130,11	81,69	NS	***	***
	Ácido úrico (mg/dL)	4,08	2,56	NS	NS	*
	CK (UI/L)	361,51	416,59	NS	NS	NS
	Cálcio (mEq/L)	8,73	1,45	NS	NS	NS

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Não Significativos (NS); Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK).

Tabela 14. Número de araras positivas para hemoparasitos na microscopia óptica (M.O.) e PCR por sexo:

Sexo	Positivas (M.O.)	PCR <i>Haemoproteus</i> spp./	PCR <i>Plasmodium</i>
		<i>Plasmodium</i> spp.	spp.
Fêmeas (36/96)	0	4,16% (4/96)	1,04% (1/96)
Machos (57/96)	4,16% (4/96)	9,37% (9/96)	6,25% (6/96)

Os resultados dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais positivos e negativos, das espécies e dos grupos estão apresentados nas tabelas 15,16 e 17, respectivamente.

Tabela 15. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nas araras positivas e negativas para a infecção por hemoparasitos de todos os criadouros amostrados.

	Parâmetro	Positivos (16/96)	Negativos (80/16)	VR
Hemograma	VG (%)	40,75±3,38	41,19 ±4,14	40 ±7,7
	Hemácias (x10 ⁶ x µL ⁻¹)	2,66 ±0,47	2,64 ±0,53	2,7 ±0,7
	Hemoglobina (g/dL)	13,58±1,57	14,19 ±1,69	11,00±2,9
	Trombócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	38,18±9,45	37,17±15,9	NI
	PPT (g/dL)	4,23±0,60	4,32 ±0,62	2,86±0,8
	Leucócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	11,55±5,72	13,17± 6,81	18,92±5,56
	Heterófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	10,18±4,06	7,72±4,45	10,00±3,80
	Linfócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	4,25 ±4,76	4,98±3,87	8,00±3,10
	Eosinófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,11±0,30	0,092±0,23	0
	Monócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,49±0,66	0,29± 0,45	0,756±0,44
	Basófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,10 ±0,13	0,17 ±0,22	0,15±0,22
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,15±0,61	3,23±0,58	2,5±0,7
	Albumina (g/dL)	0,92±0,21*	0,99±0,24*	1,2±0,3
	Globulina (g/dL)	2,23 ±0,54	2,24±0,50	1,3 ±0,6
	Razão A/G	0,43 ±0,14	0,46±0,17	0,8±0,2
	Creatinina (mg/dL)	0,25±0,08	0,27±0,10	0,4±0,07
	ALT (UI/L)	50,3±42,10	56,49±45,09	4±3
	AST (UI/L)	173,06±111,99	171,84±102,24	101±24
	FA (UI/L)	128,94±91,45	123,28±78,54	1200±390
	Ácido úrico (mg/dL)	4,70 ±3,14	3,97 ±2,38	1,9±2,5
	CK (UI/L)	338,19±156,97	351,77±432,06	540 267
Cálcio (mg/dL)	9,16±1,87	8,60 ±1,47	10±0,47	

Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK); NI: Não informado; VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994). *Diferiram (p<0,05) na análise estatística.

Tabela 16. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos das quatro principais espécies de araras amostradas.

Parâmetro	<i>Ara ararauna</i> (53/96)	<i>Ara chloroptera</i> (24/96)	<i>Ara hyacinthinus</i> (10/96)	<i>Ara macao</i> (9/96)	VR
Hemograma					
VG (%)	40,10±3,84	40,50±3,08	43,90±2,33	43,89±2,42	40 ±7,7
Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,71±0,56	2,52±0,53	2,82±0,50	2,42±0,42	2,7 ±0,7
Hemoglobina (g/dL)	13,84±1,51	13,81±1,61	14,52±0,92	14,89±1,68	11,00±2,9
Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	40,58±11,98	33,25±18,39	21,85±3,23	33,83±12,05	NI
PPT (g/dL)	4,23±0,60	4,70±0,55	3,60±0,46	4,36±0,30	2,86±0,8
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	11,55±5,72	10,55±2,91	10,55±2,91	17,77±9,35	18,92±5,56
Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	6,69±4,02	10,15±4,40	8,23±3,03	11,69±7,05	10,00±3,80
Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	4,42±3,20	7,01±5,18	1,91±1,93	4,69±2,21	8,00±3,10
Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,032±0,11	0,19±0,39	0,10±0,10	0,14±0,15	0
Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,21±0,21	0,24±0,35	0,23±0,14	1,19±1,18	0,756±0,44
Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,19±0,22	0,21±0,26	0,056±0,086	0,041±0,087	0,15±0,22
Bioquímicos					
PT (g/dL)	3,25±0,64	3,35±0,42	2,57±0,54	3,30±0,33	2,5±0,7
Albumina (g/dL)	1,01±0,26	0,94±0,19	0,96±0,25	0,94±0,27	1,2±0,3
Globulina (g/dL)	2,24±0,49	2,40±0,46	1,61±0,40	2,36±0,41	1,3 ±0,6
Razão A/G	0,47±0,14	0,42±0,15	0,63±0,24	0,43±0,22	0,8±0,2
Creatinina (mg/dL)	0,25±0,09	0,30±0,08	0,16±0,08	0,29±0,03	0,4±0,07
ALT (UI/L)	58,96±46,68	69,92±53,93	40,60±25,98	26,22±20,28	4±3
AST (UI/L)	178,81±78,53	190,88±155,44	206,50±98,54	91,56±72,02	101±24
FA (UI/L)	157,41±76,10	151,50±9,43	35,70±15,76	36,67±19,94	1200±390
Ácido úrico (mg/dL)	4,69±2,86	2,90±1,77	4,49±2,28	3,22±1,76	1,9±2,5
CK (UI/L)	437,61±540,52	253,45±175,14	351,92±129,82	253,22±122,15	540 267
Cálcio (mg/dL)	8,69±1,14	9,02±1,66	8,25±1,44	9,03±2,19	10±0,47

Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT), Albumina/Globulina (A/G), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Creatinina-quinase (CK), NI: Não informado, VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994).

Tabela 17. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de araras amostradas nos diferentes criadouros.

Parâmetro	G1 (41/96)	G2 (39/96)	G3 (16/96)	VR
Hemograma				
VG (%)	40,56 ±3,28	41,00±4,27	41,94±2,93	40 ±7,7
Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,68±0,56	2,74±0,51	2,31±0,42	2,7 ±0,7
Hemoglobina (g/dL)	13,96±1,55	13,45±1,23	15,49±1,07	11,00±2,9
Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	30,54±10,54	41,19±16,61	37,71±12,76	NI
PPT (g/dL)	4,38±0,75	4,22±0,50	4,28±0,55	2,86±0,8
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	15,02±7,22	11,93±5,87	13,87±8,11	18,92±5,56
Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	10,18±4,06	6,35±4,37	7,31±5,18	10,00±3,80
Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	4,25±4,76	5,12±2,85	5,68±3,39	8,00±3,10
Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,11±0,30	0,072±,51	0,087±0,19	0 (0)
Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,23±0,19	0,26±0,47	0,66±0,91	0,756±0,44
Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,23±0,25	0,11±0,18	0,12±0,15	0,15±0,22
Bioquímicos				
PT (g/dL)	3,11±0,56	3,34±0,65	3,13±0,44	2,5±0,7
Albumina (g/dL)	0,91±0,18	1,11±0,26	0,87±0,21	1,2±0,3
Globulina (g/dL)	2,20±0,47	2,24±0,56	2,26±0,51	1,3 ±0,6
Razão A/G	0,43±0,09	0,27±0,09	0,42±0,19	0,8±0,2
Creatinina (mg/dL)	0,24±0,09	0,27±0,09	0,29±0,07	0,4±0,07
ALT (UI/L)	103,10±29,11	13,18±8,72	44,19±9,76	4±3
AST (UI/L)	263,05±60,41	86,44±78,17	171,44±72,26	101±24
FA (UI/L)	162,11±81,98	111,51±81,35	99,44±5,52	1200±390
Ácido úrico (mg/dL)	3,58±1,71	4,81±3,35	3,54±1,61	1,9±2,5
CK (UI/L)	361,22±342,36	310,92±282,76	485,56±746,47	540± 267
Cálcio (mg/dL)	8,46±1,43	9,13±1,28	8,46±1,72	10±0,47

Onde (G1): Criadouro de Aves Apoena; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima; Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK); NI: Não informado; VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994).

Uma arara da espécie *Ara macao* pertencente à Fundação Jardim Zoológico de Brasília que apresentou infecção por hemoparasitos foi amostrada em dois momentos diferentes com intervalo de aproximadamente quatro meses. As informações a respeito desse indivíduo estão relacionadas na tabela 18. Em ambos os momentos esse animal foi positivo para a infecção na microscopia óptica e nos exames moleculares, entretanto a parasitemia detectada na primeira amostragem foi maior em relação à segunda.

Tabela 18: Resultados obtidos em exames de amostras colhidas em momentos diferentes de um mesmo espécime infectado por hemoparasitos:

Parâmetro	24/03/2011	02/08/2011
Peso do animal (g)	902	1.040
PCR <i>Haemoproteus/Plasmodium</i>	Positivo	Positivo
PCR <i>Plasmodium</i>	Positivo	Positivo
Parasito na microscopia óptica	Presente	Presente
Parasitemia	0,09%	0,01%
VG (%)	44	40
Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,5	2,46
Hemoglobina (g/dL)	14,9	13,5
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	17,0	16,0
Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	1,7	0
Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	5,10	6,56
Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	0
Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	0
Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	10,2	9,44
Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	38,5	40,0
Proteínas Plasmáticas Totais (g/dL)	4,4	3,8
Proteína total sérica (g/dL)	2,7	2,8
Albumina (g/dL)	0,6	0,7
Globulina (g/dL)	2,1	2,1
Albumina/Globulina	0,29	0,33
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,2
ALT (UI/L)	10	41
AST (UI/L)	10	99
FA (UI/L)	74	13
Ácido úrico (mg/dL)	5,0	2,1
CK (UI/L)	437	145
Cálcio (mEq/L)	7,6	6,5

Onde: Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK).

Os valores obtidos nos hemogramas e bioquímica sérica das araras das espécies *Ara rubrogenis*, *Ara glaucogularis* e as médias das araras híbridas, que foram excluídas das análises estatísticas estão dispostos nas Tabelas 19, 20 e 21, respectivamente.

Tabela 19. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos das araras da espécie *Ara rubrogenis* amostradas:

	Parâmetro	<i>A. rubrogenis</i>	<i>A. rubrogenis</i>	VR
		1	2	
Hemograma	VG (%)	33	33	40 ± 7,7
	Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,09	2,52	2,7 ± 0,7
	Hemoglobina (g/dL)	11,2	10,6	11,00 ± 2,9
	Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	50,00	25,50	NI
	PPT (g/dL)	4,0	3,2	2,86 ± 0,8
	Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	5,50	10,50	18,92 ± 5,56
	Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	6,19	NP	10,00 ± 3,80
	Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	4,09	NP	8,00 ± 3,10
	Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,21	NP	0
	Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	NP	0,75 ± 0,44
	Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	NP	0,15 ± 0,22
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,3	2,3	2,5 ± 0,7
	Albumina (g/dL)	1	0,7	1,2 ± 0,3
	Globulina (g/dL)	2,3	1,6	1,3 ± 0,6
	Razão A/G	0,43	0,44	0,8 ± 0,2
	Creatinina (mg/dL)	0,4	0,6	0,4 ± 0,07
	ALT (UI/L)	20	31	4 ± 3
	AST (UI/L)	125	94	101 ± 24
	FA (UI/L)	103	28	1200 ± 390
	Ácido úrico (mg/dL)	8,9	3,8	1,9 ± 2,5
	CK (UI/L)	24	48	540 ± 267
Cálcio (mg/dL)	8,1	8,1	10 ± 0,47	

Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT), Albumina/Globulina (A/G), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Creatinina-quinase (CK), NI: Não informado, NP: Não foi possível, VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994).

Tabela 20. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos da arara da espécie *Ara glaucogularis* amostrada:

	Parâmetro	<i>Ara glaucogularis</i>	VR
Hemograma	VG (%)	37	40 ± 7,7
	Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,57	2,7 ± 0,7
	Hemoglobina (g/dL)	12,3	11,00 ± 2,9
	Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	43,50	NI
	PPT (g/dL)	4,4	2,86 ± 0,8
	Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	10,50	18,92 ± 5,56
	Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	3,67	10,00 ± 3,80
	Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	6,72	8,00 ± 3,10
	Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,11	0
	Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	0,75 ± 0,44
Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0	0,15 ± 0,22	
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,7	2,5 ± 0,7
	Albumina (g/dL)	0,9	1,2 ± 0,3
	Globulina (g/dL)	2,8	1,3 ± 0,6
	Razão A/G	0,32	0,8 ± 0,2
	Creatinina (mg/dL)	0,3	0,4 ± 0,07
	ALT (UI/L)	5	4 ± 3
	AST (UI/L)	31	101 ± 24
	FA (UI/L)	83	1200 ± 390
	Ácido úrico (mg/dL)	1,6	1,9 ± 2,5
	CK (UI/L)	121	540 ± 267
Cálcio (mg/dL)	6,9	10 ± 0,47	

Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT), Albumina/Globulina (A/G), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Creatinina-quinase (CK), NI: Não informado, VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994).

Tabela 21. Valores obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos da araras híbridas amostradas.

	Parâmetro	Araras híbridas (n=7)	VR
Hemograma	VG (%)	46,14 ± 4,06	40 ± 7,7
	Hemácias ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)	2,74 ± 0,38	2,7 ± 0,7
	Hemoglobina (g/dL)	16,56 ± 1,34	11,00 ± 2,9
	Trombócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	53,64 ± 7,97	NI
	PPT (g/dL)	4,66 ± 0,30	2,86 ± 0,8
	Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	11,64 ± 2,79	18,92 ± 5,56
	Heterófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	5,98 ± 1,85	10,00 ± 3,80
	Linfócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	5,12 ± 1,78	8,00 ± 3,10
	Eosinófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,056 ± 0,10	0
	Monócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,41 ± 0,26	0,75 ± 0,44
Basófilos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	0,068 ± 0,18	0,15 ± 0,22	
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,43 ± 0,38	2,5 ± 0,7
	Albumina (g/dL)	0,93 ± 0,10	1,2 ± 0,3
	Globulina (g/dL)	2,50 ± 0,35	1,3 ± 0,6
	Razão A/G	0,38 ± 0,05	0,8 ± 0,2
	Creatinina (mg/dL)	0,30 ± 0,08	0,4 ± 0,07
	ALT (U/L)	55,00 ± 10,17	4 ± 3
	AST (U/L)	155,14 ± 32,55	101 ± 24
	FA (U/L)	67,71 ± 30,33	1200 ± 390
	Ácido úrico (mg/dL)	3,91 ± 1,17	1,9 ± 2,5
	CK (U/L)	311,71 ± 188,30	540 ± 267
Cálcio (mg/dL)	8,47 ± 2,75	10 ± 0,47	

Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT), Albumina/Globulina (A/G), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Creatinina-quinase (CK), NI: Não informado, VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (Ritchie et al, 1994).

DISCUSSÃO

Na PCR para sexagem das araras a amplificação dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* resultou em produtos de aproximadamente 350pb e 550 pb, respectivamente (figura 5). A diferença entre os tamanhos desses produtos foi de 200pb, o que era esperado conforme Quintana e colaboradores (2008). Entretanto, esses valores não corresponderam com os produtos de sexagem da amostra de galinha (*Gallus gallus domesticus*) utilizada neste estudo como controle positivo nas reações para pesquisa de hemoparasitos, bem como com os resultados obtidos por outros pesquisadores (Dawson et al., 2001; Quintana et al., 2008). Dawson e colaboradores (2001) realizaram a sexagem de DNA de aves do gênero *Aethia* com os mesmos oligonucleotídeos e obtiveram bandas de 430 pb e 600 pb para os cromossomo W e Z, respectivamente. Em contrapartida, Quintana e colaboradores (2008) observaram produtos de tamanhos 450 pb e 650pb quando amplificaram os

genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* de amostras sanguíneas de diferentes espécies de aves aquáticas. Com base nessas observações pode-se sugerir que o tipo de espécie da ave amostrada possa influenciar no tamanho dos produtos dos genes sexuais obtidos, permanecendo como regra somente a diferença de aproximadamente 200 pb entre W e Z.

O presente estudo mostrou que existe a presença de infecção por hemoparasitos em araras mantidas em cativeiro no Distrito Federal e Goiás, pois foram encontradas amostras positivas provenientes dos três criadouros na PCR “Haem” que é capaz de detectar *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. conjuntamente. No total, a ocorrência determinada nesses locais foi de 13,54% (13/96) (Tabela 10). Ao estudar a infecção por esses protozoários em espécies variadas de passeriformes de vida livre no Distrito Federal, Fecchio (2011) obteve por meio de técnicas moleculares prevalência de 21% (166/790), ou seja, maior do que a observada neste estudo. Essa divergência de valores pode ter ocorrido devido a possibilidade da reação molecular aplicada por Fecchio (2011) ter sido mais sensível que a PCR “Haem”, pois oligonucleotídeos diferentes foram utilizados em cada uma dessas reações. Contudo, deve-se considerar que foram analisadas espécies diferentes de aves nos dois trabalhos e que nessa região podem existir espécies de parasitos melhor adaptados aos passeriformes do que psitacíformes, pois segundo Garnham (1966) e Valkiūnas (2005) alguns hemosporídeos podem apresentar alta especificidade por seus hospedeiros aviários. Dentre os criadouros as ocorrências de *Haemoproteus/Plasmodium* encontradas foram: 12,19% (5/41) no Criadouro de Aves Apoena – GO, 15,38% (6/39) na Fundação Jardim Zoológico de Brasília-DF e 12,50% (2/16) no Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima-DF (Tabela 11) e, a diferença de ocorrência nesses locais pode ser relacionada à disponibilidade de vetores dípteros em cada local, pois a presença no ambiente desses insetos influencia a transmissão de hemosporidioses (Esparza et al., 2004). Vale notar que é provável que alguns espécimes não tenham nascido nesses criadouros sendo provenientes de outros locais ou por apreensão ou por permuta entre instituições. Logo existe a possibilidade de tais animais já estarem infectados por hemoparasitos ao serem introduzidos nos atuais plantéis atuando como fonte de infecção para transmissão da doença as outras araras se houver a presença dos vetores.

A PCR “rPLU” foi utilizada neste trabalho com a finalidade de identificar animais infectados somente por *Plasmodium*, visto que os oligonucleotídeos (Tabela

6) dessa reação são específicos para *Plasmodium* spp. Com esse exame a infecção foi detectada em 7,29% (7/96) das aves (Tabela 10). Esse valor foi abaixo do obtido por Belo e colaboradores (2009) em psitacídeos nos estados de Belo Horizonte-MG e Fortaleza-CE que também por meio da PCR “rPLU” observaram a ocorrência de *Plasmodium* em 34,6% (44/127) das aves analisadas. O clima dessas localidades e do Distrito Federal é classificado como tropical, embora existam períodos seco e chuvoso bem definidos (Repelli et al., 1997; Meyer et al., 2004; Oliveira, 2008), com isso, essa discordância de resultados pode ter ocorrido devido à diferença de altitude entre as regiões estudadas. Os criadouros amostrados neste estudo se localizam em média a 1.000 metros de altura em relação ao nível do mar, enquanto Belo Horizonte está a 840 metros e Fortaleza a 3 metros (Google Earth, 2012). Isso poderia justificar a baixa prevalência de infecção detectada, considerando que a densidade populacional de vetores é menor em altitudes elevadas (Van Riper III et al., 1986).

A ocorrência de *Plasmodium* spp. obtida em cada criadouro foram divergentes, pois 7,31% (3/41) das amostras procedentes do Criadouro de Aves Apoená – GO e 10,25% (4/39) das aves amostradas na Fundação Jardim Zoológico de Brasília-DF foram positivas e esse hematozoário não foi encontrado nas amostras de araras provenientes do Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima-DF (Tabela 11). Conforme Bennett et al. (1992) e Valera et al. (2003) a necessidade de que parte do ciclo dos hemosporídeos ocorra em dípteros hematófagos influencia na prevalência de parasitos no ambiente, com isso onde existe pouco ou nenhum mosquito transmissor a chance de encontrar infecção nas aves é pequena ou nula. Logo, os valores discrepantes encontrados nos três criadouros podem ter ocorrido devido a uma provável diferença de distribuição de mosquitos da família Culicidae, que são os transmissores da malária aviária, nesses locais uma vez que os criadouros são afastados um dos outros. Reiterando o que foi discutido anteriormente, a ocorrência de hematozoários também pode estar relacionada com a ausência de ave portadora do parasito no local, portanto, nessa condição, mesmo com a existência do vetor a infecção não irá acontecer.

Inicialmente a PCR “Haem” foi utilizada em nosso trabalho com o propósito de atuar como um exame de triagem para que depois as amostras positivas fossem direcionadas para análises em reações específicas e separadas de *Plasmodium* e *Haemoproteus*. No entanto, ao incluirmos todas as amostras colhidas na PCR

“rPLU”, foi observado que três delas que não amplificaram na PCR “Haem” foram positivas na PCR “rPLU”, o que indicou que esse procedimento de triagem não poderá ser aplicado. Isso possivelmente pode ter ocorrido devido a possíveis variações na seqüência gênica dos parasitos que podem inibir o alinhamento específico de oligonucleotídeos e conseqüentemente, a amplificação de alguns indivíduos e ainda a insuficiente concentração de DNA do hematozoário pode causar a ocorrência de falsos negativos (Richard et al., 2002). No caso das amostras positivas na PCR “Haem”, cabe salientar que não podemos inferir a ausência ou presença de *Haemoproteus* nas amostras das araras por método de exclusão apenas considerando os resultados positivos da PCR “rPLU” pois podem ocorrer infecções mistas em um mesmo hospedeiro (Waldenström et al, 2002). No que se refere às amostras que foram positivas na PCR “Haem” e negativas na PCR “rPLU” é provável que estejam infectadas por *Haemoproteus*, contudo para confirmar esse indicativo é necessária a realização de PCR específica para esse parasito. Não foi possível comparar a sensibilidade da PCR “Haem” em relação ao hemosporídeo *Haemoproteus*, pois a falta de controle positivo para esse parasito inviabilizou a padronização de uma PCR específica.

Na pesquisa por hematozoários em esfregaços sangüíneos por meio de microscopia óptica foram encontrados parasitos em 4,16% (4/96) das araras (Tabela 10) e a parasitemia média foi de 0,04%. Belo e colaboradores (2009) obtiveram a prevalência de 24,4% (31/127) de parasitos do gênero *Plasmodium* ao analisar esfregaços sangüíneos de psitacídeos em Minas Gerais e no Ceará. Em outra pesquisa, Silva (2011) ao estudar a presença de *Plasmodium* em araras da espécie *Ara ararauna* no Rio de Janeiro visualizou parasitos em eritrócitos de 30,19% (16/53) dos animais que apresentaram baixa parasitemia (<0,01%). Tais prevalências foram maiores quando confrontadas com a que foi encontrada no presente estudo, provavelmente por terem sido obtidas em regiões com climas e altitudes diferentes o que influencia na presença do vetor transmissor da doença, bem como sua ocorrência. Em contrapartida, Fecchio (2011) observou prevalência pouco menor que a obtida neste trabalho ao examinar esfregaços sangüíneos de passeriformes no Distrito Federal que resultou em 3,6% (28/772). É possível que essa desigualdade tenha ocorrido por diferenças no tipo da fase de infecção nos momentos de colheita das amostras, pois no ciclo do *Plasmodium* o período de infecção aguda é curto, por isso a chance de encontrar o protozoário é maior nessa

ocasião e poucos parasitos estão presentes no sangue periférico durante a parasitemia crônica (Valkiūnas, 2005). Esses mesmos motivos podem explicar a diferença de parasitemia observada neste trabalho (0,04%) e por Silva (2011) que obteve valor pouco mais baixo (<0,01%). Não foi possível identificar o gênero e a espécie dos protozoários considerando a morfologia, pois foram encontrados somente gametócitos e algumas formas não definidas dos parasitos e a baixa parasitemia dificultou esse processo em que é necessário o exame de vários estágios do ciclo de vida do parasito (Garnham, 1966).

Das amostras que foram positivas na microscopia óptica, três foram confirmadas nos dois tipos de PCR, uma amplificou somente na PCR “Haem” e não foram encontradas hemácias parasitadas em 12 das amostras que foram positivas em alguma das reações, provavelmente por apresentarem menor parasitemia. Com esses resultados os exames moleculares mostraram ser mais sensíveis em relação à pesquisa por parasito em esfregaço sangüíneo. Essa observação está em acordo com Ribeiro e colaboradores (2004) que encontraram prevalência de 39,6% de *Plasmodium* em passeriformes por meio de PCR (“rPLU”) e 16,5% de aves positivas na microscopia óptica. Assim como Belo e colaboradores (2009) que avaliaram a infecção por plasmódios em psitacídeos com a utilização de PCR (“rPLU”) e exames de esfregaços sangüíneos e observaram resultados positivos em 34,6% e 24,4% das aves estudadas nos respectivos métodos. No entanto, Valkiūnas et al. (2008) ao utilizarem microscopia óptica e PCR encontraram valores similares em ambos os exames para a presença de *Plasmodium* (22% e 17% respectivamente). Ao analisar esses dados, é possível inferir a importância da associação da microscopia óptica e exames moleculares para detectar a presença de plasmódios a fim de reduzir os resultados falsos positivos e negativos que possam ser encontrados em alguma dessas técnicas de diagnóstico.

Na malária aviária a anemia está associada à destruição de eritrócitos devido ao desenvolvimento de merontes eritrocíticos e a remoção ativa de eritrócitos infectados da circulação pelas células do sistema fagocítico mononuclear (Garnham, 1966; Seed e Manwell, 1977; Valkiūnas, 2005). Contudo, os valores do eritrograma não foram estatisticamente significativos quando relacionados à infecção e nenhuma arara apresentou anemia (Anexo II), provavelmente devido à baixa parasitemia que foi encontrada nos animais positivos ou por estarem na fase crônica da doença em que alterações laboratoriais e clínicas estão ausentes (Silveira et al., 2009). Foi

observada diferença estatística por efeito de espécie apenas nos valores de volume globular (VG) apesar de Campbell (2010) afirmar que, com algumas exceções, os valores da série vermelha de psitacídeos são similares, o que está de acordo com a ausência de influência específica na contagem de hemácias e concentração de hemoglobina (Anexo II). No entanto, Villouta e colaboradores (1997) encontraram discrepância de valores de VG e hemoglobina quando compararam a espécie *Spheniscus humboldti* a outros pingüins (*Pygoscelis adeli*, *Pygoscelis antarctica* e *Eudyptes crestatu*). A diferença estatística associada ao efeito “local” observada na contagem de hemácias e hemoglobina (Tabelas 12 e 13) pode ser explicada pela diferença de estrutura dos recintos das araras em cada criadouro, pois os ambientes da Fundação Jardim Zoológico de Brasília são mais amplos em relação aos outros locais. Então, recintos grandes tornam mais difíceis as capturas das aves e isso permite que elas se esforcem mais fisicamente no processo de fuga, o que pode resultar em eritrocitose relativa devido à excitação ou ansiedade que estimula a liberação de glóbulos vermelhos mediada por catecolaminas. Esse mecanismo é ligeiro e transitório e não está associado a sinais clínicos (Randolph et al., 2010).

A infecção por *Plasmodium* não causou diferença significativa no leucograma das araras, embora leucocitose seja relatada em aves com malária (Campbell, 1995) e dois animais infectados apresentaram valores altos de leucócitos totais (23,5 e 29,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$) (Anexo II). Neste trabalho a proporção encontrada de heterófilos:linfócitos foi de 1,68, ou seja, o heterófilo foi o tipo de leucócito predominante no leucograma das araras deste estudo o que ocorreu nos achados de Proença (2010) e Silva (2011) que encontraram relações semelhantes e com a afirmação de Campbell (2010) de que a proporção desses dois tipos de células varia entre 1,1 e 2,4 nos psitacídeos. O efeito “espécie” resultou em alterações significativas nos leucócitos totais, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos (Tabelas 12 e 13) o que também foi observado por Villouta e colaboradores (1997). Efeito “local” foi observado na análise estatística da contagem de monócitos, heterófilos e basófilos. Isso pode ter ocorrido por possíveis infecções de outra natureza por influência de manejo, pois a presença de monócitos e heterófilos em maior quantidade geralmente estão associadas a processos infecciosos e inflamatórios (Campbell, 2006; Clark et al., 2009) e o basófilo é uma das primeiras células a participar de uma resposta inflamatória aguda ou reação de hipersensibilidade (Wakenell, 2010).

Não houve associação de alterações na contagem de trombócitos com a presença de infecção por plasmódios, o que foi compatível com o achado de Silva (2011), apesar de trombocitopenia ter sido relatada em galinhas domésticas experimentalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare* (Silveira et al., 2009). Contudo, diferença estatística com efeito “local” foi encontrada (Tabelas 12 e 13), e considerando que os trombócitos possuem função fagocítica e podem participar de processos infecciosos é possível que o manejo dos animais tenha influenciado no resultado (Campbell, 1995; Doneley, 2010). Em relação ao efeito “espécie” não foram encontrados dados na literatura a respeito e a disponibilidade de valores de referência para trombócitos em psitacídeos é escassa, entretanto ao comparar os resultados médios de araras positivas e negativas para *Plasmodium* spp. obtidos neste trabalho ($38,18 \pm 9,45$ e $37,17 \pm 15,39 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) (Tabela 15) com os de Silva (2011) ($31,81 \pm 10,11$ e $35,21 \pm 11,16 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) foi observado similaridade entre os dados dessas aves.

As proteínas plasmáticas totais e proteínas séricas totais tiveram alteração significativa somente quando relacionadas à espécie (Tabelas 12 e 13), e suas concentrações se comportaram de acordo com os valores obtidos em psitacídeos por Pólo et al. (1998) e Ritchie et al. (1994), respectivamente. No fracionamento das proteínas, a albumina foi o único parâmetro que apresentou diferença estatística por influência da presença de infecção por *Plasmodium* spp. (Tabela 15), provavelmente por ser uma proteína de fase aguda negativa e sua concentração se reduz durante processo infeccioso ou inflamatório (Eckersall, 2008). A albumina é sintetizada principalmente no fígado a partir de aminoácidos reciclados no próprio organismo e provenientes da dieta alimentar (Eckersall, 2008), logo, a composição da alimentação que a ave ingere e a presença de injúrias hepáticas causadas por parasitos e toxinas fúngicas podem influenciar nos níveis de concentração dessa proteína. Desse modo, tais fatores são possíveis causas da observação de efeito “local” nos níveis de albumina nos animais estudados. Apesar desse efeito, os valores obtidos para albumina foram compatíveis com os descritos por Ritchie e colaboradores (1994) e pouco abaixo do observado por Valle et al (2008) em *Ara ararauna*. As globulinas, que são outras frações das proteínas séricas (Bailey, 2008) apresentaram diferença significativa apenas por efeito “espécie” e a razão albumina:globulinas por efeito “local” e “espécie”, o que era esperado considerando as alterações das frações protéicas mencionadas anteriormente.

Alteração significativa foi encontrada na mensuração de creatinina por influência do local. Por ser um metabólito de origem protéica variações em sua concentração podem estar relacionadas à dieta do animal (Braun e Lefebvre, 2008), o que justifica o efeito observado. O valor médio de creatinina encontrado nas araras amostradas foi menor que as médias de concentrações obtidas por Pólo et al. (1998) e Ritchie et al. (1994). A concentração de ácido úrico foi estatisticamente significativa quando relacionada ao local e espécie. Conforme Almosny e Monteiro (2006) esse achado pode ser explicado por variações desse catabólito que podem ocorrer devido a espécie, idade, dieta alimentar, presença de hepatopatias e nefropatias.

No que diz respeito à atividade enzimática, foi observada diferença ($p < 0,05$) nas mensurações de ALT relacionada ao local e espécie, entretanto alterações na atividade dessa enzima são difíceis de interpretar e tem limitada utilidade por aumentar em injúrias de quase todos os tecidos e provavelmente neste estudo estão ligadas ao tipo de manejo que as aves foram submetidas (Hochleithner, 1994). Alterações significativas nas concentrações de AST foram significativas quando considerado o local e sua atividade geralmente está associada ao dano dos tecidos hepático e muscular (Campbell, 2006). Portanto, as condições de criação das aves podem influenciar as atividades enzimáticas, pois deficiência de alguns nutrientes, intoxicações, presença de infecções por microrganismos e estresse por captura e contenção podem justificar tais variações (Hochleithner, 1994; Harr, 2006). Não foi observado efeito de espécie nos níveis de AST, embora tenha sido citado na literatura (Pólo et al., 1998; Campbell, 2006). A atividade de fosfatase alcalina (FA) mostrou diferença significativa por efeito “local” e “espécie” e pode estar presente nos tecidos do intestino, fígado, rins e ossos (Harr, 2006). As alterações observadas podem ter relação com o manejo e a idade dos animais, pois a concentração de FA pode estar aumentada em animais em crescimento, o que neste caso não deve ser considerado, pois as aves amostradas eram adultas (Hochleithner, 1994).

Apesar de a dieta alimentar influenciar os níveis de cálcio sérico (Hochleithner, 1994) e a possibilidade de alterações nas concentrações de CK causadas por processo de captura e contenção (Lumeij, 2008) não foram encontradas diferenças significativas nos valores desses testes bioquímicos neste trabalho, bem como houve a ausência de efeito infecção nos mesmos.

Cabe salientar que embora achados laboratoriais associados à malária aviária tenham sido descritos como anemia, leucocitose, linfocitose, alterações nas concentrações de proteínas séricas, AST, ALT e creatinina (Graczyk et al., 1995; Williams, 2005; Harr, 2006) no presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas nesses parâmetros quando associados à infecção, com exceção da albumina (Tabela 15). Esses resultados podem indicar que os animais amostrados estavam na fase crônica em que não são manifestados sinais clínicos (Silveira et al., 2009), ou os animais estão infectados por cepas de *Plasmodium* não-patogênicas que causam apenas infecções assintomáticas (Greiner e Harrison, 1994) ou as araras possuem boa capacidade imunológica para resistir a infecção (Esparza et al., 2004).

No presente trabalho foram encontrados mais espécimes machos infectados (12/16) por hemoparasitos em relação às fêmeas (4/16) (Tabela 14). Contudo, na análise estatística o fator “gênero” não apresentou diferença significativa. Vale ressaltar que o número de animais amostrados nos grupos de machos (57/96) e fêmeas (39/96) foi desproporcional, o que pode ter influenciado os resultados obtidos. Tem sido descrito que o gênero do indivíduo pode influenciar a resposta imune do organismo, bem como a suscetibilidade a infecções, mas o consenso a respeito desse assunto ainda não foi obtido com as informações disponíveis na literatura. Saino et al. (1995) estudaram a atuação da testosterona na resposta imune em aves e observaram que o nível de imunoglobulinas decresceu enquanto a carga de ectoparasitos aumentou e Zuk et al. (1995) encontraram diminuição da contagem de linfócitos em aves que receberam implante de testosterona. Em contrapartida, no trabalho de Hasselquist e colaboradores (1999) foi concluído que a testosterona não promove efeito supressivo na resposta imune secundária em machos de aves cativas apesar de já ter sido mencionado que fêmeas desenvolvem melhor resposta imune que os machos. No entanto, Grossman (1985) sugeriu que a diferença de resposta imune entre os gêneros deve-se ao sistema imunológico melhorado das fêmeas e não a imunodepressão nos machos.

A arara da espécie *Ara macao* que foi amostrada em dois momentos (Tabela 18), com intervalo de aproximadamente quatro meses, apresentou infecção por hemoparasitos detectada por meio de microscopia óptica e testes moleculares em ambas as ocasiões, contudo a parasitemia obtida na primeira amostragem (0,09%) foi maior em relação à segunda (0,01%). Os resultados das PCR permitiram concluir

que a arara estava parasitada por *Plasmodium* spp. mas não excluiu a possibilidade de infecção concomitante por *Haemoproteus*. Na segunda amostragem foi observado que o peso da ave aumentou 21,95% (198 g), em relação ao peso inicial, o que pode ser considerado relevante visto que o procedimento de pesagem foi mantido nas duas ocasiões. Isso pode ter ocorrido porque animais infectados por plasmódios podem se alimentar menos na fase aguda da doença e por conseqüência diminuem o ganho e até mesmo perdem massa corporal (Williams, 2005). Então, considerando a diferença de parasitemia e de peso é provável que no primeiro dia de colheita de sangue essa arara estivesse na fase aguda da infecção. Outro indicativo dessa conjectura está relacionado à maior contagem de monócitos no primeiro dia, pois essas células têm a capacidade de fagocitar organismos complexos como os protozoários e desempenham importante função imunorreguladora por apresentar o antígeno processado aos linfócitos (Weiser e Thrall, 2006). Uma conseqüência disso pode ter sido o aumento de linfócitos observado no segundo exame. As proteínas plasmáticas totais apresentaram maior concentração na primeira amostragem e é possível que essa diferença tenha ocorrido devido ao aumento de fibrinogênio e outras proteínas de fase aguda positiva que podem modificar suas concentrações em processos infecciosos e inflamatórios (Eckersall, 2008), mas não foi possível comprovar essa suposição, pois não foi realizada a mensuração dessa proteína neste estudo. As enzimas ALT, AST e FA apresentaram modificações em suas concentrações, mas apesar de estarem presentes em outros tecidos existe a possibilidade das alterações estarem relacionadas com a injúria hepática que os parasitos possam ter ocasionado nesse órgão, pois parte de seu ciclo de vida pode ocorrer no fígado, bem como nos rins (Valkiūnas, 2005), o que também pode justificar a diferença de níveis de ácido úrico sérico entre os dois momentos, pois é o principal indicador de função renal em aves (Campbell, 2006). Ao analisar a concentração de CK nas duas ocasiões foi observado que estava maior na primeira amostragem o que pode ter acontecido devido ao aumento da atividade muscular associada à captura do animal (Lumeij, 2008), porque na primeira captura a ave estava em um recinto mais amplo do que na segunda, o que pode ter dificultado tal procedimento. Nesse caso, em especial, a malária causou alterações perceptíveis nos exames dessa arara, o que demonstra a necessidade de monitoração dos animais em relação a essa hemoparasitose. Entretanto, deve-se considerar a possibilidade de que essa ave pudesse estar

acometida por alguma infecção concomitante o que pode ter contribuído para as modificações nos exames.

Apesar do pequeno número de indivíduos amostrados, é importante registrar os resultados obtidos nos hemogramas e bioquímicos das araras que foram excluídas da análise estatística (Tabelas 19, 20 e 21), visto que duas espécies (*Ara rubrogenis* e *Ara glaucogularis*) estão em perigo de extinção (IUCN, 2011) (Tabela 2). Os outros animais excluídos são híbridos que provavelmente tiveram sua origem a partir de cruzamentos entre as espécies *Ara ararauna* e *Ara chloroptera* e com isso, formam um grupo de araras com características fisiológicas e hematológicas peculiares, por isso é preferível analisar os exames dessas aves separadamente de outras espécies.

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo realizado em criadouros de aves no Distrito Federal e Goiás nos permitem concluir que:

- Existe a presença de infecção por *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro nessas regiões, que foi caracterizada por baixa ocorrência e parasitemia.

- A PCR foi mais sensível para detectar *Plasmodium* quando comparada à microscopia óptica.

- As infecções não causaram alterações severas nos hemogramas e bioquímicos séricos, com exceção da albumina em que foi observada diferença estatística, o que pode indicar que as cepas desse parasito que ocorrem nessas localidades são de baixa patogenicidade.

- A maioria das diferenças estatísticas encontradas está relacionada à espécie e ao local em que as amostras foram colhidas. Essas observações nos permitem inferir que devem ser evitadas extrapolações de valores de referência para espécies diferentes de araras e também considerar o manejo a que as mesmas foram submetidas.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N.R.P. e 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, 2006. pp. 951.
- 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**, v. 88, p. 220–224, 2009
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; ÖSTMAN, 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 the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 267, p. 1583–1589, 2000.
- BRAUN, J.; LEFEBVRE, H.P. **Kidney Function and Damage**. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6ed, Academic Press, San Diego, 2008.
- 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. (Ed.), *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. ROCA, São Paulo, pp. 449 - 460, 2006.
- CAMPBELL, T.W. **Hematology of Psittacines**. In: Weiss, D.J.; WARDROP K.J.. *Schalm's veterinary hematology*. 6^a ed Blackwell Cap. 123. p. 968 – 976 (2010).
- CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

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

DAWSON, D.A.; DARBY, S.; HUNTER, F.M.; KRUPA, A.P.; JONES, I.L.; BURKE, T. A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 201 – 204, 2001.

ECKERSALL, P. D. **Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias**. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.), Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6ed, Academic Press, San Diego, 2008.

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, p. 00–00. 2004.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E.M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, n. 3, p.127-135, 2007.

FECCHIO, A. **Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (*Haemoproteus* e *Plasmodium*) em aves do cerrado do Brasil**. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 2011. 116p. (Tese de doutorado em Biologia Animal).

FRIDOLFSSON, A.K.; ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology**, v. 30, p. 116-121, 1999.

GODFREY, R. D.; FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B. Quantification of hematozoa in blood smears. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 558–565, 1987.

HASSELQUIST, D.; MARSH, J.A.; SHERMAN, P.W.; WINGFELD, J.C. Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 45, p. 167-175, 1999.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, e *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

IUCN, INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Red List of Threatened Species, 2011. (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>) (acesso em 14/05/2012).

KRONE, O.; PRIEMER, J.; SÖMMER, P.; LANGGEMACH, T.; LESSOW, O. Haemosporida of birds of prey and owls from Germany. **Acta Protozoologica**, v. 40, p. 281–289, 2001.

MEYER, S.T.; SILVA, A.F.; JÚNIOR, P.M.; NETO, J.A.A.M. Composição florística da vegetação arbórea de um trecho de floresta de galeria do Parque Estadual do Rola-Moça na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 701-709, 2004.

OLIVEIRA, E.C. **Verificação da influência da temperatura do ar e chuva do Distrito Federal na Dengue**. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Humanas, 2008. (Dissertação de mestrado em Geografia).

PÓLO, F.J.; PEINADO, V.I.; VISCOR, G.; PALOMEQUE, J. Hematologic and Plasma Chemistry Values in Captive Psittacine Birds. **Avian Diseases**, v. 42, p. 523-535, 1998.

PROENÇA, L.M. **Proteinograma sérico e parâmetros hematológicos de papagaios-verdadeiro (*Amazona Aestiva*) e araras-canindé (*Ara Ararauna*) de cativo**. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. (Tese de doutorado Medicina Veterinária - Clínica Médica Veterinária).

QUINTANA, F.; LÓPEZ, G.C.; SOMOZA, G. A Cheap and Quick Method for DNA-based sexing of birds. **Waterbirds**, v. 31, n. 3, p. 485-488, 2008.

RANDOLPH, J.F.; PETERSON, M.E.; STOKOL; T. **Erythrocytosis and Polycythemia**. In: Weiss, D.J.; WARDROP K.J.. Schalm's veterinary hematology. 6^a ed Blackwell Cap. 25. p. 162-166 (2010).

REPELLI, C. A., ALVES, R., SOUZA, E. B. de, UBARANA, V. N., ALVES, J. M. B. Sensação térmica para Fortaleza-CE. **Monitor Climático**, v. 11, n. 121, p. 8 – 16, 1997.

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**, v. 88, n. 4, p. 819–822, 2002.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F.C.S.; 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**, v. 130, p. 261–267, 2005.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. 1994. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida. Appendix p. 1335 - 1337.

SAINO, N.; MØLLER, A.P.; BOLZERN, A.M. Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (*Hirundo rustica*): an experimental test of the immuno-competence hypothesis. **Behavioral Ecology**, v. 6, p. 397-404, 1995.

SILVA, L.G. **Determinação da prevalência de infecção, por meio da identificação por microscopia óptica, das espécies do gênero *Plasmodium* em araras-canindé (*Ara ararauna*) mantidas em cativeiro no Estado do Rio de Janeiro e seus achados no hemograma e bioquímicas séricas**. Niterói: UFF, 2011. 110p. (Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária – Clínica e Reprodução Animal).

SILVEIRA, P.; DAMATTA, R.A.; DAGOSTO, M. Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 257–262, 2009.

VALKIŪNAS, G. **Avian Malaria Parasite and other Haemosporidia**. CRC press, Boca, Raton, Florida, 2005.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; KRIZANAUSKIENE, 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**, v. 94, n. 6, p. 1395–1401, 2008.

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**, v. 38, n.3, p. 711-716, 2008.

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

VILLOUTA, G.; HARGREAVES, R.; RTVEROS, V. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Avian Pathology**, v. 26, p. 851-858, 1997.

WAKENELL, P.S. **Hematology of Chickens and Turkeys**. In: Weiss, D.J.; WARDROP K.J.. Schalm's veterinary hematology. 6^a ed Blackwell Cap. 122. p. 958 – 967, 2010.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D., ÖSTMAN, Ö. A new nested PCR method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 191–194, 2004.

WEISER, G.; THRALL, M.A. **Considerações sobre leucócitos e Leucograma.** In: THRALL, M.A. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. ROCA, São Paulo, pp. 118-122, 2006.

ZUK, M.; JOHNSEN, T.S.; MACLARTY, T. Endocrine-immune interactions, ornaments and mate choice in red jungle fowl. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 260, p. 205 – 210, 1995.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredita-se que este trabalho em que foi encontrada a presença de infecção por *Plasmodium* em araras mantidas em cativeiro contribuiu para a avaliação da presença de hemoparasitos aviários no Distrito Federal e Goiás. Contudo, considerando a escassez de informações a cerca das hemosporidioses que possam acometer as araras há a necessidade de realização de mais estudos, no que diz respeito à distribuição, transmissão, patogenia, manifestação clínica e patologia clínica dessas doenças.

Também é de fundamental importância o desenvolvimento de investigações a respeito da presença, distribuição e espécies de mosquitos que possam atuar como vetores de hematozoários nessa região, bem como a determinação das espécies por meio de seqüenciamento de *Plasmodium* e outros hemosporídeos que parasitam as araras, com a finalidade de melhor elucidar o ciclo biológico desses parasitos nessa região.

A inserção de hemosporidioses nos exames de quarentena e triagem para inclusão de aves em plantéis e nos programas de reintrodução desses animais na natureza deve ser considerada, visto que foi suspeitado que araras infectadas antes

de serem incorporadas aos grupos estudados tenham atuado como fonte de infecção para outras que foram positivas em nossos testes.

ANEXOS

ANEXO I

i. Resumo publicado em anais de Congresso Internacional

Ramos, R. R. ; Ramos, R. R. ; Grossmann, N. V. ; Borges, T. S. ; Marodin, N. B. ; Monteiro, R.V. ; Miyasaka, R. A. ; Paludo, G. R. Hematological and Biochemical Evaluation of Captive Blue and Yellow Macaw (*Ara ararauna*). In: The American College of Veterinary Pathologists - 62th Annual Meeting and The Veterinary Society for Veterinary Clinical Pathology - 46th Annual Meeting, 2011, Nashville, USA. **Veterinary Clinical Pathology**, 2011. v. 40. p. 598-598.

ANEXO II

i. Tabelas de resultados de hemograma (Tabelas II.1 e II.2) e bioquímicos séricos das araras positivas para *Plasmodium* spp. na PCR.

Tabela II.1: Resultados de hemograma das araras positivas para *Plasmodium* spp. na PCR.

Arara	VG (%)	Hem*	Hb (g/dL)	LT**	Mon**	Linf**	Bas**	Eos**	Het**	Tromb**	PPT (g/dL)
2	37	2,91	13,4	10,00	0,40	1,80	0,20	0	7,60	24,00	3,6
7	42	2,65	13,3	12,00	0,12	0,60	0,24	0,24	10,80	49,50	5,0
9	36	2,11	10,5	23,50	0,23	10,34	0	0	12,92	37,00	5,4
66	43	2,47	15	29,00	0,23	3,48	0	0,29	22,91	40,00	4,2
67	44	2,5	14,9	17,00	1,70	5,10	0	0	10,20	38,50	4,4
68	42	2,37	12	9,00	0,63	4,59	0	0,36	3,42	30,50	4,0
70	36	2,21	13,1	12,00	0,12	3,84	0	0	8,04	29,00	4,4

Onde: VG – Volume globular; Hem - Hemácias; Hb – Hemoglobina; LT – Leucócitos totais; Mon – monócitos; Linf – linfócitos; Bas – basófilos; Eos – eosinófilos; Het – heterófilos; Tromb – Trombócitos; PPT – proteínas plasmáticas totais.

* ($\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$)

** ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)

Tabela II.2: Resultados de bioquímicos séricos das araras positivas para *Plasmodium* spp. na PCR.

Arara	PT (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G	Cr (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	FA (UI/L)	AC (mg/dL)	CK (UI/L)	Cálcio (mg/dL)
2	2,7	0,8	1,9	0,42	0,3	120	230	192	4,8	145,7	7,4
7	4,2	0,93	3,27	0,28	0,2	99	330	293	2,9	388,6	13,1
9	4,0	0,97	3,03	0,32	0,2	89	251	131	2,8	170	11,4
66	3,5	0,9	2,6	0,35	0,3	10	26	25	6,5	170	7,9
67	2,7	0,6	2,1	0,29	0,3	10	10	74	5	437	7,6
68	3,1	0,6	2,5	0,24	0,3	15	26	36	3,4	145	12,2
70	2,9	0,9	2,0	0,45	0,3	10	5	149	3,8	145	10,2

Onde: VG – Volume globular; Hem - Hemácias; Hb – Hemoglobina; LT – Leucócitos totais; Mon – monócitos; Linf – linfócitos; Bas – basófilos; Eos – eosinófilos; Het – heterófilos; Tromb – Trombócitos; PT – proteínas séricas totais; Alb – albumina; Glob – globulinas; A/G – razão albumina/globulina; Cr – creatinina; ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina; AC – ácido úrico; CK – creatinina-quinase.

ANEXO III

i. Descrição do ensaio e princípio utilizado para análise de bioquímica sérica

Tabela III.1. Tabela com a descrição do ensaio e princípio método utilizado para análise de bioquímica sérica (Labtest Diagnóstica[®]).

Ensaio	Princípio
Proteínas totais séricas	Os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.
Albumina	A albumina interage com o verde de bromocresol tamponado e, devido ao erro protéico dos indicadores, ocorre formação de cor verde, proporcional à concentração da albumina na amostra. O verde de bromocresol possui especificidade para albumina e não sofre interferência de valores elevados de bilirrubina e hemoglobina, permitindo também que as interferências de valores elevados de triglicérides possam ser corrigidas utilizando o branco de amostra.
Globulinas	A mensuração de globulinas é obtida a partir da subtração da concentração de albumina das Proteínas totais séricas.
Creatinina	A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.
ALT Liquiform	A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.
AST Liquiform	A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.
FA colorimétrico	A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional a atividade enzimática, é medida em 590 nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.
Ácido úrico	O ácido úrico é oxidado pela uricase à alantoíla e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração do ácido úrico na amostra.
CK - NAC	A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) é oxidada a fosfogluconato(6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK na amostra.
Cálcio colorimétrico	O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta que é medido em 570 nm.

Onde: ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina; AC – ácido úrico; CK – creatinina-quinase.