

KITAWANN TAYRONE DE SOUSA NUNES CARDOSO

**Frequência de hemoparasitos em Pombos (*Columba livia domestica*) na região
central de Teresina – PI**

TERESINA/PI

2016

KITAWANN TAYRONE DE SOUSA NUNES CARDOSO

**Frequência de hemoparasitos em Pombos (*Columba livia domestica*) na região
central de Teresina – PI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Universidade Federal do Piauí,
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivete Lopes de Mendonça
Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

C268t Cardoso, Ktawann Tayrone de Sousa N
Taxa de positividade e identificação de parasitos causadores da malária aviária emombos (Columbigallina domestica) Gmelin 1789 no centro de Teresina- R. / Ktawann Tayrone de Sousa N Cardoso – 2015.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Genética Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

Orientação: Prof^a. D^a. Ivete Lopes Mendonça

1. Haemproteus 2. Plasmodium 3. Leucocytozoon 4. PCR 5. Microscopia I. Título

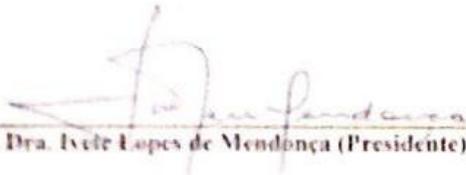
CDD 593.1

FREQUÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM POMBOS (*COTURNICULIDA*
DOMESTICUS) NA REGIÃO CENTRAL DE TERESINA-PI

KITAWANN TAYRONE DE SOUSA NUNES CARDOSO

Dissertação aprovada em: 01/03/2016

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Ivete Lopes de Mendonça (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dra. Karina Rodrigues dos Santos (Interna) / CMRV/UFPI



Prof. Dr. Felipe A. Carvalho Costa (Externo) / FIOCRUZ

A personalidade criadora deve pensar e julgar por si mesma, porque o progresso moral da sociedade depende exclusivamente da sua independência.

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus pais, minha namorada pela sua forçar, dignidade, dedicação e firmeza para lutar pelos seus objetivos.

A todos demais familiares e amigos que sempre me incentivam na busca dos meus objetivos mesmo quando já não acreditava mais.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constante.

A todos os professores, que foram tão importantes em minha vida estudantil e em meu desenvolvimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, minha força maior.

A minha orientadora, Prof^ª. Dra. Ivete Lopes de Mendonça, pela orientação.

Ao prof. Dr. Fabio Barros Brito, pela coorientação e pelo auxílio imprescindível na realização da minha pesquisa. Ao Dr. Fabio Diniz pela gentileza e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Joílson, Juliana, Tyssia, Arnon, Michel, Fernanda e em especial a Ravena, Camila, Simone, Joice, Gustavo Cardoso, Stanley Sudário e Leoberto Torres pelos momentos de convivência no laboratório e pelo auxílio nas horas difíceis. Do laboratório de genética do CCN/ UFPI por terem me recebido de braços abertos em seu ambiente de trabalho e terem tido a paciência e humildade de ensinar técnicas até então desconhecidas por mim

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciência Animal da UFPI, que de algum modo contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO.....	10
2 CAPÍTULO I: Frequência de hemoparasitos em Pombos (<i>Columba livia domestica</i>) na região central de Teresina – PI.....	27
ABSTRACT.....	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 MATERIAL E MÉTODO.....	29
2.3 RESULTADOS.....	33
2.4 DISCUSSÃO.....	39
2.5 CONCLUSÕES.....	41
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO I.....	42
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	45

RESUMO

CARDOSO, Kitawann. T. S. N.; BATISTA, Joilson.; F.; BRITTO, Fabio. B.; MENDONÇA, Ivete. L. **Taxa de Positividade e Identificação de Parasitos Causadores da Malária Aviária em Pombos (*Columba livia domestica*) Gmelin, 1789 no centro de Teresina – PI**

Os gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*, pertencem à ordem Apicomplexa. Entre as principais espécies de aves infectadas por estes parasitas estão os pombos domésticos *Columba livia*. O objetivo desse trabalho foi investigar a presença de parasitos causadores de malária aviária, através de técnicas moleculares e parasitológicas em pombos do centro de Teresina Piauí. As coletas foram realizadas em praças Públicas do centro de Teresina. As análises parasitológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN/CCA) e a análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (CCN) ambos da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foram utilizadas 54 aves, e verificou-se a presença de hemoparasitos, ectoparasito como piolhos do gênero *Columbicola* e aves apresentaram lesões. Obteve se através da microscopia óptica Taxa de Positividade para malária aviária de 83,33% (45/54) para o centro de Teresina, com baixa intensidade parasitária. Os estudos moleculares apontaram a presença de *Haemoproteus* e/ou *Plasmodium* em 98,1% (53/54) das amostras, não observando nenhuma amostra positiva para *Leucocytozoon*.

Palavras-chave: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, PCR, Microscopia.

ABSTRACT

CARDOSO, Kitawann. T. S. N .; BATISTA, Joilson .; F .; BRITTO, Fabio. B.; Mendonca, Ivete. L. **Positivity Rate Causing Parasites and Identification of Avian Malaria in pigeons (*Columba livia domestica*) in the center of Teresina - PI**

The Haemoproteus, Plasmodium and Leucocytozoon genders belongs to the Apicomplexa order. Among the main species of birds infected by these parasites there are domestic pigeons (*Columba livia*). The aim of this study was to investigate the presence of parasites which causes avian malaria, through molecular and parasitological techniques in pigeons from the center of Teresina, Piauí. Samples were collected in public squares in the center of Teresina. Parasitological analyzes were developed in the Animal Health Laboratory (LASAN/CCA) and the molecular analysis was performed in the Laboratory of Molecular Biology (CCN) both from the Federal University of Piauí (UFPI). It was used 54 birds, and it was found the presence of hemoparasites, ectoparasito such as lice of the genre *Columbicola* and injured birds. It was obtained through optical microscopy positivity rate for avian malaria in 83.33% (45/54) to the center of Teresina, with low parasite intensity. The molecular studies indicate the presence of Haemoproteus and/or Plasmodium in 98.1% (53/54) of samples, not observing any positive sample of Leucocytozoon.

Keywords: Haemoproteus, Plasmodium, Leucocytozoon, PCR, Microscopy.

1.0 INTRODUÇÃO

Popularmente conhecido como Pombo, a espécie *Columba livia* (Gmelin, 1789) é uma espécie exótica que se adaptaram bem aos centros urbanos pela oferta de condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Em muitos países, os pombos são considerados como pragas urbanas, sendo um reservatório de várias doenças aos seres humanos e a outros animais (PADOVEZI, 2010).

Várias espécies de parasitos podem acometer os pombos, como ectoparasitas e endoparasitas sendo alguns microscópicos, como os protozoários sanguíneos. Entre os hemoparasitos mais estudados e mais frequentes nos pombos estão o *Plasmodium* sp., *Haemoproteus* sp. e *Leucocytozoon* sp. (PADOVEZI, 2010).

Patógenos podem ter importância na dinâmica de populações, apresentando importância na manutenção da diversidade em comunidades ecológicas e ecossistemas (MCCALLUM; DOBSON, 1995). Podem ameaçar a biodiversidade interferindo nas populações naturais, uma vez que parasitos interferem não apenas na sobrevivência, mas também na reprodução de seus hospedeiros (ALTIZER; FOUFOPOULOS; GAGER, 2001).

As doenças têm sido apontadas como importantes causa de extinção de espécies silvestres (SANTOS, 2012). Como exemplo, o ingresso acidental de insetos vetores em Maui (Havaí), no século XIX, e posteriormente a introdução de espécies exóticas de aves parasitadas por *Plasmodium relictum*, são apontadas como responsáveis por algumas das extinções de aves endêmicas da região (VANRIPER et al., 1986). Embora se tenha conhecimento da importância do estudo destes parasitos, poucos trabalhos utilizam dados sobre prevalência e distribuição de hemoparasitos para responder questões ecológicas, evolutivas e comportamentais.

O gênero *Haemoproteus* pertence ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporina, à família Plasmodidae (PIERCE, 2000). Em 1906, descobriu-se que, *Haemoproteus columbae* (KRUSE, 1890), parasita de pombos e codornas, era transmitido por um mosquito hematófago (FALLIS; WOOD, 1957). Os organismos classificados do gênero *Haemoproteus* apresentam distribuição cosmopolita com mais de cem espécies catalogadas infectando aves e representando muitas das famílias (BENNETT; PEIRCE, 1988).

Vários gametócitos em um único eritrócito são comumente observados em algumas espécies, como *H. tinnunculi* (PEIRCE; BENNETT; BISHOP, 1990). Assim como organismos extracelulares podem ser observados ocasionalmente em algumas amostras. Em geral, os gametócitos de *Haemoproteus* spp. possuem um contorno periférico distinto,

citoplasma que contém quantidades variáveis de um amarelo com pigmento marrom escuro granular e puntiformes grânulos roxos, e um núcleo central. Em algumas espécies, a diferença morfológica entre macrogametócitos e microgametócitos pode ser identificada (PHILLIP; WAYNE; SHANE, 2009).

Os plasmódios são encontrados entre répteis, seres humanos e outros mamíferos. Estes parasitos pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Haemosporina, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*, sendo agrupados em 14 subgêneros, assim distribuídos: sete subgêneros ocorrem em répteis (TELFORD, 1984), três subgêneros em mamíferos, quatro subgêneros em aves (GARNHAM, 1960), sendo eles, *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella* e *Huffia*.

Os plasmódios aviários são parasitos de grande importância por serem utilizados extensivamente como modelos ecológicos do sistema hospedeiro e parasito (HAMILTON; ZUK, 1982; ATKINSON; VAN RIPER III, 1991), além de servirem como modelo para o estudo da malária humana.

Muitas espécies de *Plasmodium* foram relatadas a partir de aves (SOULSBY, 1982). A morfologia do organismo varia entre as espécies, em geral, os gametócitos de espécies de *Plasmodium* podem ser irregularmente redondo, alongados em forma de "L" ou "V", com um núcleo centralizado anfofílico redondo, e citoplasma moderadamente basófilo contendo vários grânulos de pigmento castanho escuro. *Plasmodium juxtenucle* são relativamente pequenos com cistos redondos, enquanto em *P. relictumhas* os gametócitos são irregulares, ambas as espécies podem deslocar o núcleo do eritrócito hospedeiro (SOULSBY, 1982).

O *Leucocytozoon* pertence ao filo Apicomplexa, classe Coccidia (LEUCKART, 1879) ordem Haemosporina, família Plasmodidae (LEVINE; CAMPBELL, 1971), Existem diversas espécies de *Leucocytozoon*, mas poucas patogênicas (VALKIUNAS, 2005).

Existe em torno de 143 espécies relatadas de hospedeiro específico, sendo que, a espécie *Leucocytozoon marchouxi* é a mais encontrada em pombos, e raramente apresenta patogenicidade (VALKIUNAS, 2005). A descrição das espécies é baseada normalmente na morfologia dos gametócitos na circulação sanguínea, estudos dos estágios dos merontes exoeritrocíticos ou esquizontes (FORRESTER; ELLIS, 2008). Numerosas espécies de *Leucocytozoon* foram identificadas a partir de muitas famílias de aves hospedeiras (SAVAGE; ARIEY; GREINER, 2006).

A gametogônia de espécies de *Leucocytozoon* ocorre dentro de células hematológicas, ao passo que a esquizogônia ocorre em vários gametócitos celulares. O parênquima e endotélio de *Leucocytozoon* são altamente pleomórficos com algumas espécies apresentando

tanto formas fusiformes quanto arredondadas ou somente uma das formas. No caso do *L. maclaeniare* o mesmo apresenta forma tanto fusiforme como redonda (BENNETT et al., 1991). No entanto, os descritos a partir de estudos com *Leucocytozoon* de passeriformes, mostram que todos exibiram formas redondas (BENNETT; PEIRCE, 1992), assim como *L. podargii*, *L. ibisi* e *L. otidis* (ADLARD; PEIRCE; LEDERER, 2002). A presença do parasita pode ampliar a célula hospedeira. O núcleo da célula hospedeira infectada normalmente é distorcido, obtendo uma forma crescente homogênea longa e escura ao longo de uma borda do parasita onde o mesmo é deslocado para a margem da célula hospedeira (PHILLIP; WAYNE; SHANE, 2009).

O estudo das interações entre parasitos e hospedeiros é importante para se entender relações ecológicas, evolutivas e comportamentais, incluindo seleção sexual (CLAYTON et al., 1991), migração (ALTIZER; OBERHAUSER; BROWER, 2000) e capacidade competitiva (MAKSIMOWICH; MATHIS, 2000). Indivíduos parasitados podem ser mais predados e menos hábeis para defender territórios (LAFERTY; MORRIS, 1996). Portanto, o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa e na estrutura da comunidade, dispersão e diversidade genética (SCOTT, 1988).

Pouco se sabe sobre a transmissão sazonal de hemoparasitos em regiões tropicais e subtropicais onde vetores permanecem ativos o ano todo (ATKINSON; FORRESTER; GRESINER, 1988a). A sazonalidade na prevalência de hemoparasitos em populações de aves silvestres tem sido mostrada em diversos estudos conduzidos em regiões temperadas (DEVICHE; GREINER; MANTECA, 2001) onde condições climáticas extremas limitam sua transmissão aos meses quentes do ano. Muitos destes estudos foram conduzidos com espécies migratórias em suas áreas de reprodução, portanto, limitados há poucos meses consecutivos.

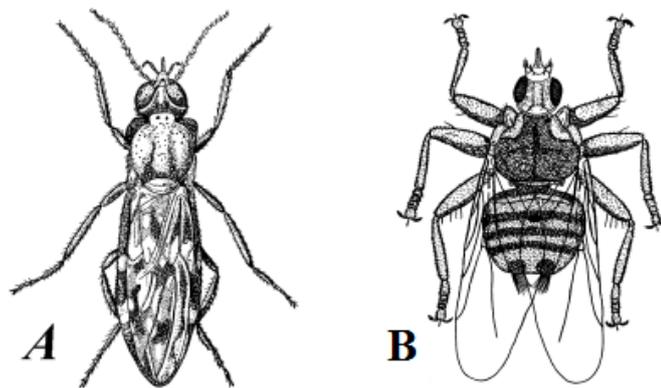
Aves migratórias diferem das residentes por serem expostas a pelo menos duas faunas de parasitos durante seu ciclo anual (WALDENSTRÖM et al., 2002). Quando pensado em sua importância na produção, deve-se lembrar que o esforço reprodutivo pode levar a um aumento na prevalência de parasitos através da redução de recursos alocados para defesa do hospedeiro (SHELDON; VERHULST, 1996).

1.1 Gênero *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

1.1.1 Etiologia, vetores e reservatórios do Gênero *Haemoproteus*

O gênero *Haemoproteus* pertence ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporina, família Plasmodiidae, onde são caracterizados pelo seu desenvolvimento intraeritrocitário e produção de grânulos refrangentes de pigmento escuros, que são originários da digestão de hemoglobina, e distinguidos também pela ausência de reprodução assexuada na circulação sanguínea (PIERCE, 2000). Uma vez que os parasitas se desenvolvem em dois grupos de hospedeiros, os vertebrados como as aves e vetores dípteros sugadores de sangue, o processo sexual ocorre nos vetores, sendo assim, as aves hospedeiros intermediários e os vetores os hospedeiros finais definitivos (VALKIUNAS, 2005). Quanto a seus vetores, o desenvolvimento do parasito nem seus dois vetores são similares, porem podem apresentar diferenças, no tamanho do oocisto onde nos Culicoides mede aproximadamente 10 µm de diâmetro e nos hipoboscídeas pode atingir 40 µm de diâmetro, no número de esporozoítos produzidos que nos Culicoides produzem cerca de 100 esporozoítos oriundos de um único esporoblasto (Valkiūnas, 2005), e nas moscas hipoboscídeas produzindo-se milhares de esporozoítos que originasse de múltiplos esporoblastos (Atkinson, 2008), e na duração da esporogonia que são diferentes entre os dois tipos de vetores, pois nos Culicoides a duração é inferior a 10 dias e nas moscas hipoboscídeas cerca de 10 dias a completar-se, (Valkiūnas, 2005). Abaixo são descritas as duas espécies de mosca (Figura 1).

Figura 1 - Vetores de *Haemoproteus*



Fonte: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)
 (A) *Culicoides Nubeculosus*; (B) *Hippoboscidae Pseudolynchia canariensis*

1.1.2 Aspectos epidemiológicos

Em 1906, descobriu-se que *Haemoproteus columbae*, parasita de pombos e codornas, era transmitido pela picada de mosquitos hematófagos, da família Hippoboscidae, (FALLIS; WOOD, 1957), descobriram que mosquitos da família Ceratopogonidae, do gênero

Culicoides podiam transmitir outras espécies de *Haemoproteus*. Os organismos classificados no gênero *Haemoproteus* apresentam uma distribuição cosmopolita com mais de cem espécies catalogadas infectantes de aves representam assim muitas das famílias (BENNETT; PEIRCE, 1988).

1.1.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos em aves geralmente são assintomáticos em baixa intensidade parasitária, mas podem tornar se sintomáticos durante a fase aguda, quando parasitemias eritrocitárias e números de merontes nos tecido atingem alta intensidade (CARTER; NANCY; HUNTER, 2008). Outros autores também não relataram anemia significativa em infecções com *Haemoproteus*, incluindo *H. meleagridis* em perus doméstico infectados experimentalmente (ATKINSON; FORRESTER; GREINER, 1988b) e *Haemoproteus* spp. em Grã Tits (*Parus major*) (OTS; HÖRAK, 1998). Porém, anemia regenerativa grave com policromasia foi relatada em Corujas Snowy (*Bubo scandiacus*) infectadas com *Haemoproteus noctuae* (EVANS; OTTER, 1998) e em Snowy Corujas, Corujas Tawny, e Grandes Corujas Horned (*Bubo virginianus*) infectadas com *Haemoproteus syrni* (MUTLOW; FORBES, 1999).

Os sinais de infecção em Pombos da Rocha *Columba livia* (Gmelin, 1789) incluem fraqueza, anemia e anorexia (COATNEY, 1933). Elevação no número de linfócito sem circulação, heterófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos foram observados em infecções naturais e experimentais com *Haemoproteus*, provavelmente uma resposta celular mediada de ambos os estágios eritrocitários e pré-eritrocítico do parasita. Além de nenhuma diferença significativa em concentração de proteínas plasmáticas, hemoglobina e hematócrito foram observadas nas aves infectadas (GARVIN; HOMER; GREINER, 2003).

1.1.4 Patologia e Patogenia

Praticamente pouco se sabe sobre a patogênese das infecções de *Haemoproteus*, pois são raras as informações sobre o seu desenvolvimento em hospedeiros naturais e experimentais (CARTER; NANCY; HUNTER, 2008).

Raras respostas do hospedeiro têm sido associadas com o desenvolvimento de merontes como a ramificação de paredes finas que frequentemente ocorrem nos tecidos pulmonares (GARNHAM, 1966). Pouco se sabe de uma resposta do hospedeiro associada com merontes pre-eritrocítico e pós-infecção. Observou-se que, em *Cyanocitta cristata*,

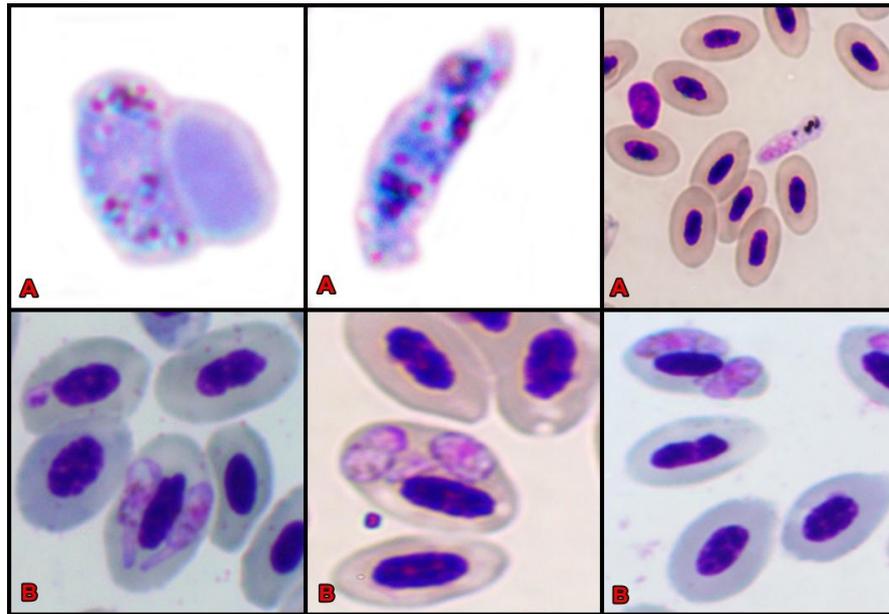
infectadas experimentalmente com *H. danilewskii*, 57 dias após infecção, há manifestação de lesões no fígado, baço e pulmão, incluindo necrose no fígado, infiltrações linfocitárias, epiteliais e hiperplasia nos brônquios terciários no tecido pulmonar. As alterações histológicas no tecido esplênico incluíram hiperplasia de polpa branca arteriolar endotelial, necrose aleatória de linfocitose, aumento no número por macrófagos, células de plasma, e células de Mott (GARVIN; HOMER; GREINER, 2003). Acredita-se que lesões são desenvolvidas após amadurecimento de merontes que se rompem. Miosite grave tem sido associado com megalomerontes de paredes espessas em uma variedade de espécies de aves. Estas lesões são vinculadas com megalomerontes intactos ou rompidas, como manchas brancas ou faixas hemorrágicas escuras em macrófagos de tecidos do fígado e baço com o aumento destes órgãos (ATKINSON; FORRESTER; GREINER, 1988b).

Megalomerontes foram associados à patologia muscular em vários hospedeiros aviários infectados experimentalmente (PEIRCE et al., 2004). Mecanismos hemorrágicos escuras em macrófagos de tecidos responsáveis pela anemia nestas espécies hospedeiras são desconhecidos, embora possa haver um equilíbrio sensível de remoção entre os eritrócitos parasitados pelo baço e a sua substituição por glóbulos vermelhos imaturos (ATKINSON; FORRESTER AND GREINER, 1988b).

1.1.5 Morfologia

Vários gametócitos dentro de um único eritrócito são comumente observados em algumas espécies, como *H. tinnunculi* (PEIRCE; BENNETT; BISHOP, 1990). Organismos extracelulares ocasionais podem ser observados a baixo (Figura 2).

Figura 2- Gametócitos intra e extracelular



Fonte: (CARDOSO, 2015)

(A) Organismos extracelulares e (B) Vários Gametócito em único eritrócito

Bennett e Peirce, 1988 dividiram os macrogametócitos de *Haemoproteus* spp. em cinco categorias morfológicas em microhalteridial, halteridial, circumnuclear, rhabdosomal e discosomal. Normalmente os gametócitos de *Haemoproteus* spp são halteridiais sendo alongados e curvos, normalmente circundando o núcleo do eritrócito de acolhimento. No entanto, a forma predominante dos gametócitos varia entre as espécies. Por exemplo, considerando os haemoproteídeos da ordem Falcoformidae, *H.tinnuniculi* são tipicamente halteridial enquanto o *H. janovyi* é altamente pleomórfico (PEIRCE; BENNETT; BISHOP, 1990).

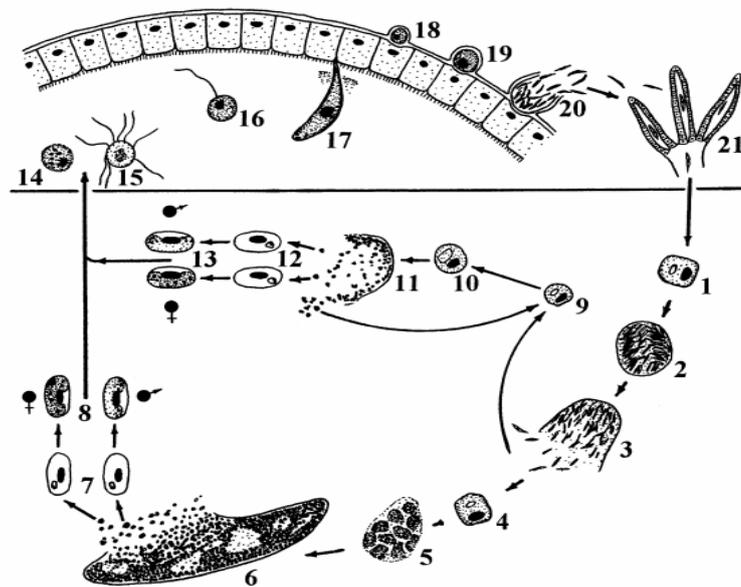
Em geral, os gametócitos de *Haemoproteus* sp. tem um contorno periférico distinto, citoplasma que contém quantidades variáveis de um amarelo para o pigmento preto amarronzado granular e puntiformes grânulos roxos, e um núcleo localizado centralmente. Em algumas espécies, a diferença morfológica entre macrogametocitos e microgametocitos pode ser identificada (PHILLIP; WAYNE; SHANE, 2009).

1.1.6 Ciclo Biológico

A figura abaixo nº3 abaixo representa o ciclo biológico do *Haemoproteus* onde em sua parte superior ocorre no vetor e a parte inferior ocorrendo na ave: 1 esporozoito em células endoteliais; 2, 3 exoeritrocito merontes de primeira geração com merozoítos alongados; 4 merozoítos em células endoteliais; 5,6 crescendo e megalomerontes maduros nos

músculos esqueléticos, respectivamente; 7 merozoites em eritrocitos; 8 amadurecer gametócitos; 9 merozóito na célula retículo endotelial no baço; 10,11 crescimento e amadurecimento de merontes no baço, respectivamente; 12 merozoites em eritrócitos; 13 maduros gametócitos; 14 macrogâmeta; De 15 exflagelação de microgametas; 16 fertilização de macrogâmeta; 17 a forma fertilizada do parasito penetrar na membrana peritrófica; 18 jovem oocisto; 19, 20 esporogônia; 21 esporozoítos nas glândulas salivares do vetor.

Figura 3- Representação esquemática do ciclo de vida do *Haemoproteus*



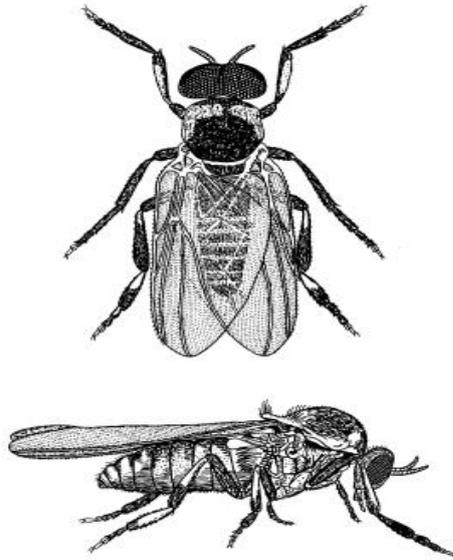
Fonte: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)

1.2 Gênero *Leucocytozoon*

1.2.1 Etiologia, vetores e reservatórios do Gênero *Leucocytozoon* (Danilewsky, 1884).

O *Leucocytozoon* pertence ao filo Apicomplexa, classe Coccidia ordem Haemosporina, família Plasmodiidae (LEVINE; CAMPBELL, 1971). Até o momento só há relatos de sua presença em aves. Na (figura 4) segue um desenho esquemático do vetor.

Figura 4- Vetor *Simulium slossinae*



Fonte: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)

1.2.2 Aspectos epidemiológicos

Existem diversas espécies de *Leucocytozoon*, mas poucas são conhecidas por serem patogênicas aos seus hospedeiros. Além dos pombos, podemos citar aves aquáticas, galiformes e os avestruzes como grupo de risco (VALKIUNAS, 2005). Existe em torno de 143 espécies relatadas de hospedeiro específico, sendo que a espécie *Leucocytozoon marchouxi* é o mais encontrado em pombos, e raramente apresenta patogenicidade (VALKIUNAS, 2005). A descrição das espécies é baseada normalmente na morfologia dos gametócitos na circulação sanguínea, estudos dos estágios exoeritrocíticos (merontes ou esquizontes) também são verificados e analisados (FORRESTER et al., 2008). Numerosas espécies de *Leucocytozoon* foram identificadas a partir de muitas famílias de aves hospedeiras (SAVAGE; ARIEY; GREINER, 2006).

1.2.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da infecção por *Leucocytozoon* não são específicas e geralmente são pouco detectáveis (WOBESER, 1997). Animais jovens são mais suscetíveis a Leucocytozoonoses com alta letalidade, as aves mais velhas são mais resistentes, mas pode apresentar apatia e porem com rara letalidade. Anemia é o sinal clínico mais importante segundo (MALEY; DESSER, 1977). Outros sinais são convulsões, excitação acentuada (KHAN; FALLIS, 1968), anorexia, letargia, dificuldade respiratória e diarreia (WOBESER, 1997). Os sinais clínicos em aves de rapina infectadas com *L. lodd* podem variar de voo e

vocalização errática, velocidades de voo reduzidas, falta de coordenação, Depressão, cegueira, convulsões, anorexia, perda de peso, vômitos, fraqueza e esforço respiratório (TARELLO, 2006). Pombas infectadas com *L. marchouxi* apresentaram apatia, penas eriçadas, anemia e baixo pesos médiado corpo (PEIRCE, 1984).

1.2.4 Patologia e Patogenia

A patogênese de Leucocytozoonosis em aves aquáticas, por *L. simondi* pode ser melhor compreendida relacionando com o ciclo de vida de gametócitos e estágios exoeritrócito nos tecidos. Onde inicia com a introdução de esporozoítos no sangue e sua invasão em células hepáticas, evoluindo assim para merontes durante um período de 5 dias (DESSER, 1967).

A anemia é associada à ruptura de merontes somada à liberação de merozoítos na circulação. Ocorrendo a invasão de merozoítos nos eritrócitos e desenvolvimento de gametócitos redondos sendo transportados pelo sangue para vários órgãos, como o baço, linfonodos, fígado e cérebro, estes serão fagocitados por macrófagos formando megalomerontes contendo milhares de merozoítos (DESSER, 1967). Ocorrendo de 9 a 12 dias pós infecção coincidindo com o pico de fragilidade dos eritrócitos e anemia. Esta anemia é provavelmente devido a um "fator anti-eritrócito" libertado nos merontes ou suas células hospedeiras ao invés de destruição das hemácias por gametócitos. O pico da anemia antecede o pico da parasitemia (DESSER; RYCKMAN, 1976). A maior mortalidade ocorre em patos jovens no dia 12 pós infecção onde ocorre o ápice da anemia e rompimento de mais megalomerontes (VALKIUNAS, 2005).

Não há estudos detalhados sobre a patogênese de *L. marchouxi* em pombos e *L. toddii* em aves de rapina, embora megalomerontes foram descritos em muitos órgãos internos em pombos rosa (*Columba mayeri*) (PEIRCE; GREENWOOD; SWINNERTON, 1997) e em *Eurasian buzzards* (SIMPSON, 1991).

As estirpes patogênicas como Noruega e a Seney submetem merogônia primária no fígado seguido de merogônia secundária e formação de megalomerontes em vários órgãos adicionais. Cepas não patogênicas como Cusino, White Pine, e Algonquin iniciam merogônia a penas primária no fígado e não produzem megalomerontes. A patogenicidade de alguns *Leucocytozoon* parece estar relacionada ao desenvolvimento de megalomerontes (VALKIUNAS, 2005). Das oito espécies de *Leucocytozoon* patogênica para aves domésticas e selvagens, três *L. simondi*, *L. marchouxi* e *L. caulleryi* produzem megalomerontes, enquanto outras duas espécies *L. macleani* e *L. smithi* não produzem.

1.2.5 Patologia

As lesões macroscópicas em aves aquáticas com *Leucocytozoonosis* são fatais e incluem o alargamento do baço e fígado, palidez de tecidos, sangue com aspecto fino e aguado (WOBESER, 1997).

Megalomerontes associados com pequenos vasos sanguíneos tem como reação no hospedeiro a proliferação de células mononucleares grandes. Megalomerontes que haviam rompido e não continham merozoítos, foram preenchidos com um coágulo eosinofílico e grandes células mononucleares. Alguns megalomerontes no pulmão tinham a reação do hospedeiro caracterizada por várias camadas de células linfóides, células de plasma grandes, células mononucleares e fibroblastos, enquanto outros tiveram reações menos graves ou nenhuma reação. No pulmão algumas aves apresentaram congestão e infiltrados de células do tipo histiocitos contendo restos celulares e vestígios de pigmento em septos de espaços aéreos. Megalomerontes em órgãos como o baço e no músculo cardíaco não tinha reações teciduais nos locais apontados (NEWBERNE, 1957).

Porém foram observadas Megalomerontes em vários órgãos. No baço esplenomegalia, congestionamento, aumento do tamanho e número de macrófagos. O mesmo foi quase completamente destruído nos hospedeiros. No coração apresentou Infiltração linfocítica com moderada e acentuada hiperplasia e substituição de gordura pela proliferação de células na medula óssea. No fígado, necrose central grave foi recorrente com infiltração linfocítica periportal e difusa, células de Kupffer proeminentes que continham hemossiderina, e macrófagos com pigmento (SIMPSON, 1991).

Pouco se sabe sobre das lesões macroscópicas e histológicas em pombos infectados com *L. marchouxi*. O que se sabe é que a 7^o semanas de idade pombo-de-rosa e *Alectroenas nitidissima* (Scopoli, 1786) que morreram de *Leucocytozoonosis* apresentavam megalomerontes em várias fases de desenvolvimento no fígado, pâncreas, coração, rim, intestino e baço e (PEIRCE; GREENWOOD; SWINNERTON, 1997).

Numerosos Megalomerontes de até 210 µm de diâmetro foram encontrados no baço, fígado, necrose tubular renal e hemorragia no miocárdio. A esplenomegalia foi avaliada como uma lesão grave de *Leucocytozoonosis* em um Eurasian Buzzard infectados com *L. toddi* (SIMPSON, 1991).

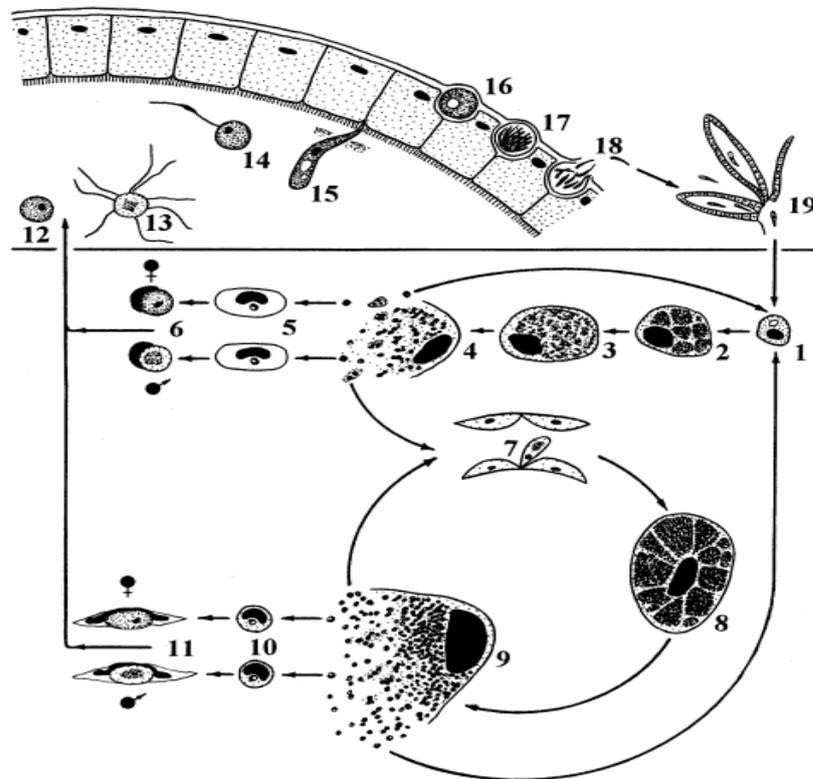
1.2.6 Morfologia

A gametogônia de espécies de *Leucocytozoon* ocorre dentro de células hematológicas, ao passo que a esquizogonia ocorre em gametócitos celulares. O *Leucocytozoon* é altamente pleomórfico com espécies apresentando formas tanto fusiformes quanto arredondadas, enquanto que outros exibem apenas fusiformes ou apenas formas redondas (BENNETT et al., 1991). No entanto, os descritos a partir de *Leucocytozoon* Passeriformes, todos exibiram formas redondas (BENNETT e PEIRCE, 1992), assim como *L.podargii*, *Libisi* e *L. otidis* (ADLARD; PEIRCE; LEDERER, 2002). A presença do parasito pode ampliar a célula hospedeira. O núcleo da célula hospedeira infectada normalmente é distorcido para formar uma borda ao redor do parasito, deslocando o núcleo para a margem da célula hospedeira (PHILLIP; WAYNE; SHANE, 2009).

1.2.7 Ciclo Biológico

A figura abaixo nº5 representa o ciclo de vida do *Leucocytozoon* onde em sua parte superior ocorre no vetor; parte inferior na ave: 1 esporozoíto ou merozoítos na célula do parênquima do fígado (hepatócitos); 2,4 merontes hepáticas; 5 merozoites e meritrócitos; 6 gametócitos em células hospedeiras arredondadas; 7 sincício que representa um fragmento de meronte hepática com dois ou mais núcleos ou merozoitos na célula retículo endotelial; 8, 9 megalomerontes; 10 merozoites em leucócitos mononucleares; 11 gametócitos em células hospedeiras de forma fusi; 12 macrogâmeta; 13 exflagelação de microgametas; 14 afertilização de macrogâmeta; De 15 ookinete penetrar na membrana peritrófica; 16 jovens oocisto; 17, 18 esporogonia; 19 esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (Figura 5).

Figura 5- Representação esquemática do ciclo de vida de *Leucocytozoon*



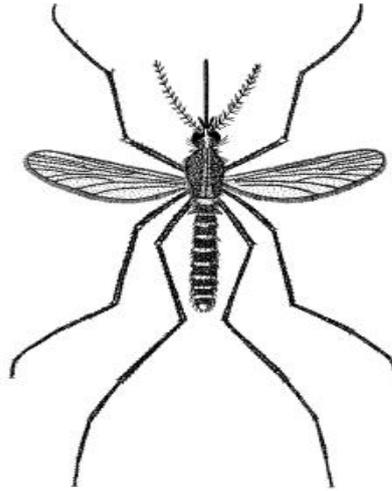
Fonte: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)

1.3 Gênero *Plasmodium*

1.3.1 Etiologia, vetores e reservatórios do Gênero *Plasmodium*.

Os plasmódios são encontrados em aves, répteis, seres humanos e outros mamíferos. Estes parasitos pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Haemosporina, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*, sendo agrupados em 14 subgêneros, assim distribuídos: sete subgêneros que ocorrem em répteis (TELFORD, 1984), três subgêneros em mamíferos e quatro subgêneros em aves (GARNHAM, 1960), sendo eles, *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella* e *Huffia*. Na (figura nº6) segue um desenho esquemático do vetor.

Figura 6- Vetor *Culex pipiens*



Fonte: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)

1.3.2 Aspectos epidemiológicos

Os plasmódios aviários são considerados parasitos de grande importância por serem utilizados extensivamente como modelos ecológicos de sistemas entre hospedeiro e parasito (HAMILTON; ZUK, 1982; ATKINSON; VAN RIPER III, 1991), além de servirem como modelo para o estudo da malária humana. Muitas espécies de *Plasmodium* foram relatadas a partir de aves (SOULSBY, 1982). Sua distribuição é extensa atingindo regiões tropicais e sub-tropicais como o *P. vivax*, Trópicos da África e Ásia *P. ovale*, África Central *P. reichenowi*, Sudeste Asiático *P. cynomolgi*, Índia e Sudeste Asiático *P. inui*, África Central *P. gonderi*, Ásia *P. gallinaceum*. (ATKINSON, 2008).

1.3.3 Sinais clínicos

Presença de anemia, apatia, anorexia, penas eriçada e baixa em até 50% no Hematócrito (ATKINSON, 2008).

Galinhas domésticas infectadas com *P. gallinaceum* e *P. juxtanucle* apresentaram aspecto letárgico, com feição pálida, fezes verde e diarréica com paralisia parcial ou total (GARNHAM, 1966). Perus adultos normalmente tornaram-se letárgicos, anoréxicos e desenvolvem hipertensão pulmonar direita como consequência da hipertensão arterial pulmonar hipóxica (HUCHZERMEYER, 1988). Perus jovens com infecções por *P. dura* apresentam poucos sinais clínicos até antes da morte, onde podem ocorrer convulsões resultantes de capilares cerebrais que bloqueados através dos merontes exoeritrócitos,

apresenta sinais neurológico como paralisia antes da morte. As aves adultas também podem apresentar pernas edemaciadas e gangrena dos barbilhões (GARNHAM, 1966).

Infecções por diversas cepas de *Plasmodium* podem ser extremamente patogênicas durante a fase aguda (WILLIAMS, 2005). As leucocitoses, em relação à linfocitose absoluta, e baixa dos sólidos totais no plasma foram documentados em *Corvus hawaiiensis* e pinguins com infecções agudas com *P. relictum* (MASSEY; GRACZYK; CRANFIELD, 1996). Alterações hematológicas são menos evidentes em infecções crônicas (RICKLEFS; SHELDON, 2007).

1.3.4 Patologia e Patogenia

Malária aviária é inicialmente uma doença sanguínea do sistema retículo endotelial. A sintomatologia está relacionada com a carga parasitária na circulação periférica (VANRIPER; ATKINSON; SEED, 1994). As Aves expostas a um maior número de esporozoítos infectantes têm maiores possibilidades de gerar lesões macroscópicas, microscópicas graves e mortalidade elevadas (ATKINSON et al., 2000).

Em estudos com *P. gallinaceum* em frangos infectados experimentalmente, a sintomatologia ocorreu entre o 5º e 7º dias após inoculação dos hemoparasitos (WILLIAMS, 2005). Este corresponde ao aumento da parasitemia periférica e declínios no hematócrito. A hemólise dos eritrócitos e catabolismo de infectados e não infectados levaria à produção de um excesso de biliverdina, que é excretado nas fezes (WILLIAMS, 1985).

As lesões macroscópicas marcantes de infecções agudas por *Plasmodium* incluem sangue fino, aumento e descoloração do fígado e baço por deposição de pigmento malárico em macrófagos nos tecidos. A hipertrofia ocorre devido à hiper celularidade e aumento da fagocitose dos macrófagos em vez do edema (AL-DABAGH, 1966). Desenvolvimento de lesões macroscópicas corresponde a um aumento constante da parasitemia periférica, hemólise intravascular de eritrócitos infectados como merontes maduros e aumento da fragilidade dos eritrócitos parasitados (WILLIAMS, 2005). A anemia hemolítica está associada à eritrocitopenia, a substituição de eritrócitos imaturos e à diminuição na concentração de hemoglobina que atinge pico durante a crise. Podendo causar Anóxia intravascular nas aglutinações de eritrócitos causando danos nas células endoteliais dos capilares (AL-DABAGH, 1966).

A deposição de pigmento malárico em macrófagos, onde as células infectadas são removidas da circulação podendo formar trombos ou êmbolos em alguns órgãos, especialmente no baço. O choque secundário pode ocorrer em fases terminais de infecções

agudas, resultante da hemólise de hemácias sadias e infectadas. Capilares e vênulas podem ser dilatadas, apresentarem edema e envolvendo o fluxo sanguíneo. Hemorragia pode ser evidente nos capilares. Pode ocorrer uma queda da pressão arterial e volume sanguíneo, perturbação do balanço hídrico, aumento do tempo de coagulação e níveis de potássio sendo evidente em infecções graves (AL-DABAGH, 1966).

Infecções com *P. miopatia*, e *P. cathemerium* produzem inflamações no músculo esquelético em canários infectados experimentalmente, caracterizando degeneração dos capilares, das fibras musculares e a presença de infiltrado mononuclear (CARMONA et al., 1996). Embora pouco se conheça da resposta do hospedeiro quanto aos merontes pre-eritrocítico *Plasmodium*, os merontes exoeritrocítico de algumas espécies, como *P. gallinaceum* e *P. durae*, pode bloquear capilares parcialmente ou completamente, causando extravasamento de proteínas do plasma, edema e hemorragia. No cérebro pode desencadear sintomas neurológicos como a morte súbita, assim como no coração, pulmões e glomérulos renais. A anemia também pode levar à deficiência circulatória que é compensada pelo débito cardíaco através de dilatação e hipertrofia do músculo cardíaco (AL-DABAGH, 1966).

1.3.5 Morfologia

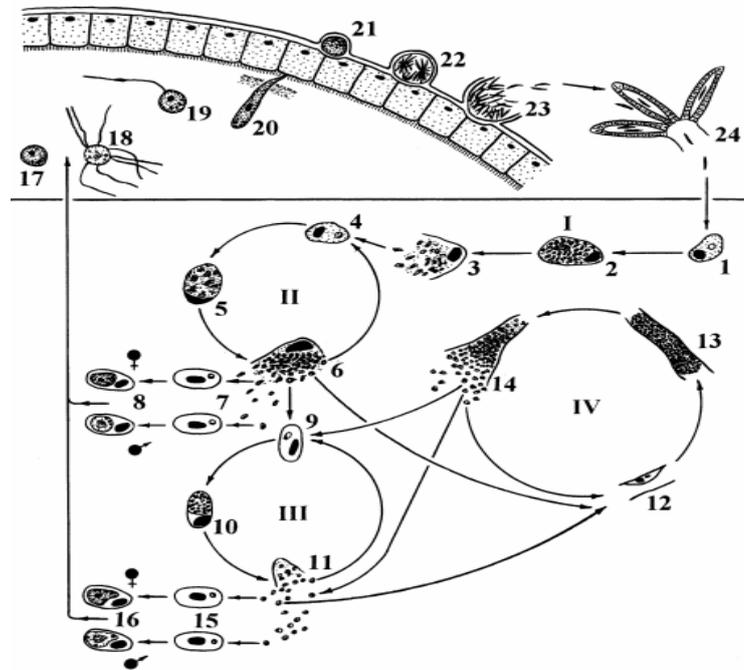
A morfologia varia entre as espécies. Em geral, os gametócitos das espécies de *Plasmodium* podem ser irregularmente redondos, alongados, com núcleo central anfofílico rodado e citoplasma moderadamente basófilo contendo vários grânulos de pigmento castanho escuro. *Plasmodium juxtannucleare* tem cistos redondos e pequenos quando comparados com *P. relictumhas* que apresenta gametócitos irregulares. Ambas podem deslocar o núcleo do eritrocito hospedeiro (SOULSBY, 1982).

1.3.6 Ciclo Biológico

Na Figura nº7 encontra-se uma representação esquemática do ciclo de vida do parasito da malária em uma ave cujo em sua parte superior ocorre no vetor e a parte inferior ocorre na ave I, II merogônia exoerythrocytic primário; III merogônia eritrocítico; IV merogônia exoeritrocito secundário; 1 esporozoítos no retículo endotelial célula; 2, 3 cryptozoites; 4 merozoite em macrófagos; 5, 6 metacryptozoites; 7 merozoites e meritrocitos; 8 gametócitos; 9 merozoite e meritrocitos; 10, 11 merontes eritrocitários; 12 merozoítos em células endoteliais dos capilares; 13, 14 sporozoite; 15 merozoites e meritrocitos; 16 gametócitos; 17 macrogâmeta; 18 exflagelação de microgametas; 19 fertilização de macrogâmeta; 20 ookinete

penetrar na membrana peritrófica; 21 a jovem oocisto; 22, 23 esporogonia; 24 esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (Figura 7).

Figura 7- Representação esquemática do ciclo de vida *Plasmodium relictumas*



Fonte Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia (2004)

Esta pesquisa contribui, para detectar e fornecer mais informações sobre a presença de parasitos causadores de malária aviária, sob um ambiente de altas temperaturas, através de técnicas moleculares e parasitológicas em pombos *Columba livia domestica* no centro urbano de Teresina Piauí.

Buscou-se determinar a prevalência, intensidade parasitária e abundância dos hemoparasitos causadores da malária aviária, demonstrando o papel do pombo na cadeia epidemiológica da enfermidade.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo, abstract seguido de uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos; um capítulo contendo artigo completo, "**Frequência de hemoparasitos em Pombos (*Columba livia domestica*) na região central de Teresina – PI**". A ser encaminhado para publicação na revista Microbiological Research estruturados de acordo com as normas da revista e referências bibliográficas da introdução geral.

CAPÍTULO I

FREQUÊNCIA DE HEMOPARASITOS EM POMBOS (*Columba livia domestica*) NA REGIÃO CENTRAL DE TERESINA – PI

KITAWANN TAYRONE DE SOUSA NUNES CARDOSO¹, JOILSON FERREIRA
BATISTA², FABIO BARROS BRITTO³, IVETE LOPES MENDONÇA

1. Biólogo Mestrando em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.
2. Médico Veterinário Doutorando em Ciência Animal.
3. Universidade Federal do Piauí, Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza, Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina, Piauí, Brasil.
4. Professora Doutora em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

2.0 ABSTRACT

CARDOSO, Kitawann. T. S. N.; BATISTA, Joilson. F.; BRITTO, Fabio. B.; Mendonca, Ivete. L. **Positivity Rate Causing Parasites and Identification of Avian Malaria in pigeons (*Columba livia domestica*) in the center of Teresina - PI**

The Haemoproteus, Plasmodium and Leucocytozoon genders belongs to the Apicomplexa order. Among the main species of birds infected by these parasites there are domestic pigeons (*Columba livia*). The aim of this study was to investigate the presence of parasites which causes avian malaria, through molecular and parasitological techniques in pigeons from the center of Teresina, Piauí. Samples were collected in public squares in the center of Teresina. Parasitological analyzes were developed in the Animal Health Laboratory (LASAN/CCA) and the molecular analysis was performed in the Laboratory of Molecular Biology (CCN) both from the Federal University of Piauí (UFPI). It was used 54 birds, and it was found the presence of hemoparasites, ectoparasito such as lice of the genre *Columbicola* and injured birds. It was obtained through optical microscopy positivity rate for avian malaria in 83.33% (45/54) to the center of Teresina, with low parasite intensity. The molecular studies indicate the presence of Haemoproteus and/or Plasmodium in 98.1% (53/54) of samples, not observing any positive sample of Leucocytozoon.

Keywords: Haemoproteus, Plasmodium, Leucocytozoon, PCR, Microscopy.

2.1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*, pertencem à ordem Apicomplexa e formam um grupo diverso de parasitas transmitidos por vetores que infectam hemácias. No caso do *Leucocytozoon* spp., também infectando leucócitos e outros órgãos dentro dos hospedeiros vertebrados (VALKIUNAS, 1993). Espécies destes gêneros parasitam diversos hospedeiros, apresentando características similares ao parasito da malária humana. Todos são referidos como causadores da malária aviária, mas, na maioria dos casos, esta é ocasionada apenas pelo *Plasmodium* spp., sendo o mais comum (BENSCH et al., 2004).

Entre as principais espécies de aves infectadas por estes parasitas estão os pombos domésticos *Columba livia domestica*. Estes foram inseridos no Brasil no século XVI e adaptaram-se aos grandes centros urbanos, sendo consideradas aves sinantrópicas nocivas, sendo um potencial transmissor de patógenos para os seres humanos e outros animais. Eles têm sido objeto de muitos estudos ornitológicos e parasitológicos, avaliando-se o impacto de hemoparasitos sobre sua aptidão. Neste sentido, destaca-se a atenção à malária aviária (GARVIN et al., 2003).

O estudo das interações entre parasitos e hospedeiros é importante para se entender relações ecológicas, evolutivas e comportamentais, incluindo a seleção sexual (CLAYTON et al., 1991), capacidade competitiva (MAKSIMOWICH; MATHIS, 2000) e migração (ALTIZER; OBERHAUSER; BROWER, 2000). Indivíduos parasitados podem ser mais predados e menos hábeis para defender territórios (LAFERTY; MORRIS, 1996). Portanto, o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa e na estrutura da comunidade, dispersão e diversidade genética (SCOTT, 1988).

A sazonalidade na prevalência de hemoparasitos em populações de aves silvestres vem sendo apresentada em diversos estudos realizados em regiões temperadas (DEVICHE; GREINER; MANTECA, 2001), onde condições climáticas extremas limitam sua transmissão aos meses quentes do ano. Muitos destes estudos foram conduzidos com espécies migratórias em suas áreas de reprodução e, portanto, limitados há poucos meses consecutivos, o que difere da proposta deste trabalho, pois as aves alvo do estudo habitam o mesmo ambiente em todas as épocas do ano e o local é conhecido por suas altas temperaturas.

Aves migratórias diferem das residentes por serem expostas a pelo menos duas faunas de parasitos durante seu ciclo anual (WALDENSTRÖM et al., 2002). Quanto à sua

importância na produção, deve-se notar que o esforço reprodutivo pode levar a um aumento na prevalência de parasitos através da diminuição de recursos reservados para defesa do hospedeiro (SHELDON; VERHULST, 1996).

Pouco se sabe sobre a transmissão sazonal de hemoparasitos assim como a ação de seus vetores em Teresina- PI, cidade de temperaturas elevadas com média anual de 28°C, podendo ultrapassar os 40°C. Tais características são importantes, pois podem interferir nos ciclos biológicos. Os locais de coleta são localizados no centro da cidade, onde há diariamente grande fluxo de pessoas e animais o que é importante para a compreensão do potencial de transmissão. Uma vez que podem ser um potencial de risco para aves silvestres e para a avicultura local, mas também reptéis e mamíferos. Os animais que foram utilizados na pesquisa são exóticos e residem em um mesmo ambiente em toda a época do ano. Portanto, os dados gerados nesta pesquisa poderão trazer diferentes conotações quando discutidos com demais trabalhos, que em sua grande maioria utilizam aves silvestres.

Diante deste contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de parasitos causadores de malária aviária, através de técnicas moleculares e parasitológicas em pombos *Columba livia domestica* do centro de Teresina no estado do Piauí.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local do estudo

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética e experimentação no uso de animais em pesquisas da Universidade Federal do Piauí no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob número 071/14.

As coletas foram realizadas em Praças Públicas no centro de Teresina Piauí. As praças foram: João Luís Ferreira (Latitude: 5° 5' 18.992" S Longitude: 42° 48' 48.748" W), Rio Branco (Latitude: 5° 5' 26.228" S Longitude: 42° 48' 58.95" W) e Marechal Deodoro da Fonseca (Latitude: 5° 5' 26.84" S Longitude: 42° 49' 4.361" W) (Figura I).

As análises parasitológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), Centro de Ciências Agrárias (CCA) e as análises de biologia molecular no Laboratório de Biologia Molecular (CCN) ambos da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados, utilizando-se lancetas descartáveis para punção do tarso esquerdo da ave e obtenção de uma gota de sangue. Logo em seguida, os esfregaços foram secos ao ar e fixados com metanol. Para cada indivíduo capturado, duas lâminas foram confeccionadas. As lâminas foram coradas por uma solução de GIEMSA em água destilada.

2.2.4 Análises parasitológicas e moleculares

A análise parasitológica no sangue foi realizada através de esfregaço sanguíneo, utilizando microscópio óptico com objetiva em óleo de imersão (aumento de 1000 ×). As lâminas foram examinadas a partir da visualização de cinco campos microscópicos com distribuição homogênea de eritrócitos (média de 150 hemácias/campo).

Para cada indivíduo foram observados 750 a 1.000 eritrócitos. Neste trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros: Taxa de positividade geral: definida como a porcentagem de indivíduos infectados na amostra considerando todos os parasitos registrados; Taxa de positividade específica: definida como a porcentagem de indivíduos infectados na amostra considerando um determinado gênero de parasito para avaliação do grau de infecção da ordem haemosporida. Foram analisados cinco campos por lâmina. O critério de avaliação (score) foi determinado em: < 5 hemácias parasitadas/ campo (+) caracterizando baixa intensidade parasitária, de 5 a 10 hemácias (++) caracterizando média intensidade parasitária e > 10 hemácias parasitadas/campo (+++) caracterizando alta intensidade de parasitária, este critério de avaliação foi criado com base nas técnicas método de avaliação pelo percentual de hemácias parasitadas (utilizado apenas para esfregaço delgado) e método tradicional de avaliação semiquantitativa (em cruzes) (MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA, 2005).

A identificação morfométrica foi baseada em dados morfológicos e morfométricos como comprimento e largura dos hemoparasitos encontrados nos pombos provenientes das três localidades do município de Teresina, PI. Foram examinados hemoparasitos de 270 campos em 54 lâminas diferentes presentes em pombos das praças João Luis (local 1), Marechal Deodoro da Fonseca (local 2) e praça Rio Branco (local 3), utilizando-se microscopia de luz usou-se o microscópio Leica Qwin D-1000, versão 4.1 do setor de patologia Animal, do CCA/UFPI.

As análises moleculares foram realizadas através da extração de DNA do tecido sanguíneos onde o mesmo foi utilizado para a confirmação da presença do parasito através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) onde foram utilizados cinco pares de

iniciadores e uma enzima e restrição para a detecção da doença e para especificar os possíveis gêneros causadores do parasitismo.

2.2.5 Reações de cadeia pela Polimerase

2.2.5.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de 1,0 mL de sangue seguindo o protocolo do kit *DNeasy tissue and blood* QIAGEN. Após extraído as amostras foram quantificadas e a pureza foi observada em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c), utilizando-se 2,0 µL do DNA ressuspenso em TE (Tris-EDTA). Ao final do procedimento o DNA obtido foi armazenado a -20° C até à sua utilização.

Com o objetivo de fazer uma busca mais detalhada dos possíveis Hemoparasitos causadores do parasitismo observado nas aves, utilizou-se como estratégia o uso de duas metodologias moleculares.

I. (FALLON et al., 2003): As relações de PCR foram realizadas num volume de 10 µL, contendo os seguintes componentes: tampão a 1×, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada trifosfato de desoxinucleótido, 0,4 µM de cada iniciador, 0,5 unidades de polimerase Taq Qiagen (Qiagen, Inc., Valência, Califórnia), e 1,0 µL de solução de extração de DNA. Condições de ciclagem para o original par de primers (343F e 496R) que amplifica 286pb foi executado usando desnaturação inicial de 2 min a 94° C, seguida de 35 ciclos com 1 min de desnaturação a 94° C, 1 min de para anelamento a 57°C, e extensão a 72° C durante 1 min e 10 s, com um passo final de extensão a 72° C durante 3 min. Foram observadas bandas em géis de agarosa a 1,5%. Com esta técnica objetivou se diagnosticar os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sendo a banda de 286pb comum aos dois gêneros.

II. (HELGREN et al., 2004) Foram realizadas duas PCRs consecutivas sendo a primeira realizada em volume de 10 µL, contendo: Tampão a 1× MgCl₂ 50 mM, Primer (HaemNFI) 10mM, Primer (HaemNR3) 10mM, Taq 5,0 Unidades, DNTP 10 mM, DNA= 1µL.

Na segunda PCR foi utilizado 1 µL dos amplicons gerados na primeira reação como DNA molde. Para detecção de Leucocytozoon spp. Foram utilizados os primers HaemFL e HaemR3L, que amplificam um fragmento de 478pb. Para detecção de *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. Foram utilizados os primers HaemF e HaemR2, que amplificam um fragmento de 480pb conforme descrito por Helgren et al. (2004). Estas reações seguiram as mesmas concentrações de reagentes da primeira PCR.

Todas as PCRs foram conduzidas utilizando as seguintes condições: 30 segundos a 94 C, 30s a 50° C, e 45s a 72° C durante 35 ciclos. As amostras foram incubadas antes da reação cíclica a 94° C durante 3 minutos e depois a reação cíclica a 72° C durante 10 min. Para verificar se as PCRs foram amplificadas com sucesso, foram utilizados 10 µl do produto final de PCR num gel de agarosa a 2%.

2.2.6 Análises Estatísticas

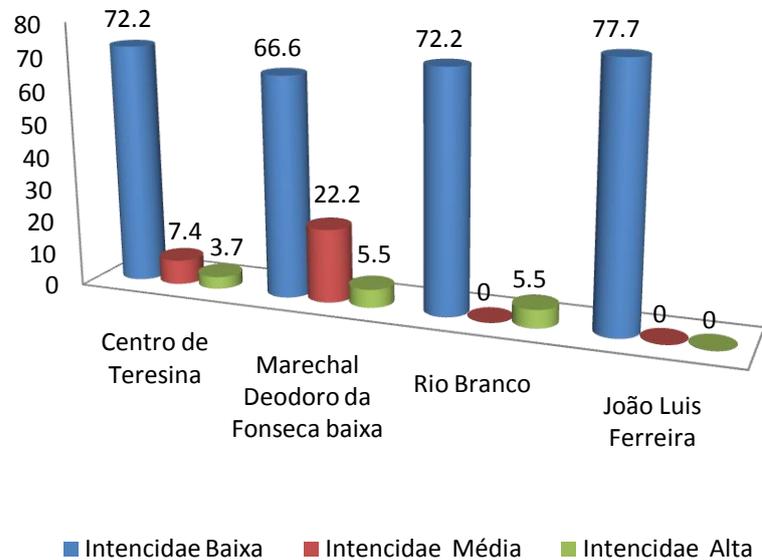
O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar prevalências (porcentagem de indivíduos infectados) dos gêneros encontrados e dos métodos utilizados do presente trabalho. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o programa R (2008) pacote default. Foram comparados os métodos de análise utilizando o teste do qui-quadrado (microscopia e Fallon, microscopia e Helgren, Fallon e Helgren com 5% de significância), também foram conduzidas utilizando-se o programa R (2008) pacote default.

2.2.7 Resultados

De um total de 54 animais utilizados na pesquisa, quando considerado os três gêneros comuns a malária aviária, obteve se através da microscopia óptica com frequência de 83,33% (45/54) para todas as aves coletadas no centro de Teresina, sendo na praça João Luís Ferreira 77,7% (14/18), Rio Branco 77,7% (14/18) e de Marechal Deodoro da Fonseca 94,4% (17/18).

Quanto à intensidade parasitária, levando se em consideração os três locais de coleta obteve se baixa intensidade (Figura 2).

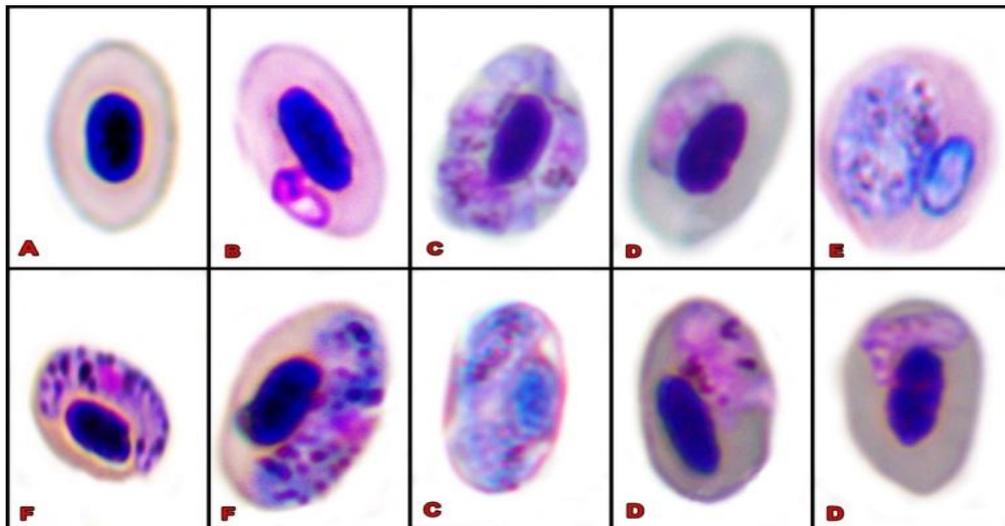
Figura 2- Intensidade parasitária de hemoparasitos em pombos coletados nas praças do centro de Teresina -PI



Fonte: (CARDOSO, 2015)

Os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* foram frequentes em todos os locais de coleta, sendo que as formas morfológicas mais observadas foram destacadas na (figura 3). A identificação dos gêneros dos parasitos foi desempenhada por observação dos esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico em uma ampliação de 1000x (objetiva de imersão de 100x) e os gêneros parasitários presentes, identificados de acordo com (VALKIÜNAS, 2005) e (TOMÁS, 2014).

Figura 3- Eritrócitos parasitados por diferentes formas evolutivas

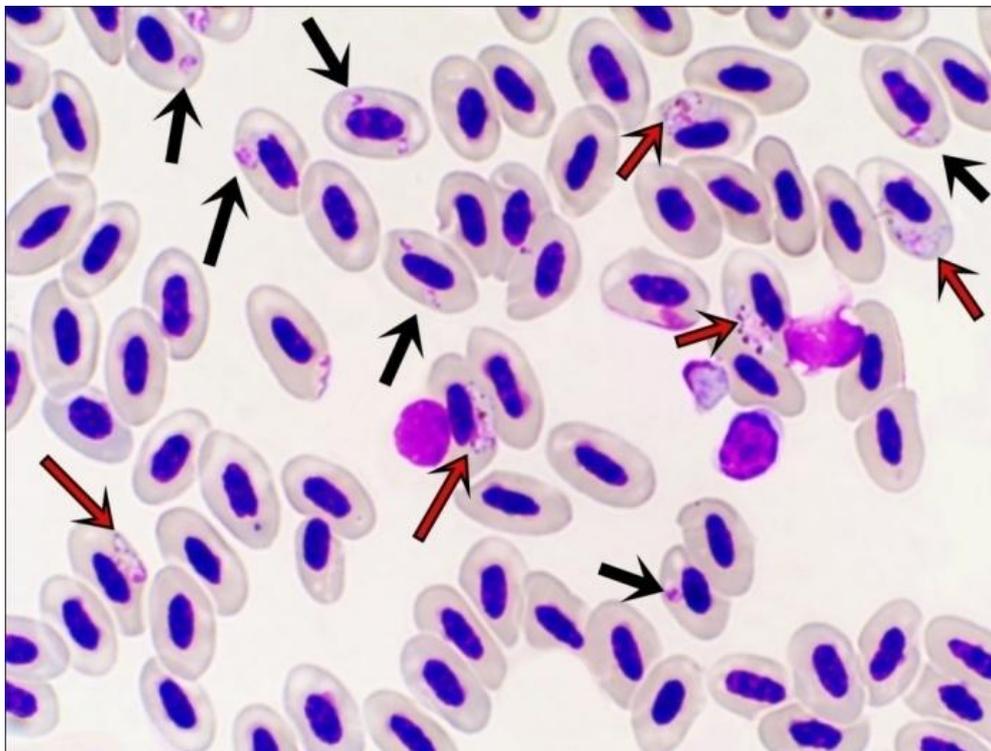


Fonte: (CARDOSO, 2015)

(A) Eritrócito normal, (B) Trofozoíto de *Plasmodium*, (C) Gametócito Circumnuclear, (D) Gametócito Microhalteridial, (E) Gametócito Discosomal e (F) Gametócito Halteridial

O coparasitismo entre *Haemoproteus* e *Plasmodium* foi observado através da microscopia óptica em várias amostras, com frequência de 33,3% (18/54) (Figura 4).

Figura 4- Coparasitismo entre gênero *Plasmodium* e o gênero *Haemoproteus*



Fonte: (CARDOSO, 2015)

Em setas pretas o gênero *Plasmodium* e em setas vermelhas o gênero *Haemoproteus*

A identificação morfométrica foi baseada em dados morfológicos e morfométricos como comprimento e largura usando como base (VALKIŪNAS, 2005) e (TOMÁS, 2014) para comparar a morfologia de hemoparasitos encontrados nos pombos provenientes das três localidades do município de Teresina, PI. Foram examinados hemoparasitos de 270 campos em 54 lâminas diferentes presentes em pombos das praças João Luis (local 1), Marechal Deodoro da Fonseca (local 2) e praça Rio Branco (local 3).

Nos locais 1, 2 e 3 o comprimento e largura podem ser analisadas conforme tabela abaixo (n-5). Usando o teste F na análise de variância e tukey no nível de 5% verificou-se que houve apenas diferenças significativas nas medidas dos comprimentos e largura de trofozoíto de *Plasmodium* e no comprimento de Gametócito Microhalteridial isto quando comparado os três locais de coleta.

Tabela 5- Morfometria dos hemoparasitos encontrados

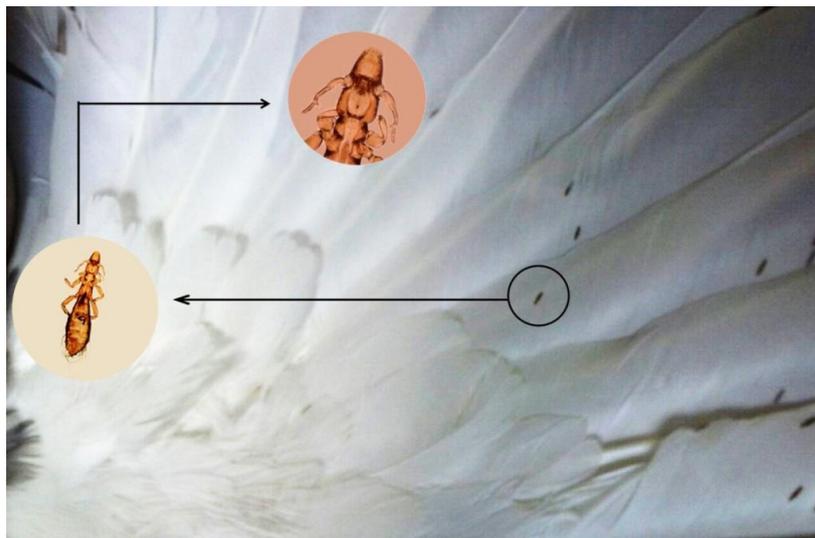
	PRAÇA MARECHAL					
	PRAÇA JOÃO LUIS		DEODORO DA FONSECA		PRAÇA RIO BRANCO	
	COMPRIMENTO MÉDIO	LARGURA MÉDIA	COMPRIMENTO MÉDIO	LARGURA MÉDIA	COMPRIMENTO MÉDIO	LARGURA MÉDIA
Trofozoíto de Plasmodium	2,31 ±0,7µm (0,7-3)	1,54 ±0,4µm (0,9-2)	4,23 ±0,8µm (2-5)	2,37 ±0,7µm (0,8-4)	3,06 ±2,1µm (1-10)	2,21 ±1,0µm (1-5)
Gametócito Circumnuclear	9,88 ±2,1µm (7-13)	4,37 ±2,6µm (2-12)	9,47 ±1,7µm (6-11)	3,18 ±1,7µm (2-6)	10,02 ±2,2µm (6-13)	3,74 ±1,0µm (2-5)
Gametócito Microhalteridial	8,52 ±1,3µm (7-11)	3,33 ±0,9µm (2-5)	7,34 ±1,6µm (4-12)	3,05 ±0,7µm (1-5)	7,72 ±1,4µm (5-10)	3,20 ±0,4µm (2-3)
Gametócito Discosomal	9,12 ±0,3µm (15-4)	5,39 ±1,2µm (4-8)	6,39 ±0,3µm (2-8)	3,89 ±0,8µm (2-4)	9,50 ±2,1µm (4-10)	4,27 ±1,4µm (1-7)
Gametócito Halteridial	9,89 ±2,1µm (13-6)	3,17 ±0,7µm (2-4)	10,74 ±1,7µm (7-13)	3,35 ±0,5µm (2-4)	10,45 ±1,6µm (7-14)	3,27 ±0,6µm (2-5)

Fonte: (CARDOSO, 2015)

Comprimento e largura média das formas morfológicas encontradas, desvio padrão médio e maior e menor medições encontradas

Durante a coleta não observou-se a presença dos vetores transmissores dos patógenos, no entanto foi encontrado um ectoparasito nas aves de todos os locais de coleta com frequência de 87% (47/54). Estes piolhos foram encontrados essencialmente nas asas. Sua cabeça apresenta forma mais longa que larga e um par de cerdas espatuladas na extremidade anterior, seu corpo é fusiforme. Sendo identificado como um piolho do gênero *Columbicola*, possivelmente da espécie *Columbicola columbae* identificado através da chave para gênero (MARCONDES, 2011).

Figura 5- Piolho do gênero *Columbicola*

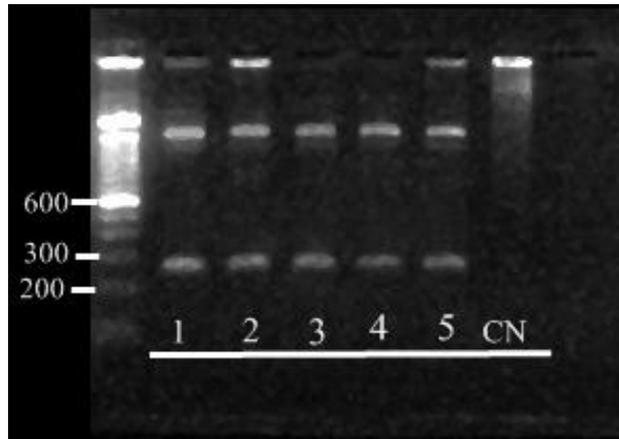


Fonte: (CARDOSO, 2015)

Do total de 54 aves analisadas 12,96% (7/54) apresentaram lesões, sendo elas: massas tumorais próxima dos olhos e conduto auditivo, ausência de dígitos e ausência de penas.

Através de estudos moleculares observou se que utilizando a técnica citada por FALLON et al., 2003, obteve-se frequência de 98,1% (53/54) para malária aviária. A (Figura 6) mostra cinco amostras positivas para *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus* onde o fragmento de 286 pares de bases de DNA pode ser evidenciado.

Figura 6- Diagnóstico molecular de infecção por Plasmodium/Haemoproteus

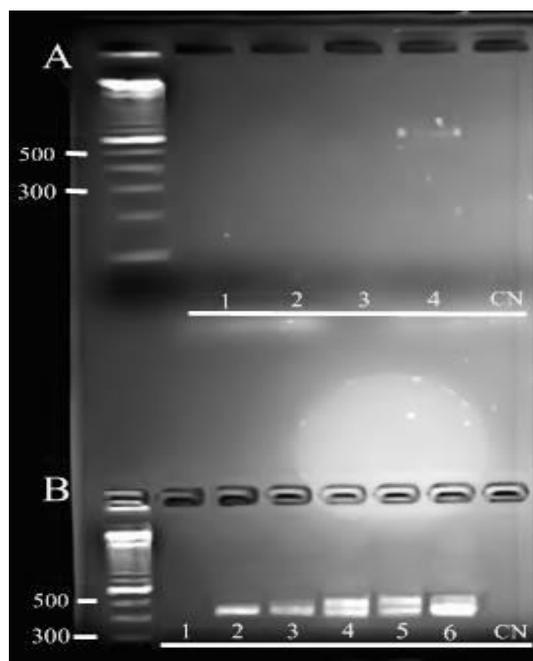


Fonte: (CARDOSO, 2015)

(1 a 5 - amostras, CN- controle negativo) o produto amplifica em 286bp

E utilizando a técnica citada por HELGREN et al., 2004, não se observou nenhuma amostra positiva para *Leucocytozoon* (Figura 7. A). No entanto, para *Haemoproteus* e *Plasmodium* foi registrado frequência de 98,1% (53/54) (Figura 7. B mostra exemplo da amplificação de fragmento de 478 pb).

Figura 7- Diagnóstico molecular de infecção para Leucocytozoon, Plasmodium e Haemoproteus



Fonte: (CARDOSO, 2015)

A- *Leucocytozoon*, amplificando em 478bp. E B- *Plasmodium/Haemoproteus* amplificando em 480bp.)

2.2.8 DISCUSSÃO

O presente trabalho procurou agregar o maior número de informações nas condições onde a pesquisa foi realizada, no sentido de melhor conhecer as inter-relações dos parasitos causadores da malária aviária com as aves infectadas sob influências de altas temperaturas. Assim reunindo informações que permitam avaliar os fatores envolvidos na cadeia epidemiológica, visando contribuir para o controle desta enfermidade, tanto em planteis comerciais, quanto em aves de vida livre que podem estar sofrendo interferências ocasionadas pelo patógeno.

Os gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium*, e *Leucocytozoon*, estão geneticamente relacionados, uma vez que fazem parte da mesma ordem. A identificação visual através da microscopia ótica apesar de ser uma técnica eficaz, possui algumas limitações decorrentes do ciclo evolutivo do parasito, carga parasitária, imunidade dos hospedeiros dentre outros que pode influenciar em seu resultado. Tais implicações podem ser resolvidas através de métodos moleculares, que são geralmente mais sensíveis do que os procedimentos microscópicos tradicionais (RICHARD et al., 2002). Além disso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode identificar parasito de forma mais sensível (BENSCH e KESSON, 2003).

Um resultado importante a ser discutido é o fato das amostras apresentarem alta frequência para malária aviária na microscopia quando avaliado os gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* (83,33%). O mesmo pode ser confirmado em estudos moleculares tanto pela metodologia de (FALLON et al., 2003) como por (HELGREN et al., 2004) onde ambos apresentaram frequência de 98,1% sendo superior ao encontrado na microscopia. Isso mostra que o estudo molecular apresentou maior sensibilidade quando comparado com a microscopia, como comprovado pelo teste para proporção cujo valor apresentou 0,0029 P-valor sendo estatisticamente diferentes ao valor de 5%, desta forma podendo trazer maiores vantagens para pesquisas científicas pela sua maior sensibilidade, no entanto o diagnostico por microscopia também apresentou valores bem confiáveis. Em aves que mantém um ritmo de crescimento populacional acelerado, a intensidade parasitária aumenta durante a estação reprodutiva do hospedeiro, como resposta da reprodução dos vetores e aumento da susceptibilidade dos hospedeiros devido à atividade hormonal e desgaste fisiológico associado à reprodução (ATKINSON e VAN RIPER, 1991).

Animais sociais possuem mais chances de adquirir e acumular ectoparasitos e vetores quando comparado a espécies solitárias, devido à proximidade entre os membros (POULIN, 1991). Através de métodos comparativos foi possível provar que a prevalência e a riqueza de

hemoparasitos foram maiores em espécies coloniais que em espécies solitárias. Muitas vezes parasitos combinam sua reprodução com a do hospedeiro garantindo uma transmissão mais eficiente aos futuros hospedeiros (CHRISTE et al., 2000), este dado é importante de ser discutido, pois aves *Columba livia* deste trabalho apresentam este comportamento colonial e assim como apontado apresentaram alta frequência de hemoparasitos.

A frequência de hemoparasitos na região central de Teresina foi uma das mais elevadas quando comparado com outros trabalhos realizados no Brasil. (FECCHIO et al., 2007), usando análise microscópica obteve uma prevalência de 6,9% para uma área de cerrado no Distrito Federal. Poucos estudos sobre malária aviária foram realizados no nordeste até o momento, porem em diferentes regiões do país estudos mostram valores distintos 12,4% em aves de Mata Atlântica em Minas Gerais (SEBAIO et al., 2002), 46,4% em São Paulo (WOOD; WORTH e BENNET, 1989), de 39,6% em Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2005) e no Pará foi de 10,3% (LAINSON, 1970) ambos os trabalhos foram realizados com aves silvestres. A variação destes resultados pode estar integrada aos distintos ambientes analisados como centros urbanos, ambientes florestais ou áreas abertas, além das variações climáticas de características de cada região.

As caracterizações climáticas de uma região é outro fator que contribui para a prevalência de malária, as altas temperaturas são características da cidade de Teresina, além de ser uma cidade mesopotâmica cujo centro da cidade se encontra entre rios, portanto apresentando umidade elevada. Altas temperaturas e pluviosidade são requisitos fundamentais para o desenvolvimento dos vetores, principalmente da família Hippoboscidae e Ceratopogonidae (ATKINSON e VAN RIPER, 1991).

Acredita-se que dados como alta prevalência, abundância de vetores e intensidade parasitária são resultados que dependem de fatores como a pluviosidade, justificativa dada pela alta prevalência de *Plasmodium* nas florestas chuvosas, comparado com as florestas secas (VAN RIPER et al., 1986). Ainda que as formações vegetais possam ser responsáveis por oferecerem micro habitats adequados à reprodução de seus vetores durante a estação seca. Durante as coletas não pôde ser observados estes micro habitats porem ainda assim se obteve alta frequência de hemoparasitos com baixa intensidade parasitária baixa sendo apontada na microscopia, observando dois gêneros diferentes *Haemoproteus* e *Plasmodium*, sendo que os locais de coleta apresentavam poucos microclimas e as coletas foram realizadas nos períodos mais quentes do ano. Uma explicação plausível foi apontada por (MOYER et al., 2002) onde segundo ele a baixa umidade relativa do ar pode ter pouco efeito sobre estes vetores, dado ao alto conteúdo de água em sua dieta. Ainda que muitos desses vetores possuam um complexo

ciclo de vida, abrangendo estágios de vida livre, podendo assim ser uma estratégia para habitar ambientes áridos.

A ausência do gênero *Leucocytozoon* nos esfregaços sanguíneos examinados no presente estudo poderia estar relacionada ao seu comportamento. Pois são detectáveis em sangue periférico por períodos de tempo muito curtos, o que torna a infecção difícil de detectar e identificar com precisão usando métodos tradicionais oculares (VALKIUNAS, 1997). Porém no estudo molecular não foi observado nenhum indivíduo parasitando as amostras assim confirmando o resultado anterior da microscopia. Apesar da dificuldade metodológica de relatar a presença de *Leucocytozoon* spp. em sangue periférico o mesmo ainda é comumente encontrado em algumas populações de aves, principalmente nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (DEVICHE et al., 2001). Portanto é importante frisar neste caso a importância da complementação com a técnica de PCR, pois desta forma foi possível afirmar com veemência que as amostras analisadas não apresentam o gênero *Leucocytozoon*.

Quando comparado os dados coletados nos três pontos de coleta, observou-se que apresentavam homogeneidade não apenas na frequência e intensidade parasitária, mas também na associação dos gêneros encontrados na microscopia além de que todos os locais de coleta apresentaram piolhos do gênero *Columbicola*.

2.2.9 CONCLUSÕES

O resultado dos estudos idealizados com o objetivo de investigar a presença de parasitos causadores de malária aviária através de técnicas moleculares e parasitológicas em pombos *Columba livia domestica* do centro de Teresina Piauí, depois de analisados e discutidos em confronto com a literatura compulsada, permite as seguintes conclusões.

- As aves analisadas estão parasitadas por hemoparasitos com alta frequência, baixa intensidade parasitária de *Plasmodium/Haemoproteus* dos gêneros causadores da enfermidade.
- As aves analisadas não apresentaram positividade para o gênero *Leucocytozoon*.
- Tanto o diagnóstico parasitológico quanto o molecular apresentaram resultados confiáveis, no entanto o diagnóstico molecular foi apontado pelo teste de proporção como sendo mais sensível que o parasitológico, além de ser mais indicado para o diagnóstico do gênero *Leucocytozoon* dado as suas características comportamentais e morfológicas.

- As aves apresentaram ectoparasitos do gênero *Columbicola*.

2.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPITULO 1

ALTIZER, S. M; OBERHAUSER, K.S; E BROWER, L.P. Associations between host migration and the prevalence of a protozoan parasite in natural populations of adult monarch butterflies. *Ecological Entomology*, 2000. 25:125-139. Disponível em <http://oberhauserlab.cfans.umn.edu/files/2012/10/Altizer-et-al.-Host-Migration-and-Parasite-Associations-2000.pdf>. Acesso em: 12/08/2014.

ATKINSON, C. T. and VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In Loye, J. E. and Zuk, M. (eds), Bird-parasite interactions. Oxford Univ. Press, 1991. p. 19-48.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

BENSCH, S.; PEREZ-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, p.1617-1620, 2004.

BENSCH, S., ANDS. ÅKESSON. Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warbler. *Journal of Parasitology*, 2003. p. 388–391. Disponível em: http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCcQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FSusanne_Akesson%2Fpublication%2F10748118_Temporal_and_spatial_variation_of_hematozoans_in_Scandinavian_willow_warblers%2Flinks%2F0f317533407fbb5c44000000.pdf&ei=Z77CVIm1MOaBsQS2jIDYAQ&usg=AFQjCNHd3qhXYMl8PwYumWoycLjGpvpYag&bvm=bv.84349003,d.cWc. Acesso em: 23/01/2015.

CHRISTE, P; ARLETTAZ, R. & VOGEL, P. Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle and immuno competence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecology Letters*. 2000. p. 207-212. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1461-0248.2000.00142.x/abstract>. Acesso em: 03/02/2015.

CLAYTON, D. H. Coevolution of avian grooming and ectoparasite avoidance. In: LOYE, J. E. e ZUK, M. (eds.). Bird parasite interactions: ecology, evolution and behaviour. Oxford University Press, 1991. p. 258-289. Disponível em <http://darwin.biology.utah.edu/PubsHTML/PDF-Files/BC1.pdf>. Acesso em: 23/01/2015.

DEVICHE, P; GREINER, E. C. E MANTECA, X. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *Journal of Experimental Zoology*, 2001. p.289: 456-466, Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jez.1027/abstract>. Acesso em: 12/08/2014.

E.R. (Eds.). Diseases of amphibians and reptiles. New York: Plenum Publishing, 1984. p.385-517.

FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; BERMINGHAM, E. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. **J Parasitol**, St. Louis, v. 89, n. 5, p. 1044–1047, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627154>. Acesso em: 24/09/2015.

FECCHIO, A; MÂRINI, M. A. and BRAGA, É. B. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. *Neotropical Biology and Conservation*, 2007. p. 127-135. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/238753620_Baixa_prevalencia_de_hemoparasitos_em_aves_silvestres_no_Cerrado_do_Brasil_Central_Low_prevalence_of_blood_parasites_in_Cerrado_birds_Central_Brazil. Acesso em: 03/02/2015.

GARVIN, M.C., HOMER B.L., and GREINER E.C. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *J. Wildl. Dis*, 2003. p. 161–169. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12685080> Acesso em: 23/01/2015.

HELLGREN, Olof.; WALDENSTROM, Jonas.; BENSCH, Staffan. A new pcr assay for simultaneous studies of leucocytozoon, Plasmodium, and haemoproteus from avian blood. **J Parasitol**, Lund, v. 90, n. 4, p.797–802, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357072>. Acesso em: 24/09/2015.

LAFERTY, K. DE MORRIS, K. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. *Ecology*, 1996. p. 77: 1390-1397. Disponível em: http://homes.msi.ucsb.edu/~lafferty/Publications/Parasitesbehavior_files/Laff%26Morr.96.Ecol.pdf. Acesso em: 12/08/2014.

LAINSON, R; SHAW, J. J and HUMPHREY, P. S. Preliminary survey of the blood parasites of birds of the area de pesquisas ecológicas Guamá. *Journal of Parasitology*, 1970. p. 197-8.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

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., R. N. M. SEHGAL, H.I. JONES, AND T. B. SMITH. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology*, 2002. p.819–822. Disponível em: <http://www.environment.ucla.edu/ctr/research/Inf-Diseases/Richard-Para-PCR-based-2002.pdf>. Acesso em: 23/01/2015.

MAKSIMOWICH, D.S.; E MATHIS, A. Parasitized salamanders are inferior competitors for territories and food resources. *Ethology*. 106: 319-329, 2000. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0310.2000.00526.x/abstract>. Acesso em: 12/08/2014.

MARCONDES, C. B. - Entomologia médica e veterinária. 2ª edição. São Paulo, Editora Atheneu, 2011. 526 p. ilus. ISBN 978-85-388-0183-2.

MOYER, B. R; DROWN, D. M. & CLAYTON, D. H. Low humidity reduces ectoparasite pressure: implications for host life history evolution. *Oikos*. 97: 223-228.

Nimer, E. 1979. Climatologia do Brasil: recursos naturais e meio ambiente. IBGE, Brasília-DF, 2002.p. 420. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0706.2002.970201.x/abstract>. Acesso em: 03/02/2015.

POULIN, R. Group-living and infestation by ectoparasites in passerines. *the condor*, 1991. p. 418-423.

SCOTT, M. E. The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Conservation Biology*. 1988. p. 2:40-56. Disponível em: <https://www.nceas.ucsb.edu/~sjryan/PPP/readings/Scott,%201988.pdf>. Acesso em: 12/08/2014.

SEBAIO, F. Hemoparasitos em Aves de Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais. Brasília. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. p. 56. Disponível em:http://pos.icb.ufmg.br/pgecologia/dissertacoes/D123_Fabiane_Sebaio.pdf Acesso em: 03/02/2015.

SHELDON, B. C; E VERHULST, S. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 1996. 11:317-321. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21237861>. Acesso em: 12/08/2014.

TOMÁS, A. Rastreo parasitológico em aves selvagens de zonas periurbanas do Litoral e Interior de Portugal. Lisboa. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2014.

VALKIUNAS, G. Pathogenic influence of haemosporidians and trypanosomes on wild birds in the field conditions: Facts and hypothesis. *Ekologija*:47-60. 1997. *Bird Haemosporida*. Institute of Ecology, Vilnius, Lithuania, 1993. p. 608. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-7-415.pdf> Acesso em: 23/01/2015.

VAN RIPER, C. III; VAN RIPER, S. G; GOFF, M. L. & LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs*. 1986. p. 327-344. Disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1942550?sid=21105771597323&uid=4&uid=2&uid=70&uid=3737664&uid=2129>. Acesso em: 03/02/2015.

WALDENTROM, J; BENSCH, S; KIBOIS; HASSELQUIST, D; E OTTOSSON, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory song bird in Africa. *Molecular Ecology*, 2002. p. 1545-1554. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144673>. Acesso em: 23/01/2015

3.0 Referências Bibliográficas da Introdução Geral

- ADLARD, R. D; PEIRCE, M. A. e LEDERER, R. New species of *Leucocytozoon* from the avian families Otidae, Pogaridae and Threskiornithidae. *Journal of Natural History*, 2002. n.36, p.1261–1267. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/toc/tnah20/36/11#.Uogh2PzvIU>. Acesso em 12/08/2014.
- AL-DABAGH, M. A. Mechanisms of Death and Tissue Injury in Malaria. Shafik Press, Baghdad, Iraq. 1966. Disponível em: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19672203496.html;jsessionid=97488329F181D7873684EA5E7CF685B4>. Acesso em 12/08/2014.
- ALTIZER, S; FOUFOPOULOS, J; GAGER, A. Diseases and conservation. *Encyclopedia of Biodiversity*. Vol 2, Academic Press, 2001. p. 109-126. Disponível em: <http://store.elsevier.com/Encyclopedia-of-Biodiversity/isbn-9780123847195/>. Acesso em 24/01/2015.
- ATKINSON, C. T; DUSEK, R. J; WOODS, K. L; and IKO, W. M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wild life Diseases*, 2000. p. 36:197–204. Disponível em: <http://www.usgs.gov/ecosystems/pierc/assets/pathogenicity-of-malaria-in-amakihi.pdf>. Acesso em 24/01/2015.
- ATKINSON, C. T; FORRESTER, D. J; GRESINER, E. C. Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (protozoa: Haemosporina) in Florida: seasonal transmission and vector abundance (protozoa: Haemosporina) in Florida: seasonal transmission and vector abundance. *Journal of Medical Entomology*, 1988a. P. 45-51. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128662>. Acesso em 24/01/2015.
- ATKINSON, C. T; FORRESTER, D. J; and GREINER, E. C. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Parasitology*, 1988b. p.228–239. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128652>. Acesso em 23/01/2015
- ATKINSON, C.T. (2008). *Haemoproteus*. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas & D.B. Hunter (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds Iowa*: Wiley-Blackwell. p. 13-34.
- BENNETT, G. F; EARLE, R. A., and PIERCE, M. A. The Leucocytozoidae of South African BENNETT, G. F; EARLE, R. A. e PEIRCE, M. A. New species of avian Hepatozoon (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and a redescription of *Hepatozoon neophrontis* (Todd and Wolbach, 1912) Wenyon 1926. *Systematic Parasitology*, 1992. n.23, p.183–193. Disponível em: http://reference.sabinet.co.za/sa_epublication_article/wild_v25_n1_a1. Acesso em 23/01/2015
- BENNETT, G. F; EARLE, R. A; PEIRCE, M. A; HUCHZERMEYER, F.W. e SQUIRES-PARSONS, D. Avian Leucocytozoidae: the leucocytozoids of the Phasianidae sensu lato. *Journal of Natural History*, 1991. n.25, p.1407–1428. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939100770891#preview>. Acesso em 23/01/2015

- BENNETT, G. F; PEIRCE, M. A. Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890. Journal of Natural History 22, 1683–1696, 1988. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222938800771061?journalCode=tnah20#preview>. Acesso em: 12/08/2014.
- CARMONA, M; FINOL, H. J; MARQUEZ, A; and NOYA, O. Skeletal muscle ultrastructural pathology in Serinus canaries infected with *Plasmodium cathemerium*. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1996. p. 28:87–91. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929630>. Acesso em 24/01/2015.
- CARTER T, A; NANCY, J, T; HUNTER , D, B. Parasitic Diseases of Wild Birds. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780813804620>. Acesso em 24/01/2015.
- CLAYTON, D. H; BUSH, S. E; GOATES, B.M; E JOHNSON, K. P. Host defense reinforces host-parasite cospeciation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100:15694-15699. Disponível em: <http://darwin.biology.utah.edu/PubsHTML/PubsListing.html>. Acesso em: 12/08/2014.
- CLAYTON, D. H. Coevolution of avian grooming and ectoparasite avoidance. In: LOYE, J. E. e ZUK, M. (eds.). Bird parasite interactions: ecology, evolution and behaviour. Oxford University Press, 1991. p. 258-289. Disponível em <http://darwin.biology.utah.edu/PubsHTML/PDF-Files/BC1.pdf>. Acesso em: 23/01/2015.
- COATNEY, G. R. Relapse and associated phenomena in the *Haemoproteus* infection of the pigeon. American Journal of Hygiene, 1933. p. 18:133–160. Disponível em: <http://aje.oxfordjournals.org/content/18/1/133.extract>. Acesso em 24/01/2015.
- DESSER, S. S and RYCKMAN, A. K. The development and pathogenesis of *Leucocytozoon simondi* in Canada and domestic geese in Algonquin Park, Ontario. Canadian Journal of Zoology, 1976. p.634–643. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z76-075>. Acesso em 24/01/2015
- DESSER, S. S. Schizogony and gametogony of *Leucocytozoon simondi* and associated reactions in the avian host. Journal of Protozoology, 1967. p.244–254. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1967.tb01992.x/abstract>. Acesso em 23/01/2015.
- EVANS, M and OTTER, A. Fatal combined infection with *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*). The Veterinary Record. Newport: *Vet Rec*, 1998. p. 143:72–76. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717222>. Acesso em 23/01/2015.
- FALLIS, A. M; AND D. M. WOOD. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as intermediate hosts for *Haemoproteus* of ducks. Canadian Journal of Zoology, 1957.

35:425–435. Disponível em: Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as intermediate hosts for *Haemoproteus* of ducks. Acesso em 23/01/2015

- FALLON, S. M; BERMINGHAM, E; RICKLEFS, R.E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites; a regional analysis in the Lesser Antilles. *American Naturalist*, 2005. 165: 466-480. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/7943467_Host_specialization_and_geographic_localization_of_avian_malaria_parasites_a_regional_analysis_in_the_Lesser_Antilles. Acesso em 02/07/2014.
- FORRESTER, D; ELLIS C. G. *Leucocytozoonosis*. In: *Parasitic Diseases of Wild Birds*. 1988
- GARNHAM P. C. C. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Sci. Public.
- GARNHAM, P. C. C. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 1966. p. 1114. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/157/3792/1029.2.citation>. Acesso em 23/01/2015
- GARVIN, M. C; HOMER, B. L; GREINER, E. C. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in Blue Jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Wild life Diseases*: 2003. p. 39:161–169. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/10814243_Pathogenicity_of_Haemoproteus_danilewskyi_Kruse_1890_in_blue_jays_%28Cyanocitta_cristata%29. Acesso em 23/01/2015
- HAMILTON, W. D.; AND M. ZUK. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science* 218:384–387,1982. Disponível em: <http://www.eko.uj.edu.pl/ekolewol/Hamilton%20and%20Zuk%201982.pdf>. Acesso em: 12/08/2014.
- HUCHZERMEYER, F. W. Avian pulmonary hypertension syndrome IV. Increased right ventricular mass in turkeys experimentally infected with *Plasmodium durae*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Researc*, 1988. p. 55 (2):107–108. Disponível em: <http://repository.up.ac.za/handle/2263/42333>. Acesso em 23/01/2015
- KHAN, R. A; and FALLIS; A. M. Comparison of infections with *Leucocytozoon simondi* in black ducks (*Anas rubripes*), mallards (*Anas platyrhynchos*), and white Pekins (*Anas boschas*). *Canadian Journal of Zoology* 46, 1968. p.773–780. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z68-107#.VMM1hy5qOMI>. Acesso em 23/01/2015
- LEVINE, N. D. e CAMPBELL, G. R. A check-list of the species of the genus *Haemoproteus* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *J. Protozool*, 1971. n.18, p.475-484. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03358.x/abstract>. Acesso em: 12/08/2014.
- MALEY, G. J. M; and DESSER, S. S. Anemia in *Leucocytozoon simondi* infections. I. Quantification of anemia, gametocytemia, and osmotic fragility of erythrocytes in naturally infected Pekin ducklings. *Canadian Journal of Zoology*: 1977, p. 55:355–358. Disponível em:

http://www.researchgate.net/publication/22740206_Anemia_in_Leucocytozoon_simondi_infections_I_Quantification_of_anemia_gametocytemia_and_osmotic_fragility_of_erythrocytes_in_naturally_infected_Pekin_ducklings. Acesso em 23/01/2015

- MARQUES, S.M.T; QUADROS, R.M; SILVA C.J; BALDO M.Parasites of pigeons (*Columbalivia*) in urban areas of lages, Southern Brazil. Rev Eletr Enf, 2007. 62: 183 – 187. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071777122007000200014&script=sci_arttext. Acesso em 04/02/2014.
- MASSEY, J. G; GRACZYK, T. K; and CRANFIELD, M. R. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in naïve Hawaiian Crows (*Corvus hawaiiensis*) in Hawaii. *Journal of Parasitology*, 1996. p. 82:182–185. Disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/3284139?sid=21105144873901&uid=2&uid=2129&uid=70&uid=4>. Acesso em 23/01/2015
- MCCALLUM, H. E DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, 1995. p.10: 190-194. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534700890503>. Acesso em 02/07/2014.
- MUTLOW, A; Forbes, N. *Haemoproteus* in Raptors: Pathogenicity, Treatment and Control. Landsdown Veterinary Surgeons, Wallbridge: England, 1999.
- NEWBERNE, J. W. Studies on the histopathology of *Leucocytozoon simondi* infection. *American Journal of Veterinary Research* 1957. p.191–199. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13394842>. Acesso em 24/01/2015.
- OTS, I; and HÖRAK, P. Health impact of blood parasites on breeding great tits. *Oecologia: Springer-Verlag*, 1998. p. 116:441–448. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004420050608>. Acesso em 23/01/2015
- PADOVEZI, G. C. *Haemoproteus* sp. e *Plasmodium* sp. EM POMBOS DOMÉSTICOS (*Columba livia domestica*): REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E RELATO DE CASO, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://qualittas.com.br/uploads/documentos/Haemoproteus%20sp.%20e%20Plasmodium%20sp.%20em%20Pombos%20Domesticos%20%20Graziella%20Cardoso%20Padovezi.pdf>, Acesso em: 10/06/2014.
- PEIRCE, M. A. Haematozoa of Zambian birds. I. General survey. *Journal of Natural History*, 1984. p. 18:105–122. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222938400770111?journalCode=tnah20#previiew>. Acesso em 23/01/2015
- PEIRCE, M. A. Order Haemospororida Danilewsky, 1885. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, Vol. 1, 2nd ed., J. J. Lee, G. F. Leedale, and P. Bradbury (eds). Society of Protozoologists, Lawrence, KS, 2000. p. 339–347. Disponível em: <http://www.amazon.com/Illustrated-Guide-Protozoa-Second-Edition/dp/1891276239>. Acessado em: 24/01/2015.

- PEIRCE, M. A; BENNETT, G. F. e BISHOP, M. The haemoproteids of the avian order Falconiformes. *Journal of Natural History*, 1990. n.24, p.1091–1100. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939000770681#preview>. Acesso em:12/08/2002.
- PEIRCE, M. A; GREENWOOD, A. G. and SWINNERTON, K. Pathogenicity of *Leucocytozoon marchouxi* in the Pink Pigeon (*Columba mayeri*) in Mauritius. *Veterinary Record*, 1997. n.140, p.155–156. Disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/140/6/155.citation>. Acessado em: 12/08/2014.
- PEIRCE, M. A; GREENWOOD, A. G; and SWINNERTON, K. Pathogenicity of *Leucocytozoon marchouxi* in the pink pigeon (*Columba mayeri*) in Mauritius. *Veterinary Record*, 1997. p. 140:155–156. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050179>. Acessado em: 24/01/2015.
- PEIRCE, M. A; LEDERER, R; ADLARD, R. D; and O'DONOGHUE P. J. Pathology associated with endogenous development of haematozoa in birds from southeast Queensland. *Avian Pathology*: 2004. p. 33:445–450 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15370043> Acessado em: 24/01/2015.
- PEIRCE, M.A; BENNETT, G.F; BISHOP, M. The haemoproteids of the avian order Falconiformes. *Journal of Natural History* 24: 1990. p.1091–1100. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939000770681#preview>. Acessado em: 24/01/2015.
- PHILLIP, C; WAYNE S, J. B; SHANE, R. R. Atlas of Clinical Avian Hematology. Medical business to form Wiley-Blackwell. 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, United Kingdom, Iowa, 2009. 50014-8300, USA. Disponível em: http://samples.sainsburysebooks.co.uk/9781444316193_sample_381320.pdf. Acesso em:24/01/2015.
- RICKLEFS, R. E; and SHELDON K. S. Malaria prevalence and white blood cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. *The Auk*, 2007. p. 124:1254–1266. Disponível em:<http://www.jstor.org/discover/10.2307/25150386?sid=21105147116461&uid=70&uid=4&uid=2&uid=2129>. Acesso em:24/01/2015.
- SANTOS, J. L. C; MAGALHÃES, N. B; SANTOS, H. A; RIBEIRO, R. R; GUIMARÃES, M. P. Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra do Cipó National Park, Brazil: Parasitos de canídeos domésticos e silvestres na região do Parque Nacional da Serra do Cipó – Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 2012.v. 21, n. 3, p. 270-277, Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v21n3/v21n3a16.pdf>. Acesso em 02/07/2014.
- SAVAGE, A.F.; ARIEY, F. & GREINER, E.C. *Leucocytozoon atkinsoni* sp. (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the avian family Timaliidae. *Systematic Parasitology*, 2006. v.64, p. 105–109. Disponível em: http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F166887_Leucocytozoon_atkinsoni_n._sp._%28Apicomplexa_Leucocytozoidae%29_from_the_avian_family_Timal

idae%2Ffile%2F5046351d6bcb977a16.pdf&ei=BhPqU8TYNKPLsATB1oG4Ag&usg=AFQjCNH8nMwHe7SJbes60WLfhT6rDLXkhQ&bvm=bv.72676100,d.cWc. Acesso em 12/08/2014.

- SIMPSON, V. R. *Leucocytozoon*-like infection in parakeets, budgerigars and a common buzzard. *Veterinary Record*, 1991. p. 129:30–32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1926686>. Acesso 24/01/2015.
- SOULSBY, E. J .L. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, 7th edn. Baillière Tindall, London, 1982. Disponível em: <http://www.amazon.com/Helminths-Arthropods-Protozoa-Domesticated-Animals/dp/0812107802>. Acesso 24/01/2015.
- TARELLO, W. *Leucocytozoon* toddy in falcons from kuwait: epidemiology, clinical signs and response to melarsomine. parasite, 2006. P. 13:179. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16800128>. Acesso 24/01/2015.
- TELFORD, JR; SAM, R. Reptilian hemoparasites. In: HOFF, G.L.; FRYE, F.L; JACOBSON, 1984. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9781420080407>. Acesso 24/01/2015.
- VALKIUNAS, G. *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, New York, 2005. Disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/20061291?uid=3737664&uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21104581481003>. Acesso em: 12/08/2014.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. French: CRC Press, 2005.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. imagem xxxxxx Figure 2 Vector of haemoproteids, the biting midge *Culicoides nubeculosus* e Vector of haemoproteids, the blood-sucking hippoboscid fly *Pseudolynchia canariensis*: Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 20. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. imagem Figure 1 Diagrammatic representation of the life cycle of bird haemoproteids (*Haemoproteus mansonias* an example): Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 19. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. imagem Figure 17 Vector of leucocytozoids, blood-sucking simuliid fly. A general view (modified from Rubtsov and Yankovsky, 1984): Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 37. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.
- VALKIUNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. imagem Figure 18 Diagrammatic representation of the life cycle of leucocytozoids: Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 38. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.

- VALKIUNAS, G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. imagem Figure 10 Vector of bird malaria, the mosquito *Culex pipiens*: Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 28. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.
- VALKIUNAS, G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. imagem Figure 11 Diagrammatic representation of the life cycle of bird malaria parasites (*Plasmodium relictumas* an example: Institute of Ecology Vilnius University Lithuania. Russian and French. 2005. p. 29. Disponível em: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780415300971>. Acesso 24/01/2015.
- VANRIPER, C; ATKINSON, III. C. T; and SEED, T. M. Plasmodia of birds. In Parasitic Protozoa, Vol. 7, J. P. Kreier (ed.). Academic Press, New York, 1994. p. 73–140. Disponível em: <https://www.fort.usgs.gov/products/2746>. Acesso 24/01/2015.
- VANRIPER, C; VAN RIPER, S. G; GOFF, M. L; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecological Monographs. 1986. p. 327-344. Disponível em: http://charlesvanriper.com/gallery/cartimages/pdf/epizootiology_ecological.pdf. Acesso em 02/07/2014.
- WALDENTROM, J; BENSCH, S; KIBOIS; HASSELQUIST, D; E OTTOSSON, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory song bird in Africa. Molecular Ecology, 2002. p. 1545-1554. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144673>. Acesso em: 23/01/2015.
- WILLIAMS, R. B. Avian malaria: Clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. Avian Pathology, 2005. p. 34:29–47. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763737>. Acesso 24/01/2015.
- WILLIAMS, R. B. Biliverdin production in chickens infected with the malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. Avian Pathology, 1985. p. 14:409–419. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18766933>. Acesso 24/01/2015.
- WOBESER, G. A. Diseases of Wild Waterfowl, 2nd ed. Plenum Press, New York: 1997.

