

RAFAEL OTÁVIO CANÇADO MOTTA

***MALÁRIA AVIÁRIA EM CRACÍDEOS: INFLUÊNCIAS SOBRE A
HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SANGUÍNEA E PERFIL ELETROFORÉTICO
DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS***

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2011

RAFAEL OTÁVIO CANÇADO MOTTA

***MALARIA AVIÁRIA EM CRACÍDEOS: INFLUÊNCIAS SOBRE A
HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SANGUÍNEA E PERFIL ELETROFORÉTICO
DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia

Orientadora: Prof^a Érika Martins Braga

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2011

043

Motta, Rafael Otávio Cançado.

Malária aviária em cracídeos: influências sobre a hematologia, bioquímica sanguínea e perfil eletroforético de proteínas plasmáticas [manuscrito] / Rafael Otávio Cançado Motta. – 2011.

139 f. : il. ; 29,5 cm

Orientadora: Érika Martins Braga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. Cracídeos. 2. Plasmodium - Teses. 3. Hematologia – Teses. 4. Bioquímica plasmática. 5. Esfregaço sanguíneo. 6. Reação em cadeia de polimerase. 7. Parasitologia. I.Braga, Érika Martins.II. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. III. Título.

CDU: 576.88/.89

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de Doutorado/2007-2011) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo número CBB 625/06.

Este projeto foi autorizado pelo IBAMA/ICMBio (autorização nº 19964-1) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA – UFMG (Parecer número ETIC 228/08 de 12/11/08).

*À Cacá minha maior paixão, meu ar, meu norte,
meu centro...*

*À Malu pedacinho de mim que me faz uma pessoa
melhor a cada dia...*

"O animal, ao nascer, traz consigo uma trama de instintos capazes de costurá-lo ao meio que o rodeia. (...) Tendo vindo de casa – do útero – ele continua em casa, já que o Cosmo é sua casa. Ele marcha para o real e se conecta a ele, sem precisar simbolizá-lo. Ao animal, não lhe falta nada. A leitura que faz do mundo corresponde, simetricamente, à estrutura de suas necessidades. O mundo é a concha que o envolve e na qual ele se perde, extático. O animal faz, desde o nascimento, uma experiência de pertinência cósmica que o torna parte do real, íntimo do coração da matéria, filho dileto – e inocente de Deus."

Hélio Pellegrino

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Timoshenko e Vera: sem vocês nada seria possível. Obrigado por todo amor, confiança, paciência e apoio em todos os momentos. Espero que algum dia eu consiga retribuir tudo o que fazem por mim.

Aos meus irmãos, Marcelo e Renato, meus melhores amigos e confidentes, presentes em todas as felicidades e dificuldades. Obrigado por estarmos sempre juntos.

À Cacá meu amor, que faz de meus dias os melhores dias da minha vida. Obrigado pelo carinho, compreensão, força e alegrias.

À minha orientadora Érika, exemplo de professora e pesquisadora, obrigado pela amizade, paciência, determinação e inspiração. Agradeço também por confiar em mim e pela certeza de que um dia eu terminaria minha tese.

À Marília, ao meu lado desde a graduação, obrigado pela confiança, pelos ensinamentos e por me acolher em seu laboratório sem restrições.

À Carla e à Ana, muito obrigado pela amizade e pela ajuda indispensável ao processamento das amostras.

Ao professor Nelson e ao colega Marcus, sempre dispostos a ajudar, obrigado pelas importantes contribuições a este trabalho.

Aos grandes amigos da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Marcelo, Ângela, Carlyle e Herlandes, pela confiança total e por me fazerem sentir em casa.

A toda equipe do Laboratório de Patologia clínica veterinária da PUC–Poços de Caldas. Muito obrigado pela confiança e por disponibilizar todo o aparato laboratorial, sem o qual não seria possível desenvolver este trabalho.

Ao Sr. Moacir Dias, do Criatório Poços de Caldas, por possibilitar a realização das coletas fundamentais ao desenvolvimento deste estudo.

Ao Sr. Roberto Azeredo, pelos preciosos conhecimentos, pelas boas conversas nas manhãs de coleta e por permitir a realização do trabalho na CRAX.

Aos colegas de laboratório Lilian, Cristiane, Nayara, Gabriel, Rodrigo e especialmente à Patrícia, pela grande ajuda e amizade.

À Sumara, por sempre ajudar nos percalços da burocracia acadêmica.

A todos os professores e colegas do Departamento de Parasitologia, obrigado pelos ensinamentos e pelo apoio.

À Banda Mandrix, especialmente ao Leozinho. Obrigado pela longa amizade, pelo velho e bom Rock n' Roll e pelos momentos de diversão necessários para seguir em frente.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1. <i>Crax blumenbachii</i>	18
1.1.1. Introdução.....	18
1.1.2. Morfologia	20
1.1.3. Comportamento	21
1.1.4. Alimentação.....	21
1.1.5. Reprodução.....	22
1.2. <i>Crax fasciolata</i>	23
1.2.1. Introdução.....	23
1.2.2. Morfologia	24
1.2.3. Comportamento	25
1.2.4. Reprodução.....	25
1.3. <i>Aburria jacutinga</i>	26
1.3.1. Introdução.....	26
1.3.2. Morfologia	27
1.3.3. Comportamento	27
1.3.4. Reprodução.....	27
1.4. Malaria aviária.....	27
1.4.1. <i>Plasmodium</i> spp.....	29
1.4.2. Ciclo biológico	30
1.4.3 Patologia da malária aviária	32
1.4.4. Diagnóstico.....	33
1.4.4.1. Esfregaço sangüíneo	33
1.4.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
1.5. Hematologia e bioquímica plasmática.....	35
1.5.1. Hemograma de aves.....	35
1.5.1.1. Eritrograma.....	36
1.5.1.1.1. Eritrócitos aviários.....	36
1.5.1.2. Leucograma	37
1.5.1.2.1. Linfócitos.....	37
1.5.1.2.2. Monócitos	38
1.5.1.2.3. Granulócitos.....	38
1.5.1.2.3.1. Heterófilos	38

1.5.1.2.3.2. Eosinófilos	39
1.5.1.2.3.3. Basófilos	39
1.5.1.3 Contagem de trombócitos.....	39
1.5.1.3.1. Trombócitos.....	40
1.5.2. Bioquímica plasmática de aves.....	41
1.5.2.1. Avaliação da função hepática em aves	41
1.5.2.1.1. Aspartato Aminotransferase	41
1.5.2.1.2. Alanina aminotransferase	42
1.5.2.1.3. Lactato desidrogenase.....	42
1.5.2.1.4. Fosfatase alcalina.....	43
1.5.2.2. Avaliação da função renal em aves	43
1.5.2.3. Glicose	44
1.5.2.4. Eletrólitos.....	44
1.5.2.5. Proteínas plasmáticas.....	45
1.5.2.5.1 Fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas	46
1.5.3. Alterações hematológicas e bioquímicas em aves parasitadas por hemoparasitos	47
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1. Aspectos éticos	52
4.2. Áreas de estudo e amostras.....	52
4.3. Contenção física	54
4.4. Coleta de material para análise.....	54
4.5. Esfregaço sangüíneo	54
4.6. Hemograma	55
4.7. Extração de DNA.....	55
4.8. Amplificação do gene estrutural 18 S rRNA.....	56
4.9. Amplificação do gene mitocondrial SSU	57
4.10. Mensurações plasmáticas	58
4.10.1. Bioquímica plasmática	58
4.10.2. Eletroforese de proteínas plasmáticas.....	58
4.11. Análise dos dados	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Determinação da prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em <i>C. blumenbachii</i> , <i>C. fasciolata</i> e <i>A. jacutinga</i> em cativeiro.....	60
5.1.1. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em <i>C. blumenbachii</i>	61
5.1.2. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em <i>C. fasciolata</i>	62

5.1.3. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em <i>A. jacutinga</i>	63
5.2. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. blumenbachii</i> , comparações entre aves positivas e negativas para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	64
5.2.1. Comparações entre os valores médios do eritrograma de <i>C. blumenbachii</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	64
5.2.2. Comparações entre os valores médios do leucograma de <i>C. blumenbachii</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	67
5.2.3. Comparações entre os valores médios de trombócitos de <i>C. blumenbachii</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	73
5.2.4. Comparações entre os parâmetros bioquímicos de <i>C. blumenbachii</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	74
5.2.5. Eletroforese das proteínas plasmáticas: comparações dos valores das frações protéicas de <i>C. blumenbachii</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	82
5.3. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. fasciolata</i> , comparações entre aves positivas e negativas para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	84
5.3.1. Comparações entre os valores médios do eritrograma de <i>C.fasciolata</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	84
5.3.2. Comparações entre os valores médios do leucograma de <i>C. fasciolata</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	88
5.3.3. Comparações entre os valores médios de trombócitos de <i>C. fasciolata</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	92
5.3.4. Comparações entre os parâmetros bioquímicos de <i>C. fasciolata</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	92
5.3.5. Eletroforese das proteínas plasmáticas: comparações dos valores das frações protéicas de <i>C. fasciolata</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	100
5.4. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas séricas de <i>A. jacutinga</i> , comparações entre aves positivas e negativas para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	103
5.4.1. Comparação entre os valores médios do eritrograma e leucograma de <i>A. jacutinga</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	103
5.4.2. Comparação entre os parâmetros bioquímicos de <i>A. jacutinga</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	104
5.4.3. Eletroforese das proteínas séricas: comparações dos valores das frações protéicas de <i>A. jacutinga</i> positivos e negativos para infecção por <i>Plasmodium</i> spp.	104
5.5. Relação Heterófilo/Linfócito em <i>C. blumenbachii</i> , <i>C. fasciolata</i> e <i>A. jacutinga</i>	108
5.6. Relação Alb/Globulina em <i>C. blumenbachii</i> , <i>C. fasciolata</i> e <i>A. jacutinga</i>	110
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÕES	123
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação atual das populações de <i>C. blumenbachii</i>	19
Figura 2. Casal adulto de Mutum do Sudeste - <i>C. blumenbachii</i>	20
Figura 3. Indivíduos adultos de Mutum de penacho - <i>C. fasciolata</i>	24
Figura 4. Jacutinga, indivíduo adulto - <i>A. jacutinga</i>	27
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Plasmodium relictum</i>	31
Figura 6. Fracionamento eletroforético em gel de agarose	47
Figura 7. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em machos e fêmeas de <i>C. blumenbachii</i>	61
Figura 8. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em machos e fêmeas de <i>C. fasciolata</i>	62
Figura 9. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em machos e fêmeas de <i>A. jacutinga</i>	63
Figura 10. Variação anual e comparações dos valores de Ht, Eritrócitos e Hb entre <i>C. blumenbachii</i>	66
Figura 11. Variação anual e comparações dos valores de leucócitos entre <i>C. blumenbachii</i>	67
Figura 12. Variação anual e comparações dos valores de trombócitos entre <i>C. blumenbachii</i>	73
Figura 13. Variação anual e comparações dos valores de PPT, AST e ALT entre <i>C. blumenbachii</i>	75
Figura 14. Variação anual e comparações dos valores de AU, CREAT e Uréia entre <i>C. blumenbachii</i>	77
Figura 15. Variação anual e comparações dos valores de Ca, P e FA entre <i>C. blumenbachii</i>	79
Figura 16. Variação anual e comparações dos valores de LDH e Glicose entre <i>C. blumenbachii</i>	81
Figura 17. Variação anual e comparações dos valores de Ht, Eritrócitos e Hb entre <i>C. fasciolata</i>	87
Figura 18. Variação anual e comparações dos valores de leucócitos entre <i>C. fasciolata</i>	88
Figura 19. Variação anual e comparações dos valores de trombócitos entre <i>C. fasciolata</i>	92

Figura 20. Variação anual e comparações dos valores de PPT, AST e ALT entre <i>C. fasciolata</i>	94
Figura 21. Variação anual e comparações dos valores de AU, CREAT e Uréia entre <i>C. fasciolata</i>	96
Figura 22. Variação anual e comparações dos valores de Ca, P e FA entre <i>C. fasciolata</i>	98
Figura 23. Variação anual e comparações dos valores de LDH e Glicose entre <i>C. fasciolata</i>	99
Figura 24. Variação anual e comparações dos valores da relação Heterófilo/linfócito de <i>C. blumenbachii</i> e <i>C. fasciolata</i>	109
Figura 25. Comparação dos valores da relação heterófilo/linfócito de <i>A. jacutinga</i>	109
Figura 26. Variação anual e comparações dos valores da relação Albumina/Globulina de <i>C. blumenbachii</i> e <i>C. fasciolata</i>	111
Figura 27. Comparação dos valores da relação Albumina/Globulina de <i>A. jacutinga</i>	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação anual e comparações dos valores de Linfócitos e Heterófilos em <i>C. blumenbachii</i>	69
Tabela 2. Variação anual e comparações dos valores de Eosinófilos e Monócitos em <i>C. blumenbachii</i>	71
Tabela 3. Variação anual e comparações dos valores de Basófilos em <i>C. blumenbachii</i>	72
Tabela 4. Variação anual e comparações dos valores do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. blumenbachii</i> machos..	83
Tabela 5. Variação anual e comparações dos valores do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. blumenbachii</i> fêmeas...	84
Tabela 6. Variação anual e comparações dos valores de Linfócitos e Heterófilos em <i>C. fasciolata</i>	90
Tabela 7. Variação anual e comparações dos valores de Eosinófilos e Monócitos em <i>C. fasciolata</i>	91
Tabela 8. Variação anual e comparações dos valores do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. fasciolata</i> machos	101
Tabela 9. Variação anual e comparações dos valores do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>C. fasciolata</i> fêmeas	102
Tabela 10. Comparações dos valores do eritrograma e leucograma de <i>A. jacutinga</i>	104
Tabela 11. Comparações dos parâmetros bioquímicos de <i>A. jacutinga</i> ..	106
Tabela 12. Comparações dos valores do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de <i>A. jacutinga</i>	107

RESUMO

A família Cracidae, na qual estão incluídas as espécies *Crax blumenbachii* (Mutum do sudeste), *Crax fasciolata* (Mutum de penacho) e *Aburria jacutinga* (Jacutinga), corresponde ao taxon de aves mais ameaçado de extinção das Américas. Nosso trabalho constitui o primeiro estudo a determinar a prevalência de *Plasmodium* spp. e avaliar a influência da malária aviária na hematologia, bioquímica sanguínea e perfil eletroforético de proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*. Foram coletadas amostras sanguíneas de 42 espécimes de *Aburria jacutinga*, 41 de *C. blumenbachii* e 21 de *C. fasciolata* e nas duas últimas foram realizadas quatro coletas seqüenciais durante um ano. Utilizamos, em paralelo, a análise microscópica de esfregaços sanguíneos bem como a amplificação dos genes estrutural 18S rRNA e mitocondrial SSU de *Plasmodium* spp. para o diagnóstico da infecção por *Plasmodium* spp. A prevalência média encontrada em *C. blumenbachii* foi de 18,3% para machos e 12,5% para fêmeas; em *C. fasciolata* a média foi de 18,2% em machos e 20% em fêmeas. Em aves da espécie *A. jacutinga* as prevalências em machos e fêmeas foram de 52,65% e 34,8%, respectivamente. Notamos entre os cracídeos estudados a ocorrência de respostas fisiológicas distintas frente ao parasitismo por *Plasmodium* spp. Machos de *C. blumenbachii* demonstraram interferências negativas associadas ao parasitismo mais evidentes que as fêmeas com relação aos valores de hematócrito, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e contagem de leucócitos. Observamos para *C. fasciolata*, variações semelhantes às ocorridas em *C. blumenbachii* com relação ao eritrograma. Médias superiores na relação heterófilo/linfócito de *C. blumenbachii* parasitados também foram observadas. Diferenças significativas no perfil hematológico não foram observadas em *A. jacutinga*; contudo, perceptível tendência a médias inferiores de hematócrito e hemoglobina foi verificada nas fêmeas parasitadas. Constatou-se para esta espécie, média superior de leucócitos entre as fêmeas parasitadas, com elevação na contagem de monócitos. O parasitismo por *Plasmodium* spp. associou-se às elevações nas enzimas ALT e AST em ambas as espécies de *Crax*, porém, o mesmo não foi observado em *A. jacutinga*. Os machos de *C. blumenbachii* positivos

apresentaram valores de α_2 -globulina, β_1 -globulina e β_2 -globulina mais elevados que os não parasitados. O grupo de machos e fêmeas parasitados de *C. fasciolata* apresentou teores de albumina inferiores ao do grupo de animais não parasitados. Acreditamos que os dados gerados neste trabalho possam contribuir de forma significativa para o aperfeiçoamento das ações de conservação destas espécies ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: Cracídeos, *Plasmodium*, Hematologia, Bioquímica plasmática, esfregaço sanguíneo, PCR, parasitologia.

ABSTRACT

The Cracidae family, which includes the Red-Billed Curassow (*Crax blumenbachii*), Bare-faced Curassow (*Crax fasciolata*) and the Black-fronted Piping-guan (*Aburria jacutinga*) species, corresponds to the taxon of the most endangered birds of the Americas. This paper is the first study to determine the prevalence of *Plasmodium* spp. and evaluate the influence of avian malaria in hematology, blood biochemistry and plasma protein electrophoretic profile of *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* and *A. jacutinga*. Blood samples from 42 specimens of *Aburria jacutinga*, 41 of *Crax blumenbachii* and 21 of *Crax fasciolata* were collected and in the last two species, four sequential sampling were performed during one year. The average prevalence found in *C. blumenbachii* was of 18.3% for males and 12.5% for females; in *C. fasciolata* the average was of 18.2% in males and 20% in females. In the birds of the species *A. jacutinga*, the prevalence in males and females were 52.65% and 34.8%, respectively. It was noticed the occurrence of different physiological responses against the parasitism by *Plasmodium* spp. within the Cracids studied. The male individuals of *Crax blumenbachii* showed negative interferences associated with parasitism which were more evident than in the females with respect to the values of hematocrit, erythrocyte count, hemoglobin concentration and leukocyte count. Variations similar to those found in *C. blumenbachii* regarding hematology, were observed for *C. fasciolata*. Higher averages in heterophil/lymphocyte ratio of infected *C. blumenbachii* were also observed. Significant differences in the hematological profile were not observed in *A. jacutinga*, however, a noticeable trend to lower averages of hematocrit and hemoglobin was verified in parasitized females. It was found for this species, a higher average of leukocytes, with an increase in monocytes count within the parasitized females. The parasitism by *Plasmodium* spp. was associated with the elevations in ALT and AST enzymes in both species of *Crax*, however, the same was not observed in *A. jacutinga*. Infected males of *C. blumenbachii* showed higher values of α_2 -globulin, β_1 -globulin and β_2 -globulin than the non-infected ones. The group of males and females parasitized by *C. fasciolata* showed lower albumin levels when compared to the group of non-infected animals. We

believe that the data generated in this work can contribute significantly to the improvement of the actions for conservation of these endangered species.

Keywords: Cracids, *Plasmodium*, Hematology, Plasma biochemistry, Blood smear, PCR, Parasitology.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O entendimento das interações evolutivas advindas da relação parasito-hospedeiro requer a avaliação dos prejuízos causados por esses parasitos na história de vida do hospedeiro, tais como os efeitos sobre: crescimento, condição corporal, sucesso reprodutivo e sobrevivência (Madsen *et al.*, 2005). Os pesquisadores têm lançado mão de diversas metodologias diagnósticas - avaliação hematológica, análise da bioquímica plasmática, fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas, entre outras - a fim de se identificar, quantificar e qualificar as alterações fisiológicas determinadas pelos hemoparasitos em seus hospedeiros.

A família Cracidae pertence à ordem Galliformes e está distribuída entre onze gêneros, cinqüenta espécies e cerca de sessenta subespécies, incluindo os mutuns e as jacutingas (del Hoyo 1994). Segundo o livro vermelho de aves ameaçadas de extinção, o Mutum-do-sudeste, o Mutum Pinima e a Jacutinga, estão entre as espécies de cracídeos mais ameaçadas de extinção nas Américas (IUCN 2009).

1.1. *Crax blumenbachii* (Spix, 1825)

1.1.1. Introdução

O Mutum-do-sudeste - *Crax blumenbachii* - é um cracídeo endêmico da Mata Atlântica. Sua ocorrência abrangia, predominantemente, as florestas de baixada e de tabuleiros na região entre a cidade do Rio de Janeiro e o sul da Bahia, estendendo-se até as proximidades do Recôncavo e adentrando a região leste de Minas Gerais.

Diversos fatores contribuíram para a drástica redução da Mata Atlântica no século passado; entre eles, a intensa exploração de madeira de lei, a expansão da fronteira agrícola e da pecuária, a reforma agrária e a ocupação da terra por populações nativas (Rocha, 1995). Os fragmentos remanescentes de floresta sofreram degradação significativa pelo fogo, efeitos de borda e atividades antrópicas. As caças de subsistência e de lazer ainda exercem forte pressão sobre o *C. blumenbachii* e, possivelmente, tenham sido responsáveis

pela redução das populações isoladas de mutuns em fragmentos de floresta (Silva & Strahl, 1991; Peres, 2000).

O Mutum-do-sudeste, atualmente, é considerado como “globalmente em perigo” pela BirdLife International e pela IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais), com base na sua distribuição altamente fragmentada e em contínuo declínio em sua área de ocorrência (Figura 1), na sua área de ocupação, na qualidade do habitat remanescente e no número de indivíduos maduros. Estima-se que todas as sub-populações autóctones não somem mais do que duzentos e cinqüenta indivíduos adultos (IUCN/SSC/CBSG 1995; Birdlife International, 2000).

Crax blumenbachii compartilha parte ou a totalidade de sua área de distribuição com várias espécies consideradas ameaçadas no Brasil. Ações voltadas para a conservação de *C. blumenbachii* terão impactos positivos não apenas para os mutuns, mas também para outras espécies da fauna e da flora que compartilham seu habitat, muitas das quais não despertam o mesmo interesse. Isto resulta na possibilidade de uso de *C. blumenbachii* como uma espécie-bandeira para catalisar ações de conservação (IBAMA, 2003).

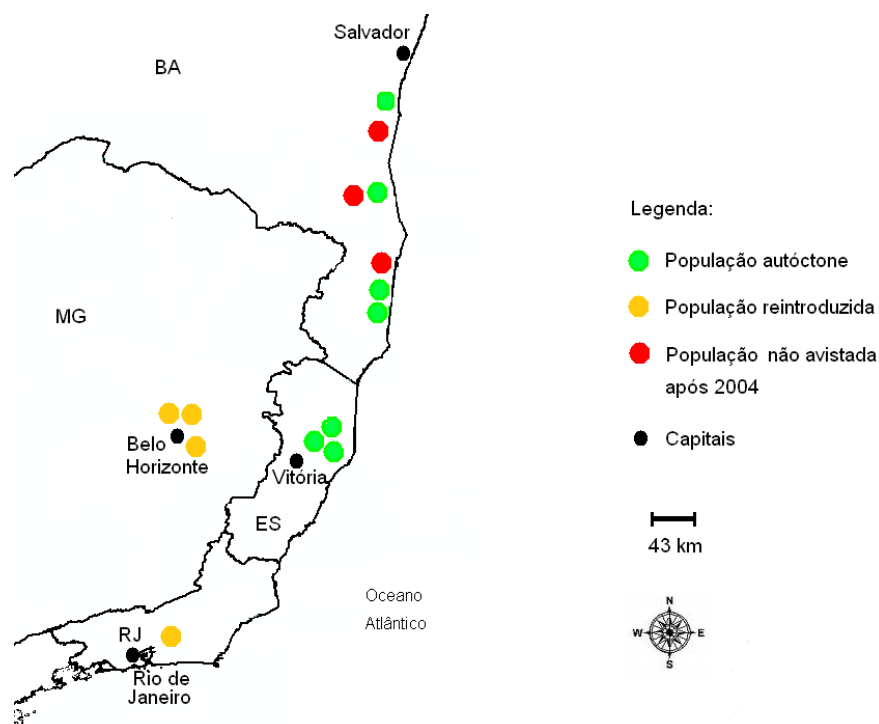


Figura 1. Situação atual das populações de *Crax blumenbachii*. Fonte: Adaptado de Bernardo (2010)

1.1.2. Morfologia



Figura 2. Casal adulto de Mutum do Sudeste - *Crax blumenbachii*. Macho à esquerda e fêmea à direita (Foto: Bernardo, 2011)

Crax blumenbachii é um cracídeo de grande porte e o seu comprimento total varia entre 80 e 93 cm; pode pesar cerca de 3 a 3,5 kg. A espécie apresenta dimorfismo sexual de plumagem e os machos são usualmente maiores que as fêmeas. Machos apresentam coloração de cabeça, pescoço, peito, dorso, asas e cauda em negro brilhante e as regiões do ventre e crisso brancos. Nos machos também é possível observar uma pequena crista negra composta de penas curvas. A cere apresenta coloração vermelho-alaranjada (caractere sexual secundário, carotenóide dependente) e pode desenvolver-se em carúncula nos machos mais velhos. Fêmeas apresentam a cere negra sem a presença de carúncula (Figura 2).

Na face inferior da mandíbula do macho, especialmente nos mais velhos, observa-se uma evidente elevação ventral, coberta pela cere vermelho-alaranjada. A região facial é desprovida de penas e apresenta coloração negra em ambos os sexos. Machos possuem bico negro e nas fêmeas não há presença de pigmentação. Fêmeas possuem coloração de íris laranja-avermelhado, enquanto nos machos a coloração varia entre o castanho e o marrom escuro.

As fêmeas, da mesma maneira que os machos, apresentam coloração de cabeça, peito, dorso, asas e cauda negras; o ventre e o crisso são de cor marrom acanelado. A crista das fêmeas assume coloração negra barrada de branco (Teixeira & Sick, 1981; Teixeira & Sick, 1986; Del Hoyo, 1994).

1.1.3. Comportamento

O Mutum-do-sudeste passa a maior parte do dia no solo em busca de alimento e empoleira-se para dormir ou em situações em que se sinta ameaçado. Quando acudados voam em trajetória quase vertical em direção a um poleiro com 3 a 4 metros de altura, o que torna a ave vulnerável a caçadores (Sick, 1970). A exemplo de outros cracídeos, a capacidade de vôo de *C. blumenbachii* é limitada; cansam-se rapidamente, não sendo capazes de vôos longos de mais de algumas poucas centenas de metros. As aves emitem um baixo “uuup” quando estão forrageando, aparentemente uma vocalização de contato. Quando perturbadas, emitem um pio mais agudo e um “ök-ök-ök”, quando fogem em direção as árvores. Os mutuns geralmente são vistos aos pares e já foram registrados grupos com quatro indivíduos, presumivelmente unidades familiares. Segundo Sick (1970), na natureza as fêmeas são mais abundantes do que os machos, provável resultado do canto dos machos (“ronco” ou “gemido”, em inglês “booming”) que os torna mais vulneráveis à caça.

1.1.4. Alimentação

Há poucas informações acerca da dieta de *C. blumenbachii* na natureza, sabe-se que estas aves alimentam-se de frutos carnosos e adocicados, além de sementes duras. Sua dieta também inclui pequenos invertebrados e folhas (Sick, 1970).

A alimentação básica das aves em cativeiro é composta de grãos complementados com rações comerciais peletizadas, frutas, verduras e suplementos minerais e vitamínicos (Azeredo, 1998).

1.1.5. Reprodução

Evidências indicam que *C. blumenbachii* é monogâmico na natureza, mas pode ser poligínico sob condições especiais, como no cativeiro ou em populações com grandes alterações na razão sexual. As fêmeas de *C. blumenbachii* atingem a maturidade sexual entre dois anos e meio a 3 anos. Fêmeas cativas permanecem férteis até os dezoito anos de idade. A longevidade do Mutum-do-Sudeste em cativeiro pode chegar a vinte e quatro anos, com uma expectativa média de vida em torno de quinze anos (Azeredo, 1998).

O ninho é construído em meio a emaranhados de galhos ou liana encontrados no local, podem ser construídos a até vinte metros de altura. O ninho é construído pelo macho, que atrai a fêmea para o mesmo (Sick, 1970). Durante a corte, o macho vocaliza intensamente nas proximidades do ninho para atrair a fêmea. O canto do macho é um “booming” profundo e de baixa frequência que, embora não seja alto, pode ser detectado a grandes distâncias. Segundo Sick (1970), a vocalização dos machos raramente era ouvida no período de dezembro a janeiro na região do Espírito Santo e o pico de vocalizações ocorria em meados de setembro a outubro. O macho realiza um “display” (dança) perante a fêmea que, se receptiva, permite a cópula. A fêmea acompanha o macho, que lhe oferece alimento, fato considerado como um indicador de compatibilidade entre as aves cativas. (Azeredo, 1998).

Na região de Belo Horizonte, a reprodução de aves cativas acontece no período de setembro a fevereiro e cada fêmea pode realizar até quatro posturas por temporada, caso os ovos sejam removidos para incubação artificial. A postura em cativeiro é em geral de dois ovos, com intervalos de quarenta e oito horas entre ambos. Posturas de reposição podem ocorrer de três a quatro semanas depois da perda de ovos. A incubação dos ovos é feita pela fêmea e dura cerca de trinta dias, durante a qual o macho se mantém à distância, nos arredores do ninho.

Os filhotes pequenos recebem cuidados tanto da fêmea quanto do macho, reforçando a evidência de que são aves monogâmicas (Azeredo, 1998).

1.2. *Crax Fasciolata* (Spix, 1825)

1.2.1. Introdução

Crax fasciolata (Mutum de Penacho) é amplamente distribuído por toda a América do Sul. Três subespécies são normalmente reconhecidas: *C. f. pinima* no nordeste brasileiro, *C. f. grayi* na Bolívia oriental e *C. f. fasciolata* nas regiões sudoeste e central do Brasil, Paraguai e norte da Argentina. Uma quarta subespécie, *C. f. xavieri*, descrita a partir de aves mantidas em cativeiro, parece ser apenas uma variação de plumagem ainda não definida. A espécie ocorre principalmente nas florestas tropicais de planície, florestas semi-decíduas e em matas de galeria. *Crax fasciolata* é freqüentemente observado na borda de floresta ou em clareiras pequenas e em muitas áreas de sua distribuição demonstra uma evidente preferência pelos arredores de rios (Wallace *et al.*, 2001; White, 2001).

Devido a sua distribuição e abundância relevante em certas áreas, *C. fasciolata* é atualmente considerado de “Pouca Preocupação” (Birdlife Internacional, 2000). No entanto, a espécie é muito apreciada por caçadores e há um padrão claro de predação nas bordas de sua distribuição, o que lhe garante tratamento como “Quase Ameaçado”. A principal causa de ameaça é uma combinação de caça de subsistência e perda de habitat e estas pressões são mais exacerbadas pelo comércio animal (Caziani *et al.*, 1997).

Acreditava-se que a subespécie *C. f. pinima* estivesse extinta até que populações foram encontradas próximo ao Rio Pindaré (Maranhão) em 1977 e em Ourém (leste do Pará) em 1978 (Sick, 1993). Uma falta de registros, desde então, levou a sugestões repetidas de que *C. f. pinima* poderia estar extinto. Novaes & Lima (1998) concluíram que a subespécie estaria extinta nas cercanias de Belém; no entanto, ainda ocorria no Maranhão no final dos anos noventa na Reserva Biológica de Gurupi, nas reservas indígenas adjacentes Urubu-Ka'apor, Awá, e Caru, onde foi caçado para alimentação e utilização das penas para artesanato. O estado atual desta subespécie nestas áreas e outras possíveis populações no Pará oriental é desconhecido. A Reserva Biológica de Gurupi, embora invadida por lenhadores, é cercada por reservas nativas que representam o último bloco grande de floresta íntegra no Tocantins, com

aproximadamente 800.000 hectares. *Crax fasciolata pinima* é formalmente considerada ameaçada de extinção pelo Ministério Brasileiro de Ambiente (IBAMA 2003).

No Paraguai e na Argentina a espécie sofreu um declínio marcante e retração de sua distribuição, e no último país é considerada “Altamente Ameaçada” (Fraga, 1997). As únicas populações saudáveis na Argentina parecem permanecer na Província de Formosa, particularmente no rancho Guaycolec (White, 2001). No Paraguai a espécie também parecia estar em perigo de desaparecer completamente (Clay, 2001).

1.2.2. Morfologia



Figura 3. Individuos adultos de Mutum de penacho - *Crax fasciolata*, macho à esquerda e fêmea à direita. Foto: Cracid Specialist Group (2011)

Crax fasciolata apresenta dimorfismo sexual de plumagem (Figura 3). O macho é todo negro, com a barriga e o ventre brancos. Observa-se ausência de penas ao redor das narinas e pele de coloração amarelo vivo nesta região, contrastando com o negro do bico. Cauda longa e negra, com uma pequena ponta branca. Na fêmea a cor preta predomina na região dorsal e há presença de uma série de finas listras brancas nas costas e na parte do peito. Diferentemente, dos machos, possuem ventre amarelo acastanhado e crista formada por penas eriçadas e curvas de cor branca e pontas negras. A pele

das narinas é escura e é possível observar pontos amarelos no bico e na cabeça (Teixeira & Sick, 1986).

Os machos da subespécie amazônica *C. f. pinima* apresentam maior intumescimento na base da maxila, que possui coloração mais avermelhada. A crista é mais densa, as retrizes são de pontas brancas e os tarsos arroxeados. Esta espécie possui dorso negro, abdômen branco, ponta da cauda branca e região perioftálmica de coloração negra desprovida de penas. As fêmeas possuem topete negro com manchas brancas, cabeça e pescoço preto, peito cor de canela e a barriga bege (Teixeira & Sick, 1986). *Pinima* significa "cheio de pintas" e essa característica é observada somente nas fêmeas.

1.2.3. Comportamento

O Mutum de penacho passa grande parte do dia no solo da mata ou nas proximidades dos capões. Ao amanhecer e no final da tarde, pode ser observado nas praias ou nas estradas. Empoleira-se a meia altura, durante a noite ou nas horas mais quentes do dia. A maioria das observações desta espécie é de aves individuais ou pares, embora haja registros ocasionais de grupos de machos (Wallace *et al.*, 2001). Alimentam-se principalmente de frutas maduras e sementes; no Brasil a espécie foi registrada forrageando em flores de *Tabebuia*. Já foi observado *C. fasciolata* consumindo terra rica em sal (Del Hoyo, 1994).

1.2.4. Reprodução

No período reprodutivo, de setembro a dezembro, os machos começam a vocalizar na madrugada e prosseguem, com grandes intervalos, até o meio da manhã. Além desse chamado, os machos e as fêmeas possuem um assobio alto e curto, usado como alarme. A espécie é monógama e vive em casais, sendo raro encontrá-los isolado. As fêmeas põem de dois a cinco ovos em uma plataforma de ninho feito de galhos e pequenos ramos, forrado com folhas. O período de incubação leva de trinta a trinta e três dias. Após o nascimento os neonatos ficam sob as asas maternas, consumindo suas

reservas de gordura. Os filhotes acompanham as mães até os quatro meses de vida. Por volta dos seis meses de idade, ao atingirem o tamanho dos pais, são expulsos do território. Os indivíduos jovens atingem a maturidade aos dois anos (Del Hoyo, 1994).

1.3. *Aburria jacutinga* (Spix, 1825)

1.3.1. Introdução

Aburria jacutinga é uma espécie endêmica da Mata Atlântica ameaçada de extinção (IUCN, 2009). No passado, era amplamente distribuída na Mata Atlântica entre zero e mil metros de altitude, sendo encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, além de ocorrer na Argentina e no Paraguai. A espécie extinguiu-se na maior parte das localidades onde foi registrada devido à caça predatória, facilitada pelo seu temperamento dócil e pouco evasivo, e ao desmatamento que alterou e eliminou seus habitats preferenciais. Nos últimos vinte anos não existem relatos de sua ocorrência nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Atualmente no Brasil populações silvestres de *A. jacutinga* são encontradas principalmente em Unidades de Conservação, concentrando-se nos estados de São Paulo e Paraná. Recentemente, foi descoberta uma pequena população localizada no Parque Estadual do Turvo no Rio Grande do Sul (MMA, 2008; IUCN, 2009).

1.3.2. Morfologia



Figura 4. Jacutinga, indivíduo adulto - *Aburria jacutinga* (Foto: White, 2011).

A. jacutinga é um cracídeo de médio porte que mede entre 64 e 74 centímetros de altura, pesando em média um quilo e meio. Possui plumagem predominantemente negra, incluindo a fronte. A região superior do peito e do pescoço é coberta por penas negras margeadas de branco e as asas são ornamentadas com grandes manchas brancas. O píleo é formado por penas brancas alongadas e eriçáveis. Observa-se ausência de penas na região perioftálmica, caracterizada por uma coloração azul-esbranquiçada. Possui, ainda, uma grande barbela de cor vermelha com base azulada que, durante o período reprodutivo, apresenta coloração mais viva e o maior volume. A Jacutinga apresenta bico de coloração azul-clara com ponta negra e pernas avermelhadas (Sick, 1985; MMA, 2008)

1.3.3. Comportamento

A. jacutinga é uma ave essencialmente frugívora que passa a maior parte do dia nas árvores e desce ao solo somente para beber água e coletar frutos caídos. Sua dieta compreende uma grande variedade de frutos, mas possui predileção pelos frutos do palmito (*Euterpe edulis*) e do licuri (*Syagrus*

spp.). As jacutinga retiram a polpa dos frutos ingeridos, regurgitando ou eliminando as sementes junto às suas fezes. Este comportamento representa um papel importantíssimo na dispersão de sementes nas florestas onde habita (Sick, 1985; MMA, 2008).

São animais de hábitos solitários ou de convívio em pequenos grupos. *A. jacutinga* passa muitas vezes despercebida nas copas das árvores e quando detectada na maioria das vezes não foge - demonstra inquietação, eriçando as penas do píleo. Chamam mais atenção no amanhecer ou no final da tarde, quando realizam barulhentos vôos territoriais proporcionados por modificações em suas rêmiges primárias.

1.3.4. Reprodução

Assim como a maioria dos representantes da Família Cracidae, as jacutingas são monogâmicas e a sua reprodução concentra-se entre os meses de agosto e novembro. Nidificam sobre plataformas simples como galhos grossos e ramificações de troncos no alto de árvores, utilizando como material de construção gravetos e ramos. As fêmeas realizam a postura de dois a três ovos de casca branca, que com o passar do tempo se tornam marrons. O período de incubação dura em média vinte e oito dias; os filhotes nascem de olhos abertos e acompanham os pais pela ramaria alta logo que sua plumagem se seca (Sick, 1985; MMA, 2008).

1.4. Malaria aviária

A malária aviária, devido a sua extensa distribuição geográfica e ampla gama de espécies hospedeiras, faz que os parasitos do gênero *Plasmodium* sejam excelentes modelos tanto para os estudos da dinâmica ecológica e evolutiva da relação parasito-hospedeiro (Fallon *et al.*, 2005), quanto para o desenvolvimento de projetos de conservação e de manejo *in-situ* e *ex-situ* de aves silvestres (Kilpatrick *et al.*, 2006). Segundo alguns autores, os plasmódios aviários têm determinado a extinção e o declínio populacional de diversas espécies de aves (Van Ripper *et al.*, 1986; Atkinson *et al.*, 1995; 2000; Massey

et al., 1996). Outros estudos discutem a importância dos plasmódios como fator de seleção das populações aviárias devido às interações entre os parasitos, a escolha de parceiros sexuais, sucesso reprodutivo e a resposta imune dos hospedeiros (Hamilton & Zuk 1982, van Riper *et al.*, 1994; Oppliger *et al.*, 1996).

1.4.1. *Plasmodium* spp.

Os plasmódios são encontrados além das aves entre répteis, seres humanos e outros mamíferos. Estes parasitos pertencem ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Haemosporina, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*, sendo agrupados em quinze subgêneros, assim distribuídos: sete subgêneros ocorrem em répteis (Telford, 1988), três subgêneros em mamíferos, cinco subgêneros em aves (Garnham, 1966; Valkiūnas, 1997). Os subgêneros foram divididos com base nas características morfológicas e biológicas dos estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos. Os cinco subgêneros de *Plasmodium* são *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia*.

O subgênero *Haemamoeba* compreende espécies com esquizontes eritrocíticos grandes e arredondados, gametócitos arredondados e esquizogonia exo-eritrocítica no sistema fagocítico mononuclear. É representado pelas espécies *Plasmodium relictum*, *Plasmodium matutinum*, *Plasmodium cathemerium* e *Plasmodium giovannolaia*, que infectam passeriformes (Garnham, 1966).

O subgênero *Giovannolaia* compreende parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanhos moderados a grandes, gametócitos alongados e a esquizogonia exo-eritrocítica que ocorre no sistema fagocítico mononuclear. A forma alongada dos gametócitos permite a diferenciação entre os subgêneros *Giovannolaia* e *Haemamoeba*. As principais espécies representantes deste subgênero são *Plasmodium circumflexum* e *Plasmodium polare* que infectam passeriformes (Garnham, 1966).

O subgênero *Novyella* inclui espécies com esquizontes pequenos com no máximo oito merozoítos e gametócitos alongados; os estágios assexuados

possuem pouco citoplasma. As espécies podem ser divididas de acordo com seus hospedeiros vertebrados. Nos passeriformes as espécies encontradas são o *Plasmodium vaughani*, *Plasmodium rouxi*, *Plasmodium nucleophilum* e *Plasmodium hexamerium* (Garnham, 1966).

O subgênero *Huffia* é facilmente reconhecido por suas diferenças na esquizogonia exo-eritrocítica: possuem esquizontes eritrocíticos relativamente pequenos, com dez ou menos merozoítos, gametócitos alongados e esquizogonia exo-eritrocítica profusa e contínua nas células do sistema hematopoético, particularmente nas células precursoras dos eritrócitos. As espécies características são o *Plasmodium elongatum* e o *Plasmodium huffia* (Garnham, 1966).

O subgênero *Bennettinia* sugerido, recentemente, por Valkiūnas (1997), é caracterizado por possuir esquizontes pequenos e arredondados e com citoplasma escasso, ocupando posição próxima ao núcleo do eritrócito. Os gametócitos são variáveis, mas, freqüentemente, ovalados ou alongados. Apresenta somente uma única espécie, o *Plasmodium juxtannucleare*.

1.4.2. Ciclo Biológico

O ciclo biológico dos parasitos da malária é heteroxeno, sendo composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Figura 5). Os mosquitos hematófagos da Família Culicidae são os vetores da malária aviária. As principais espécies de vetores estão contidas nos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Aedeomya*. Somente as fêmeas de culicídeos alimentam-se de sangue, portanto são as responsáveis pela disseminação da infecção (Valkiūnas, 2005).

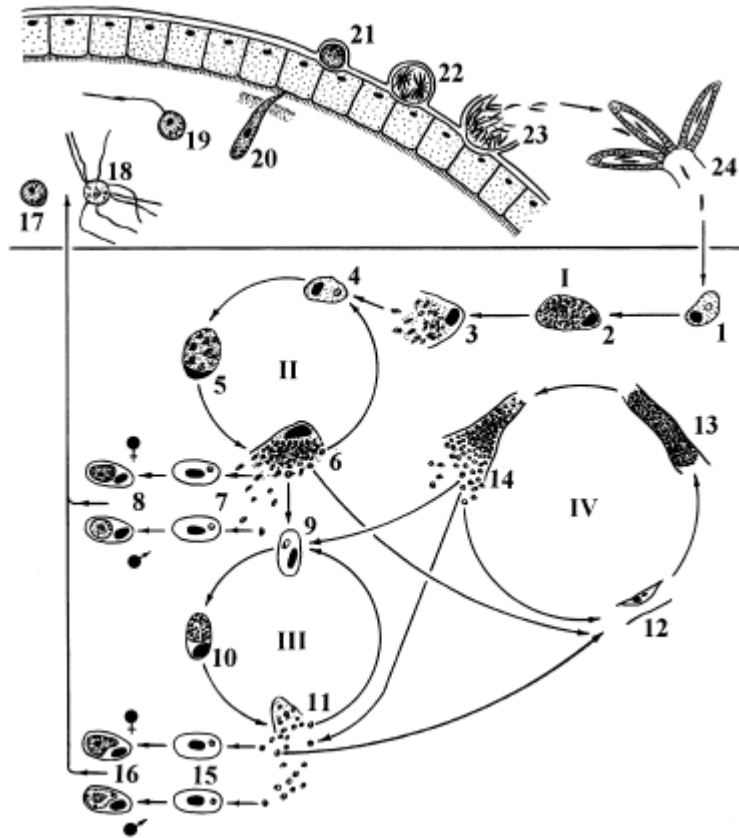


Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*. Parte superior, no vetor; parte inferior, na ave: I e II - merogonia exo-eritrocítica primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 - esporozoítos na célula do retículo endotelial; 2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

A transmissão ocorre quando o vetor se alimenta de uma ave infectada e ingere formas sexuadas denominadas gametócitos, que irão formar o oocisto no estômago do vetor. Após a esporogonia, os esporozoítos desenvolvidos nos oocistos são liberados na cavidade celomática em direção às glândulas salivares, sendo o hospedeiro vertebrado infectado com esta forma quando picado pelo vetor. Os esporozoítos penetram nas células do retículo endotelial e nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) presentes no local da picada infectante e, posteriormente, nas células do SFM fixas à camada endotelial dos capilares sanguíneos cerebrais, do baço, do fígado, dos rins e de outros órgãos (Paraense, 1945), dando início ao ciclo exo-eritrocítico. Por

divisão assexuada formam os esquizontes que após divisões repetidas formarão os merozoítos. Durante o desenvolvimento do ciclo eritrocítico, os merozoítos após invadirem um eritrócito transformam-se por divisão esquizogônica em esquizontes sanguíneos, que ao romperem os eritrócitos liberam os merozoítos que invadirão hemácias maduras e imaturas. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos alguns trofozoítos se diferenciam e originam as formas eritrocíticas sexuadas - os gametócitos masculinos e femininos que serão ingeridos pelo vetor (Valkiūnas, 2005).

1.4.3. Patologia da malária aviária

A patogenia da infecção por hemoparasitos é bastante variável e apresenta desde expressão assintomática a casos de óbito. Essa variação pode estar relacionada a diversos fatores que influenciam o organismo da ave infectada e que levam a um quadro de imunodepressão (Atkinson, 2008). Observa-se ainda que a gravidade da doença esteja diretamente envolvida com o grau de parasitemia (Garnham, 1966). A maioria das aves infectadas permanece ativa e não exibem sinais de dor (Castle & Christensen, 1990).

Aves infectadas por *Plasmodium* spp. podem apresentar uma fase crônica ou latente de infecção, na qual a resposta imune reduz a parasitemia a níveis bastante baixos e as aves sobreviventes apresentam, portanto, pouco ou nenhum sinal de infecção. Assim, as aves podem permanecer infectadas por toda a vida, resistindo a recaídas periódicas que são controladas por interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o estresse fisiológico (Atkinson & van Riper, 1991). Essas infecções crônicas que acometem a grande maioria das aves são difíceis de serem detectadas através do exame de esfregaços sanguíneos até que ocorra uma reativação por atividade hormonal ou estresse fisiológico e ambiental (Atkinson & van Riper, 1991)

A infecção causada por este parasito é subclínica, na maioria dos casos, porém recaídas podem ocorrer em condições de estresse ou na ocorrência de infecções concomitantes com outros agentes de doença (Graczyk *et al.*, 1994; Waldenstrom *et al.*, 2002). O aparecimento de sinais clínicos está associado a infecções agudas com a expressão muito rápida dos sintomas; as aves

infectadas podem se apresentar letárgicas, rejeitar a bebida e a comida, manifestar sinais de dor, além de penas eriçadas, cabeças decaídas e olhos fechados. Em casos mais graves pode ocorrer palidez das mucosas, dispnéia, inapetência, regurgitação e morte (Atkinson *et al.*, 1995).

1.4.4. Diagnóstico

1.4.4.1. Esfregaço sanguíneo

A identificação de hemoparasitos em aves domésticas e silvestres baseia-se principalmente na morfologia de seus estágios sanguíneos (trofozoítos, gametócitos, esquizontes eritrocíticos) observados em esfregaços sanguíneos. Estudos de campo e de laboratório utilizam os esfregaços de sangue periférico para o diagnóstico, estimativas de prevalência, bem como medidas de intensidade de infecção de hemoparasitos.

O esfregaço sanguíneo busca quantificar os hemoparasitos pela distribuição dos eritrócitos não infectados e dos parasitados com a observação de um determinado número de campos microscópicos e/ou período de tempo; fornece uma estimativa do número de parasitos (van Riper III *et al.*, 1986).

A detecção direta de parasitos em esfregaços sanguíneos não é uma tarefa fácil, principalmente quando as aves são avaliadas na fase crônica ou latente de infecção. Neste caso, as parasitemias são frequentemente baixas, impossibilitando a visualização de formas evolutivas essenciais para o diagnóstico diferencial de espécies de hemoparasitos (Atkinson & van Riper III, 1991). Além disso, o esfregaço sanguíneo é um método bastante laborioso e requer intenso treinamento técnico a fim de garantir a precisão do método (Barker *et al.*, 1992). Apesar disso, o método de exame microscópico de esfregaços sanguíneos ainda é considerado essencial para a detecção de hemoparasitos, sendo utilizado como método de diagnóstico de referência (padrão ouro).

1.4.4.2.Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Técnicas moleculares permitem o processamento de um número elevado de amostras simultaneamente, o que torna tais métodos adequados para estudos epidemiológicos e para diagnóstico de patógenos. A PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase) é um desses métodos de diagnóstico. Ele usa o conhecimento da variação das seqüências para detectar especificamente linhagens diferentes de parasitos. A amplificação de uma seqüência genômica específica através da PCR para estudos epidemiológicos é bastante conveniente por se tratar, na maioria dos casos, de quantidades limitadas de amostras disponíveis (Henning et al., 1999).

As pesquisas têm demonstrado que a PCR é uma técnica mais sensível do que o exame microscópico de esfregaços sanguíneos para a detecção de hemoparasitos no sangue de aves (Ricklefs & Fallon, 2002; Waldenström *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005).

Alguns protocolos de PCR são sensíveis para detectar infecções com concentrações de DNA do parasito correspondente a um eritrócito infectado em cem mil não infectados (Fallon *et al.*, 2003; Waldenström *et al.*, 2004).

A técnica de PCR pode ser utilizada na caracterização de diferentes populações de plasmódios *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* em aves naturalmente infectadas. Além disso, pode fornecer diagnósticos rápidos e confiáveis, mesmo quando determinada amostra apresentar baixos níveis de parasitismo ou encontrar-se infectada por mais de uma espécie de parasito. É considerado um método muito eficiente e com maior acurácia (Richard *et al.*, 2002).

1.5.Hematologia, bioquímica e fracionamento eletrofóretico das proteínas plasmáticas de aves

Entender as alterações hematológicas e bioquímicas de aves mantidas em cativeiro pode servir como parâmetro para avaliar as respostas de animais *in situ* em situações adversas tais como as relacionadas a clima e nutrição, bem como facilitar o diagnóstico de determinadas enfermidades. Programas de conservação ambiental podem ser beneficiados com essas informações, de vez que as doenças que acometem animais cativos são similares às aquelas observadas em vida livre (Munson & Cook, 1993; Polo *et al.*, 1998).

1.5.1. Hemograma de aves

As provas laboratoriais realizadas a partir de amostras de sangue das aves são importantes ferramentas no diagnóstico de doenças nestes animais (Schmidt *et al.*, 2007), devido aos sinais clínicos sem especificidade que elas geralmente apresentam, além da limitada informação obtida através do exame físico (Lumeij, 1997) das mesmas. Já foi demonstrado que os parâmetros hematológicos podem ser úteis na predição da sobrevivência de aves adultas (Kilgas *et al.*, 2006). A avaliação hematológica vem sendo utilizada extensamente como critério de avaliação do estado de saúde, da condição nutricional e de distúrbios da homeostase em aves parasitadas (Dawson & Botolotti, 1997) e é diretamente correlacionada com a intensidade das infecções causadas por hematozoários (Booth & Elliot, 2003).

O hemograma avalia aspectos quantitativos e qualitativos das células sangüíneas e dos trombócitos. Vários fatores como idade, sexo, hormônios e parasitismo, entre outras condições patológicas, podem alterar tais parâmetros (Mitchell & Jonhs, 2008). Os exames laboratoriais que compõem o hemograma das aves dividem-se em eritrograma, leucograma e contagem de trombócitos (Campbell, 1991; Barger & Grindem, 2000).

1.5.1.1.Eritrograma

O eritrograma inclui a determinação do volume globular (VG) ou hematócrito (Ht), contagem total de eritrócitos e determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue (Barger & Grindem, 2000). O hematócrito normal das aves varia entre trinta e cinco a cinqüenta e cinco por cento; valores inferiores a trinta e cinco indicam anemia e os superiores a cinqüenta e cinco por cento sugerem desidratação ou policitemia (Bounous & Stedman, 2000). A anemia é evidenciada pela redução na contagem total de eritrócitos, na diminuição do volume globular e da concentração de hemoglobina (Fudge, 2000).

1.5.1.1.1. Eritrócitos aviários

Os eritrócitos das aves são maiores em tamanho do que os observados em mamíferos, porém menores que os encontrados em répteis e anfíbios (Sturkie & Griminger, 1986). O eritrócito aviário maduro é uma célula de aparência achatada e formato elíptico e possui um núcleo de mesmo formato posicionado centralmente em seu citoplasma. A cromatina nuclear é uniformemente agregada e torna-se cada vez mais condensada durante o processo de envelhecimento celular. Nos esfregaços sanguíneos corados pelas preparações de Romanowsky o núcleo do eritrócito apresenta coloração roxa, enquanto o citoplasma rico em hemoglobina se tingem de laranja-rosado com textura uniforme (Campbell & Ellis, 2007). A contagem total de eritrócitos, assim como a concentração de hemoglobina e o hematócrito das aves, são influenciados pela idade, sexo, hormônios, hipóxia, fatores ambientais e doenças. Geralmente, os machos e as aves adultas possuem contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito mais elevados do que as fêmeas e os animais jovens, de vez que a tiroxina e os hormônios andrógenos exercem efeito estimulante sobre a eritropoiese, enquanto os estrógenos agem como depressores da mesma (Herbert *et al.*, 1989).

A avaliação dos eritrócitos deve ser baseada no tamanho, na forma e na coloração da célula e do seu núcleo, assim como na presença ou na ausência de inclusões celulares (Campbell & Ellis, 2007).

1.5.1.2. Leucograma

O leucograma compreende a contagem total e diferencial de leucócitos. O número de leucócitos totais e a morfologia dos mesmos são estáveis em uma ave sadia (Schmidt *et al.* 2006). A contagem diferencial de leucócitos possibilita a visualização e a quantificação de distintas populações de leucócitos, quais sejam: linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (Barger & Grindem, 2000). Alterações no leucograma podem ser percebidas durante o desenvolvimento das enfermidades parasitárias e este fato permite acessar e monitorar a resposta imunológica das aves ao longo destes períodos.

1.5.1.2.1. Linfócitos

Os linfócitos são as células da série branca mais importantes e mais numerosas no sangue e nos tecidos hematopoiéticos das aves. São tipicamente arredondados e apresentam, algumas vezes, contorno irregular. Núcleo central ou levemente excêntrico, que preenche quase toda célula, possui forma arredondada a poligonal que acompanha o formato da célula. Apresenta coloração roxo-clara com cromatina difusa e nucléolo bem evidenciado. Citoplasma escasso, finamente granular e levemente basofílico, que, por vezes, é visto como uma fina borda que envolve o núcleo (Campbell & Ellis, 2007).

O citoplasma dos linfócitos pode conter inclusões hialinas e grânulos azurofílicos. É possível observar-se, ocasionalmente, vacúolos algumas vezes com aparência espumosa. Em casos de bacteremia os microorganismos fagocitados são freqüentemente vistos no interior dos linfócitos, e, em alguns casos, também é possível encontrar eritrócitos fagocitados (Montali, 1988; Campbell & Ellis, 2007).

1.5.1.2.2. Monócitos

O monócito possui núcleo de pleomórfico e assume, por vezes, formato de “U” ou curvo, levemente basofílico, localizado excentricamente; contém cromatina de padrão fino. O citoplasma cora-se palidamente de cinza-azulado, mostrando-se moderada a finamente granular (Campbell & Ellis, 2007).

Os monócitos possuem atividade fagocítica e ao migrarem para o interior dos tecidos se transformam em macrófagos. Os monócitos e os macrófagos possuem substâncias químicas com atividade biológica e estão envolvidos no processo de mediação inflamatória e na destruição de organismos invasores. Os monócitos também desempenham um importante papel no processamento de antígenos (Dieterien-Lievre, 1988)

É visto no sangue de animais que sofrem de infecções bacterianas severas. Fragmentos celulares, bactérias, vacúolos com aparência lipídica, assim como outros tipos de material particulados fagocitados, podem ser encontrados em seu interior.

1.5.1.2.3. Granulócitos

1.5.1.2.3.1. Heterófilos

Os heterófilos das aves possuem funções similares aos neutrófilos encontrados em mamíferos. Geralmente, apresentam formato arredondado com um diâmetro médio 8,8 µm. O núcleo do heterófilo maduro é lobulado (dois a três lóbulos) e apresenta cromatina de aspecto grosseiro, agregado, corando-se de roxo. O citoplasma demonstra-se incolor e contém grânulos que se coram eosinofílicamente em preparações de Romanovsky. Os grânulos citoplasmáticos típicos são de aparência alongada semelhantes a pequenos cristais e possuem enzimas lisossômicas e não-lisossômicas com atividade bactericida (Hodges, 1977; Dieterien-Lievre, 1988).

Heterófilos desempenham um papel crucial no controle de invasões bacterianas, assim como no desenrolar da patogênese subsequente às infecções bacterianas nas aves. Já foi demonstrada a participação destas células em infecções virais e parasitárias (Lam *et al*, 1996).

1.5.1.2.3.2. Eosinófilos

Os eosinófilos aviários possuem tamanho e forma similares aos heterófilos. O núcleo é lobulado e assume uma coloração mais escura que a dos heterófilos. O citoplasma dos eosinófilos cora-se de azul-claro, contendo grânulos citoplasmáticos de aparência fortemente eosinofílica e formato tipicamente arredondado, por vezes oval ou alongado.

A função exata do eosinófilo nas aves é desconhecida. Quadros de eosinofilia podem ser vagamente interpretados como resposta à ecto e endoparasitos ou hipersensibilidade à antígenos estranhos. Os eosinófilos aviários também podem atuar como mediadores das reações de hipersensibilidade retardada (Maxwell, 1987).

1.5.1.2.3.3. Basófilos

Os basófilos são as células mais facilmente identificáveis entre os leucócitos, apesar de não serem freqüentemente vistos. Possuem núcleo oval a lenticular, localizado excentricamente e que assume coloração de tonalidade escura azul-arroxeadada, cromatina de padrão agrupado e citoplasma preenchido por numerosos grânulos redondos e intensamente basofílicos, que muitas vezes dificultam a visualização do núcleo (Campbell & Ellis, 2007).

A função dos basófilos nas aves não é bem documentada, presume-se que atuem como nos mamíferos, uma vez que seus grânulos contêm histamina. Os basófilos participam de processos inflamatórios agudos e nas reações de hipersensibilidade tipo IV (Fox & Solomon, 1981).

1.5.1.3. Contagem de trombócitos

A contagem de trombócitos em aves híidas varia entre vinte a trinta mil células/ μ L de sangue. Os trombócitos auxiliam no mecanismo da coagulação sangüínea, além de participar ativamente na defesa do organismo contra diferentes agentes patogênicos (Bounous & Stedman, 2000).

1.5.1.3.1. Trombócitos

Os trombócitos das aves são nucleados e geralmente assumem duas formas: uma elíptica, com bordas suaves (semelhante a um eritrócito), com o eixo longitudinal nuclear paralelo ao da célula; outra, geralmente redonda, apesar de algumas vezes disforme, com bordas irregulares. Em ambas, o núcleo é centralizado e tende a acompanhar o formato da membrana celular. O núcleo possui coloração profundamente basofílica e cromatina com padronização densa (Campbell & Ellis, 2007).

O citoplasma é levemente basofílico e incolor, muitas vezes apresentando característica de clareamento ou vacuolização perinuclear. São células pequenas, que medem aproximadamente de um terço a metade de um eritrócito e possuem razão núcleo/citoplasma moderadamente alta. Ocasionalmente, observam-se trombócitos falciformes ou que apresentam vacuolização do citoplasma ou, ainda, citoplasma com aspecto espumoso (Campbell & Ellis, 2007).

Os trombócitos possuem tendência de aderir entre si durante a coleta da amostra, formando agregados que são geralmente mais comuns nas bordas dos esfregaços sangüíneos. Sendo assim, a contagem diferencial dessas células fica amplamente dependente da magnitude dos agrupamentos encontrados (Campbell, 2006).

Os trombócitos nas aves podem desempenhar um papel na imunidade inata devido a sua capacidade fagocítica (Grechii *et al.*, 1980).

Faz parte da rotina hematológica, além dos exames citados, a observação da presença de hemoparasitos intra-eritrocitários ou intra-leucocitários, das alterações tóxicas nos leucócitos, assim como da avaliação da resposta à anemia, muitas vezes manifestada pela presença de eritrócitos jovens e policromatofilia (Barger & Grindem, 2000; Schimidt *et al.*, 2007).

1.5.2. Bioquímica plasmática de aves

A realização de uma abordagem adequada dos problemas de saúde nas aves requer o entendimento das alterações determinadas pelas doenças nas funções bioquímicas de seu organismo. A avaliação dos componentes plasmáticos das aves é necessária para demonstrar a existência de anormalidades ou danos celulares; além disso, a bioquímica plasmática pode fornecer relevantes informações sobre o “status” fisiológico das aves. Entretanto, é necessário que sejam consideradas as influências exercidas por fatores internos e externos, tais como: temperatura, umidade, altitude, fotoperíodo, dieta, idade, espécie e sazonalidade (Hochleithner, 1994; Juráni *et al.*, 2004).

1.5.2.1. Avaliação da função hepática em aves

A análise bioquímica da função hepática das aves é realizada através da mensuração da concentração plasmática de algumas enzimas presentes no fígado, quais sejam: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (FA), entre outras. A alteração da atividade dessas enzimas pode refletir distúrbios hepatocelulares ou elevações na produção. Contudo, a sensibilidade e a especificidade das enzimas plasmáticas de função hepática podem variar em função da espécie e do tipo de doença. Adicionalmente, a escassez de estudos comparativos relacionados à atividade dessas enzimas em diferentes espécies de aves dificulta sobremaneira a interpretação dos resultados obtidos (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006).

1.5.2.1.1. Aspartato Aminotransferase

Altas atividades de AST já foram observadas nas células do fígado, músculo esquelético, coração, cérebro e rins (Lewandowski *et al.*, 1986; Cambell, 2006; Lumeij, 2008). Apesar de não ser específica, a elevação na atividade da AST acima de 275UI/L sugere injúria hepática ou muscular.

Valores superiores a 800UI/L, quando associados à biliverdinúria ou bileverdinemia, são fortes indicativos de lesão hepática grave (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006). A interpretação da atividade da AST é dificultada pela ocorrência de uma grande variação interespecífica na distribuição desta enzima nos tecidos das aves.

1.5.2.1.2. Alanina aminotransferase

Os níveis plasmáticos de ALT variam entre dezenove a cinquenta UI/L na maioria das espécies de aves. A elevação da atividade da enzima ALT está relacionada a alterações patológicas em quase todos os tecidos; em decorrência disso, a mensuração dos níveis dessa enzima no plasma das aves é pouco específica e de limitado valor diagnóstico nos distúrbios hepatocelulares. Alguns estudos indicam não existirem vantagens na avaliação da ALT em detrimento da AST no diagnóstico de doenças hepáticas. No entanto, a elevação anormal da atividade da enzima ALT pode se manifestar na presença de lesões graves no fígado ou nos músculos (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006).

1.5.2.1.3. Lactato desidrogenase

A atividade da enzima LDH nas aves já foi observada no fígado, no músculo esquelético, no coração, nos rins, nos ossos e nas hemácias (Hochleithner, 1994). Indivíduos sadios apresentam valores para atividade plasmática de LDH inferiores a 1.000 UI/L. Apesar de não ser específica, a elevação dos valores de LDH pode indicar doença hepatocelular ou lesão muscular (Campbell, 2006). Segundo Rosskopf (1982) e Campbell (2006), nas aves acometidas de lesões hepáticas a atividade da LDH aumenta e diminui mais rapidamente que as atividades de AST e ALT e esta diferença pode oferecer informações sobre a cronicidade do distúrbio.

1.5.2.1.4. Fosfatase alcalina

A atividade da FA nas aves relaciona-se principalmente à atividade osteoblástica (Campbell, 2006); entretanto, a ocorrência dessa enzima no duodeno, nos rins e no fígado já foi demonstrada (Lumeij, 1988; Fudge, 2000). Apesar da baixa atividade da FA no fígado, as lesões hepáticas podem causar elevações dessa enzima no plasma das aves (Hochleithner, 1994).

1.5.2.2. Avaliação da função renal em aves

A avaliação laboratorial do funcionamento renal das aves é realizada a partir da mensuração da concentração sanguínea de ácido úrico, da uréia e da creatinina.

O ácido úrico é o principal fruto do metabolismo de nitrogênio nas aves e também é reconhecido como importante agente antioxidante (Juráni *et al.*, 2004). A concentração de ácido úrico plasmático é uma das principais provas utilizadas para avaliar a função renal das aves: distúrbios na função renal podem elevar a concentração deste constituinte no plasma acima de 15mg/dL (Campbell, 2006). Por outro lado, esta elevação pode evidenciar alterações na condição nutricional da ave, devido à redução na ingestão de alimentos ou inapetência, quadro muitas vezes compatível com a presença de enfermidades infecciosas. A concentração de ácido úrico no plasma também pode ser útil para monitorar o tratamento e a progressão de doenças parasitárias nas aves, quando utilizado em mensurações seqüenciais (Campbell, 2006; Gregory, 2003).

Pequenas quantidades de uréia, pelo fato de serem uricotélicas, estão presentes no plasma das aves. A concentração deste metabólito pode ser influenciada pela ingestão protéica, taxa de excreção renal e condição hepática. Quando comparada ao ácido úrico, a mensuração do teor de uréia é considerada menos precisa para diagnosticar afecções renais nas aves. No entanto, a uréia pode ser um sensível indicador de azotemia pré-renal em algumas espécies, pois sua eliminação realizada pela filtração glomerular é dependente do estado de hidratação do animal. Logo, o aumento do teor

plasmático de uréia pode indicar redução na perfusão arterial dos rins (Campbell, 2006; Lumeij, 2008). O aumento na concentração plasmática de creatinina pode ser observado nas doenças renais graves. Contudo, a mensuração dos teores desse metabólito tem valor diagnóstico limitado, de vez que a creatina é excretada pelos rins antes de ser transformada em creatinina (Campbell, 2006).

1.5.2.3. Glicose

A concentração plasmática de glicose nas aves varia entre 200 a 500 mg/dL e é influenciada pelo ciclo circadiano. Durante curtos períodos de jejum os níveis de glicose são mantidos através da glicogenólise hepática; períodos prolongados levam a depleção de gorduras e mobilização de proteínas, resultando em perda de peso do animal. A hipoglicemia - teores de glicose menores que 200mg/dL - pode se desenvolver devido a um longo período de inapetência, doença hepática severa, septicemia, distúrbios endócrinos e hemoparasitismo crônico (Marvin, 1945; Dunlap & Schall, 1995; Campbell, 2004). A liberação de glicocorticóides induzida por estresse agudo ou pela administração de corticoesteróides pode elevar os níveis de glicose acima de 500 mg/dL caracterizando um quadro de hiperglicemia (Campbell, 2004).

1.5.2.4. Eletrólitos

O cálcio é um mineral de grande importância diagnóstica nas aves. Além de ser o principal constituinte dos ossos, o cálcio participa de funções fisiológicas fundamentais, tais como: transmissão de impulsos nervosos, permeabilidade e excitabilidade de todas as membranas, ativação de sistemas enzimáticos, calcificação da casca do ovo e contratilidade uterina (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006). Os teores plasmáticos de cálcio variam entre 8 e 12mg/dL, na maioria das aves. No sangue, este mineral pode ser encontrado na sua forma ionizada, que é biologicamente ativa; a forma não ionizada (biologicamente inativa) encontra-se ligada à albumina. A elevação do teor de cálcio acima de 12mg/dL pode estar relacionada à hipervitaminose D₃,

lesões ósseas osteolíticas secundárias a neoplasias e à hiperalbuminemia (Campbell, 2006). Schimidt *et al.* (2006) observaram aumento na concentração de cálcio plasmático em frangos de corte vacinados contra coccidiose. Este aumento está relacionado à resposta vacinal, de vez que a ativação da calcitonina mede o reconhecimento do antígeno pelas células T receptoras. A hipocalcemia é observada na deficiência dietética de cálcio e vitamina D₃, alcalose, hipoalbuminemia e quando há excesso de fósforo na alimentação. Alterações na concentração de fósforo podem ocorrer em diversas doenças, porém é um achado inconsistente, o que atribui a este mineral um baixo valor diagnóstico. Contudo, valores de fósforo plasmático acima de 7mg/dL podem estar relacionados à doença renal grave, hipervitaminose D₃, hiperparatireoidismo e hipoparatiroidismo secundário nutricional. A hipofosfatemia manifesta-se na presença de teores abaixo de 5mg/dL e é observada na deficiência de vitamina D₃, na má absorção ou inanição e como resultado do uso prolongado de corticosteróides. Entretanto, o extravasamento de fósforo intracelular causado pela hemólise pode elevar falsamente o valor deste mineral em amostras de plasma (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006, Lumeij, 2008).

1.5.2.5. Proteínas plasmáticas

A mensuração das proteínas plasmáticas totais (PPT) é um indicador útil do estado de saúde aviária (Hochleithner, 1994). A análise dos valores de PPT auxilia no diagnóstico de afecções gastrintestinais, hepáticas, renais ou de doenças infecciosas. Além disso, pode indicar a causa de um quadro anêmico e a presença de um processo inflamatório (Barger & Grindem, 2000; Lumeij, 2008). As concentrações de PPT nas aves variam entre 2,5 a 4,5 g/dL e a albumina representa 40 a 50% deste valor. A síntese da albumina ocorre no fígado e é influenciada pela nutrição, balanço hormonal, estresse e doenças (Thrall *et al.*, 2004). As imunoglobulinas produzidas por linfócitos B e plasmócitos representam uma porção significativa da concentração de PPT. A redução da concentração da albumina plasmática geralmente acompanha estados de má nutrição e enfermidades (Kawai, 1973). Segundo Coles (1997),

é esperado um aumento na concentração de globulinas nas infecções agudas e crônicas e em aves sofrendo de estresse nutricional, ou seja, indivíduos saudáveis apresentam a relação albumina/globulina mais elevada.

1.5.2.5.1. Fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas

A eletroforese é uma metodologia utilizada para separar e mensurar a proporção dos diferentes tipos de proteínas presentes no plasma (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008). A relação entre as frações protéicas refletem o estado metabólico e de saúde das aves e, além disso, os valores dessas frações podem variar de acordo com a idade, o sexo e a espécie (Werner & Reavill, 1999; Filipović *et al.*, 2010).

Observa-se nas aves a presença de cinco principais frações protéicas, quais sejam: pré-albumina, albumina, α -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas (Figura 6). A fração nas aves que migra em maior velocidade é a pré-albumina; essa proteína é sintetizada no fígado e é responsável pelo transporte de tiroxina e retinol (Lumeij, 2008).

A redução na concentração de pré-albumina pode associar-se com a diminuição de sua síntese ou com distúrbios renais (Jain, 1993). As α -globulinas abrangem as glicoproteínas, ceruloplasmina e α_2 -macroglobulina e, além disso, são consideradas proteínas de fase aguda que se elevam caracteristicamente nas infecções agudas. As β -globulinas são compostas pela ferritina, hemopexina, complemento, fibrinogênio e lipoproteínas e também são consideradas proteínas de fase aguda. Algumas imunoglobulinas como a IgM e a IgA podem migrar na mesma faixa que as β -globulinas. A γ -globulina é considerada a fração de fase crônica, sendo composta principalmente por imunoglobulinas (IgA, IgE, IgG e IgM). Em aves saudáveis a albumina é considerada a maior fração protéica. Nos processos inflamatórios a elevação das frações α , β ou γ resulta num aumento das proteínas totais; nesses casos, pode ocorrer redução concomitante da albumina (Campbell & Coles, 1986; Hotchleithner, 1994; Lumeij, 2008).

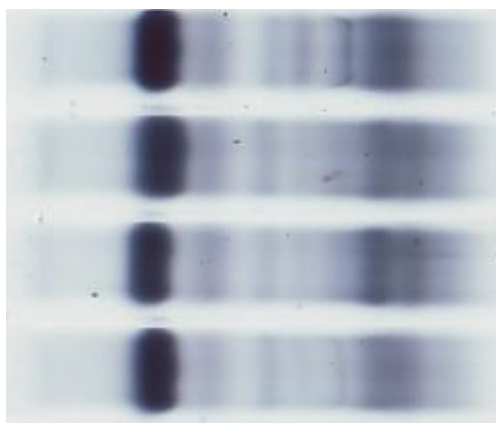


Figura 6. Fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas em gel de agarose. (Motta, 2011)

1.5.3. Alterações hematológicas e bioquímicas em aves parasitadas por hemoparasitos

Os sinais clínicos observados em aves infectadas por hemoparasitos intraeritrocitários estão geralmente associados aos quadros de anemia. Há o aumento da taxa de destruição de eritrócitos, evidenciada pela diminuição do hematócrito e da contagem total de hemácias. Paralelamente, ocorre a redução da concentração de hemoglobina e o aumento da percentagem de hemácias imaturas, que pode ser verificado pela hipocromasia dos eritrócitos maduros e pelo aumento na contagem de policromatófilos e eritroblastos. São acontecimentos que acarretam uma redução da capacidade do organismo hospedeiro em utilizar o oxigênio e que resulta em déficit energético e metabólico (Oppliger et al., 1996; Madsen et al., 2005).

A concentração de linfócitos no sangue periférico é utilizada como medida indireta da imunidade celular (Hõrak *et al.*, 1998). Infecções parasitárias podem determinar um aumento de heterófilos circulantes (Coles, 1997). A elevação da relação heterófilo/linfócito está correlacionada com o aumento de corticosteróides no plasma, que agem com imunodepressores e funcionam como um sensível indicador do nível de estresse nas aves (Ots & Hõrak, 1996; Moreno *et al.*, 2002).

Tais alterações podem se manifestar clinicamente como anorexia, perda de peso, letargia, fadiga e resultar na morte do animal (Mitchell & Jonhs, 2008).

Williams (2005) demonstrou que durante a fase aguda da infecção experimental por *Plasmodium gallinaceum* em *Gallus gallus* ocorreu redução das concentrações plasmáticas de albumina e α_2 -globulina, assim como elevações de γ_1 e γ_2 -globulina. Essas alterações ocorreram simultaneamente com o aumento da proteína plasmática total, da aspartato aminotransferase, da glutamato desidrogenase e da γ -glutamilttransferase; além disso, observou-se diminuição nos teores plasmáticos de creatinina.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos têm demonstrado a grande influência dos parasitos na dinâmica populacional de seus hospedeiros (Anderson & May, 1979), através da interferência negativa em sua fertilidade (Moller, 1993), induzindo estados de debilidade (Clayton & Moore, 1997) e, em alguns casos, acarretando a morte dos hospedeiros (Coltman *et al.*, 1999; Pampoule *et al.*, 1999). Além disso, alguns hemoparasitos, como *Plasmodium*, têm sido freqüentemente apontados como um dos fatores responsáveis pela evolução do sistema imune (Hedrick, 1994), modulação do metabolismo e do comportamento dos vertebrados (Oppliger *et al.*, 1996).

Mesmo que os efeitos da malária aviária sejam na maioria dos casos sub-clínicos, vários estudos têm comprovado o impacto da presença destes parasitos nas taxas de sobrevivência, no sucesso reprodutivo e até no comportamento das aves hospedeiras (Lachish *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2011; Knowles *et al.*, 2010a; Knowles *et al.*, 2010b; Marzal *et al.*, 2008; Ortego *et al.*, 2008; Moller & Nielsen, 2007).

Fatores de grande influência na relação parasito-hospedeiro são os diversos tipos de estresse a que estão submetidos os animais em cativeiro. Segundo Fowler (1996), o estresse é um fator importante no desencadeamento de doenças em animais silvestres, o que é corroborado pelos estudos que demonstram o papel da elevação do nível de corticosteróides na imunossupressão. As alterações nas funções imunes ocasionadas pelo estresse podem, ainda, aumentar a susceptibilidade do hospedeiro às infecções parasitárias (Ilmonen *et al.*, 2003).

O Brasil é conhecido mundialmente por ser detentor de uma notável biodiversidade, sendo considerado o terceiro país em número de espécies de aves. Ao mesmo tempo, a intensificação de atividades humanas como a expansão das cidades e o aumento da fronteira agrícola, tem gerado forte pressão sobre as áreas naturais dos diversos biomas do país. As principais conseqüências destas ações são a perda e a fragmentação de habitats, acarretando o aumento do número de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2003).

Atualmente, estão em andamento diversas ações que visam reverter o quadro de extinção de algumas espécies. Criações de aves silvestres em cativeiro vêm sendo utilizadas como base para projetos de reintrodução nas áreas anteriormente habitadas por essas espécies. *Crax blumenbachii* (Mutum-do-sudeste), *Crax fasciolata pinima* (Mutum Pinima) e *Aburria jacutinga* (Jacutinga) são aves que já foram consideradas extintas em diversas áreas de sua ocorrência natural. Através de programas pioneiros de reintrodução realizados pela CRAX - Sociedade de Pesquisa, *C. blumenbachii* voltou a povoar algumas áreas do Estado de Minas Gerais, entre elas, as RPPNs Fazenda Macedônia, Peti e o Parque Estadual do Vale do Rio Doce.

Apesar da hematologia e da bioquímica plasmática serem ferramentas fundamentais para a avaliação do estado de saúde das aves, pouco se sabe a respeito desses parâmetros em cracídeos. Reconhecer as possíveis alterações comportamentais e fisiológicas que podem ser ocasionadas pelo parasitismo nestas espécies, pode contribuir de maneira importante no sucesso dos programas de conservação, reabilitação e reintrodução de aves silvestres.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer relações entre o parasitismo por *Plasmodium* spp. e as alterações nos parâmetros hematológicos, na bioquímica plasmática e no perfil eletroforético das proteínas do plasma de *A. jacutinga*, *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* em cativeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a prevalência de parasitismo por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *Aburria jacutinga* em cativeiro, a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos e da amplificação específica dos genes estrutural 18S rRNA e mitocondrial SSU de *Plasmodium* spp.;
- Correlacionar a prevalência de *Plasmodium* spp. às características biológicas (espécie e sexo);
- Avaliar a influência da sazonalidade na prevalência de *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*;
- Determinar valores hematológicos, bioquímicos e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* em cativeiro;
- Determinar possíveis associações entre parasitismo por *Plasmodium* spp. e alterações hematológicas, bioquímicas e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*;
- Determinar as possíveis variações sazonais dos componentes hematológicos, bioquímicos e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas em *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este projeto foi autorizado pelo IBAMA/ICMBio (autorização nº 19964-1) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA – UFMG (documento 228/08 de 12/11/08).

4.2. Áreas de estudo e amostras

Foram utilizadas três áreas de estudo para o estabelecimento dos objetivos do trabalho.

- 1) **CRAX – Sociedade de pesquisa da fauna silvestre.** Sediada em Contagem, na região metropolitana de Belo Horizonte, há 19 anos trabalha com projetos de criação e de manejo de aves ameaçadas de extinção. Desde 1987 já realizou a reintrodução de mais de 650 espécimes e, atualmente, a associação tem área de 60 mil m², 400 viveiros e mais de duas mil aves.

Foi realizada coleta única em junho de 2010, foram amostrados onze machos de *A. jacutinga* e dez fêmeas de *A. jacutinga*.

- 2) **Criatório Conservacionista Poços de Caldas**

Localizado na cidade de Poços de Caldas (MG) possui um plantel de mais de 2000 aves e participa de vários projetos de criação de aves ameaçadas de extinção. Seu plantel conta com 31 exemplares de *C. blumenbachii*, 19 exemplares de *C. fasciolata* e 20 exemplares de *A. jacutinga*.

Foram realizadas quatro coletas com intervalos trimestrais, dos mesmos indivíduos, no período entre setembro de 2009 a junho de 2010: dez machos de *C. blumenbachii*, vinte e uma fêmeas de *C. blumenbachii*, dez machos de *C. fasciolata* e nove fêmeas de *C. fasciolata*.

Foi realizada coleta única de oito machos de *A. jacutinga* e de treze fêmeas de *A. jacutinga* em junho de 2010.

3) **Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte**

A Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte possui uma área de 1 milhão e 750 mil m². Seu plantel é de cerca de 1200 animais, composto por 240 diferentes espécies de anfíbios, aves, mamíferos e répteis.

Atualmente possui cinco casais de *C. blumenbachii*, e um casal de *C. fasciolata*.

Foram realizadas quatro coletas com intervalos trimestrais, dos mesmos indivíduos, num período de um ano entre setembro de 2009 a junho de 2010: cinco machos de *C. blumenbachii*, cinco fêmeas de *C. blumenbachii*, um macho de *C. fasciolata* e uma fêmea de *C. fasciolata*.

As coletas realizadas na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte e no Criatório Conservacionista de Poços de Caldas, totalizaram 41 espécimes de *C. blumenbachii* e 21 espécimes de *C. fasciolata*, de ambos os sexos. Foram realizadas quatro coletas com intervalos trimestrais, totalizando 248 amostras. O período de um ano foi suficiente para cobrir o período reprodutivo e o não reprodutivo.

As amostragens realizadas na CRAX e no Criatório Conservacionista de Poços de Caldas totalizaram 42 espécimes de *A. jacutinga*, de ambos os sexos.

Todas as aves encontravam-se mantidas em cativeiro em pares, abrigadas em recintos de concreto e tela de aço, recebendo água *ad libitum* e ração comercial uma vez ao dia.

4.3.Contenção física

Os espécimes foram capturados com o auxílio de um puçá e, posteriormente, contidos manualmente. Foram realizados coleta de sangue, pesagem e exame clínico.

4.4.Coleta de material para análise

A coleta de sangue foi realizada entre nove e onze horas da manhã para minimizar as variações dos componentes plasmáticos induzidas pelo ciclo cicardiano. A punção venosa foi realizada no máximo 3 minutos após o processo de captura, a fim de se evitar elevações nos níveis de corticóides devido ao estresse da captura. Foram utilizadas agulhas (25x7), acopladas a seringas de três mililitros, seguindo a metodologia de punção da veia ulnar. A quantidade total de sangue coletada por ave foi de 3,0 ml, aproximadamente 0,5-1% do seu peso corporal total (Arctander, 1988). O sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos estéreis, contendo 24mg/ml de heparina; as amostras foram refrigeradas a 4°C logo após a coleta. Cerca de 15µL de sangue, sem anticoagulante, foi coletado para a confecção de esfregaços sanguíneos. Foi coletado aproximadamente 20µL de sangue periférico, armazenado em tubos de microcentrifuga contendo 300µL solução de lise celular (Promega, MA, EUA), mantidos à temperatura ambiente para posterior extração de DNA.

4.5.Esfregaço sanguíneo

Imediatamente após a coleta foram confeccionados três esfregaços sanguíneos por animal, seguindo a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2005). Os esfregaços foram imediatamente secos ao ar, fixados com metanol e então corados com uma solução de GIEMSA em água tamponada (pH 7,2 - 7,4) a uma diluição de 1:10. Foram examinados duzentos campos microscópicos (aumento de 1000X, objetiva de imersão) para a verificação da

presença de hemoparasitos, contagem diferencial de leucócitos e cálculo da parasitemia.

4.6.Hemograma

O sangue total armazenado e refrigerado a 4°C nos tubos de coleta contendo heparina foi utilizado para a contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, determinação de hemoglobina e volume globular. Todos os exames foram realizados dentro de um período máximo de 4 horas após a coleta, sendo o sangue homogeneizado antes do processamento das análises. A contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi realizada manualmente em câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Natt e Herrick (1952). As contagens foram feitas em duplicata e considerada a média dos valores obtidos. A determinação de hemoglobina foi executada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se a solução de Drabkin, com a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda 540 nm. O hematócrito ou volume globular foi realizado segundo técnica descrita por Campbell (1991).

4.7.Extração de DNA

A extração de DNA a partir de sangue armazenado em solução de lise foi realizada de acordo com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega MA, EUA). Aos microtubos contendo vinte microlitros de sangue armazenados em 300 µL de solução de lise celular adicionou-se 1,5µL de solução de Rnase A (4 mg/ml); em seguida, foram incubados a 37°C em banho-maria por 15 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína.

Os tubos foram homogeneizados por 20 segundos e centrifugados a 13.000 - 16.000g por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 300µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente até o aparecimento de fitas brancas de DNA e centrifugados durante 1 minuto, a

13.000 rpm e a temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 300 microlitros de etanol 70% para a lavagem do sedimento e a remoção de traços de sal. Os tubos foram novamente centrifugados por mais 1 minuto, a 13.000 rpm e o líquido presente no tubo foi desprezado e escorrido em papel absorvente. Um volume de 50 µl de solução de re-hidratação de DNA (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) foi adicionado por tubo para a re-suspensão do DNA. O DNA foi armazenado a 4°C até o momento da amplificação.

4.8. Amplificação do gene estrutural 18S rRNA

A amostras do DNA foram processadas por *nested* PCR (nPCR) para a amplificação do gene estrutural 18S rRNA e executada de acordo com Ribeiro *et al.*, (2005). Na primeira reação de amplificação foram utilizados iniciadores *Plasmodium* - específico (rPLU 1 e rPLU 5), sendo o produto desta reação utilizado como “DNA-molde” para uma segunda reação de amplificação, com iniciadores também gênero-específico (rPLU 3 e rPLU4).

As seqüências dos iniciadores utilizados:

rPLU1 → 5' - TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA – 3'

rPLU5 → 5' - CCTGTTGTT GCCTTAAACTCC – 3'

rPLU3 → 5' - TTT TTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT – 3'

rPLU4 → 5' - TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC – 3'

Na primeira reação de amplificação cada tubo recebeu 5 µl do “DNA-molde” e 20 µl de tampão de reação contendo: 10 mM Tris HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 4mM MgCl₂ (PHONEUTRIA); 200 µM dNTP, 2,5 U Taq DNA polimerase; 15 pm/µl de cada iniciador e água ultra pura estéril.

O programa da primeira amplificação consistiu em 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 min. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 4 min. E a extensão final a 72°C por 4 min., finalizando com temperatura de 4°C.

Na segunda reação de amplificação cada tubo recebeu a mesma composição descrita anteriormente modificando apenas a temperatura de anelamento, que foi de 62°C.

4.9. Amplificação do gene mitocondrial SSU

A amostras do DNA foram processadas por PCR simples com a amplificação da região altamente conservada do gene mitocondrial SSU, executada de acordo com Fallon *et al.*, (2003).

As seqüências dos iniciadores utilizados:

343F → 5' - GCTCACGCATCGCTTCT– 3'

496R → 5' - GACCGGTCATTTTCTTTG– 3'

Na reação de amplificação cada tubo recebeu 2 µl do “DNA -molde” e 13 µl de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, (PHONEUTRIA), 2.0-2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.5 U Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA), 0.4mM de cada iniciador e água ultra pura estéril.

O programa da amplificação consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 2 minutos. E a extensão final a 72°C por 3 min., finalizando com temperatura de 4°C.

Os controles positivos utilizados nas reações de PCR são provenientes de DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* (obtidos de pintinhos infectados experimentalmente e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte). Os controles negativos utilizados foram amostras de DNA obtidas de pintinhos mantidos livres de infecção (gentilmente cedido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6%, não desnaturante, em tampão TBE 1X. Os géis de poliacrilamida foram fixados em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corados em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA

evidenciados quando em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (Sanguinetti et al., 1994).

Os dados obtidos pelas duas PCRs foram comparados àqueles obtidos por observação microscópica de esfregaços sanguíneos. As amostras que apresentaram discordância de resultados foram reavaliadas pelos dois métodos.

4.10. Mensurações plasmáticas

Após o processamento das amostras de sangue, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 5 minutos, para a separação do plasma que foi armazenado em tubos de microcentrífuga a -30°C e processado em até 72 horas.

4.10.1. Bioquímica plasmática

As análises de proteína plasmática total (PPT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ácido úrico (AU), creatinina (CREAT), Uréia, Fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH), cálcio (Ca) e fósforo (P), foram realizadas no analisador semi-automático TP-Analyzer Basic – Thermo Plate no Laboratório de Toxicologia Veterinária da UFMG. Foram utilizados reagentes produzidos pela BIOCLIN (QUIBASA - Química Básica Ltda., Brasil) seguindo os protocolos específicos para o analisador automático. A glicose foi mensurada imediatamente após a coleta de sangue, utilizando-se o sangue total (sem anticoagulante), pelo sistema de monitorização de glicemia Accu-check Advantage® (Roche diagnostics – USA).

4.10.2. Eletroforese de proteínas plasmáticas

As frações protéicas pré-albumina, albumina e globulinas foram obtidas através de eletroforese utilizando-se um sistema de eletroforese em gel de

agarose (CELM SDS-60, Brazil). Uma alíquota de 1 μ L da amostra de plasma foi aplicada no gel que foi posteriormente exposto a 100 V durante 30 min. Após decorrido o tempo, o gel foi corado com corante Negro de amido 0,2%, fixado e secado. As bandas foram escaneadas e quantificadas utilizando-se software de análise de imagens específico - Celm SE-250 (CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Brazil). Os valores absolutos (g/dL) das frações protéicas foram determinados com base nos valores de concentração da proteína plasmática total.

4.11. Análise dos dados

Foram realizadas análises univariadas dos dados com o intuito de se determinar a ocorrência de associações entre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos. Os dados obtidos foram analisados utilizando o pacote estatístico Prism for Windows versão 5.0. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar se as amostras possuíam distribuição normal. Como a distribuição seguia um padrão normal, utilizamos o teste-*t* para comparar a diferença entre as médias dos animais parasitados e dos não parasitados. Utilizamos o teste ANOVA para avaliar a variação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação ao tempo entre os grupos negativos e positivos, independentemente e o teste *post-hoc* de Tukey para comparar as variações entre os meses nos respectivos grupos.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as diferentes proporções obtidas para a presença ou a ausência de infecção por plasmódios entre sexos e espécies. O nível de significância para os testes utilizados será de 5%.

5. RESULTADOS

Para o estudo das influências da infecção por *Plasmodium* spp. nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e nos valores das proteínas plasmáticas foram analisadas 104 aves da Família Cracidae divididas em três espécies, quais sejam: *C. blumenbachii* (15 machos e 26 fêmeas), *C. fasciolata* (11 machos e 10 fêmeas) e *A. jacutinga* (19 machos e 23 fêmeas). Totalizando 164 amostras de *C. blumenbachii*, 84 amostras de *C. fasciolata* e 42 amostras de *A. jacutinga* ao longo do período de coleta. Todos os animais apresentavam boas condições clínicas e não foram detectadas anormalidades durante o exame físico.

5.1. Determinação da prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* em cativeiro.

Utilizamos três metodologias para o diagnóstico e determinação de malária aviária (*Plasmodium* spp.) em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* mantidos em cativeiro: análise microscópica de esfregaços sanguíneos, amplificação dos genes estrutural 18S rRNA e mitocondrial SSU de *Plasmodium* spp. Foram considerados infectados os indivíduos que apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das três metodologias utilizadas.

5.1.1. Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii*.

Observa-se na Figura 7 a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. nas amostras de machos e fêmeas de *C. blumenbachii* coletadas na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte e no Criatório Conservacionista de Poços de Caldas durante os meses de setembro, dezembro, março e junho. As comparações das prevalências entre machos e fêmeas foram realizadas através do teste de Qui-quadrado.

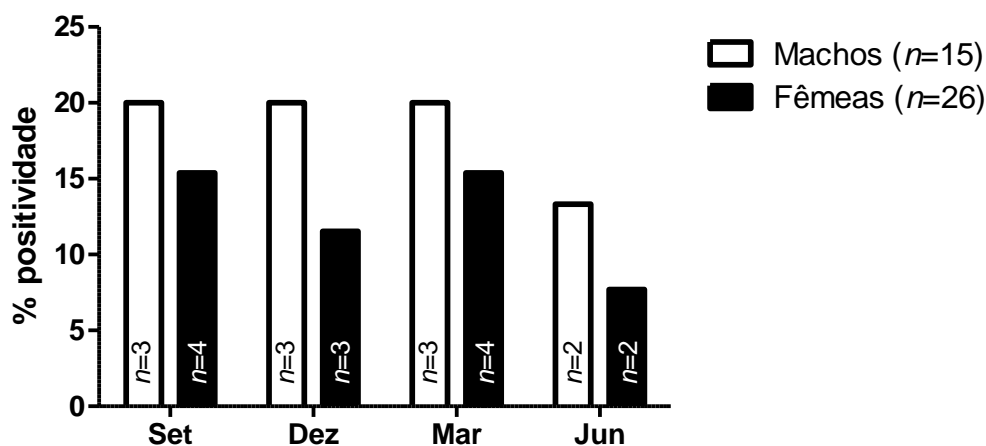


Figura 7. Prevalências de infecção por *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas de *C. blumenbachii* durante o período de um ano; coletas seqüenciais realizadas nos meses de setembro, dezembro, março e junho. Comparação entre as proporções realizadas pelo teste Qui-quadrado.

Os dados da Figura 7 revelam que a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii* variou entre 20% e 13,3% nos machos e entre 15,4% e 7,7% nas fêmeas, durante o ano. Não houve diferença, estatisticamente significativa, nas prevalências de infecção entre machos e fêmeas em nenhuma das coletas realizadas ($P > 0,05$).

5.1.2. Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. fasciolata*.

Na Figura 8 estão representados os dados referentes à prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. nas amostras de machos e fêmeas de *C. fasciolata* coletadas na FZB-BH e no Criatório Poços de Caldas.

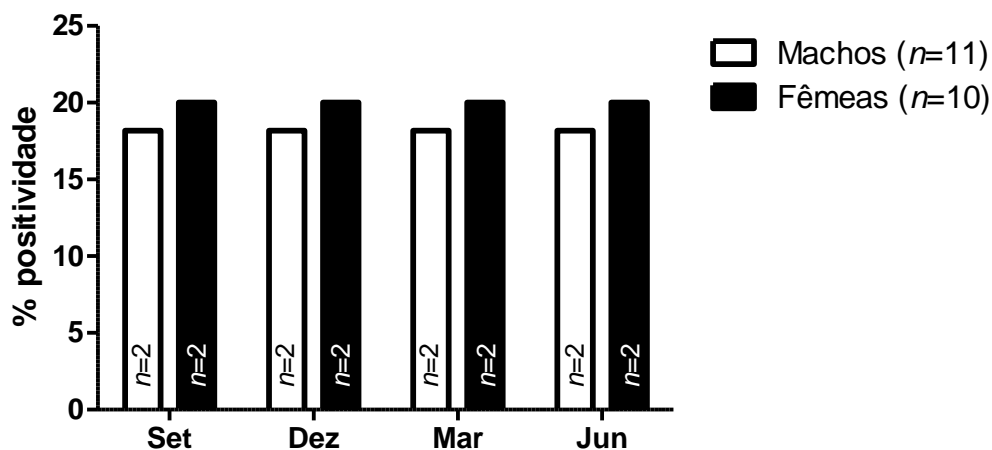


Figura 8. Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas de *C. fasciolata* durante o período de um ano, coletas seqüenciais realizadas nos meses de setembro, dezembro, março e junho. Comparação entre as proporções realizadas pelo teste Qui-quadrado.

Observa-se na Figura 8 que a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. fasciolata* foi de 18,2% nos machos e 20% nas fêmeas. Não ocorreu variação na prevalência em ambos os sexos durante o período estudado. Não houve diferenças significativas entre as prevalências de infecção para machos e fêmeas ($P > 0,05$).

5.1.3. Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *A. jacutinga*

A Figura 9 representa a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *A. jacutinga* nas amostras coletadas na CRAX e no Criatório Poços de Caldas. A prevalência observada foi de 52,6% entre machos e 34,8% entre fêmeas. Não foi constatada diferença, estatisticamente significativa, entre as proporções de machos e de fêmeas parasitados ($P=0,2447$).

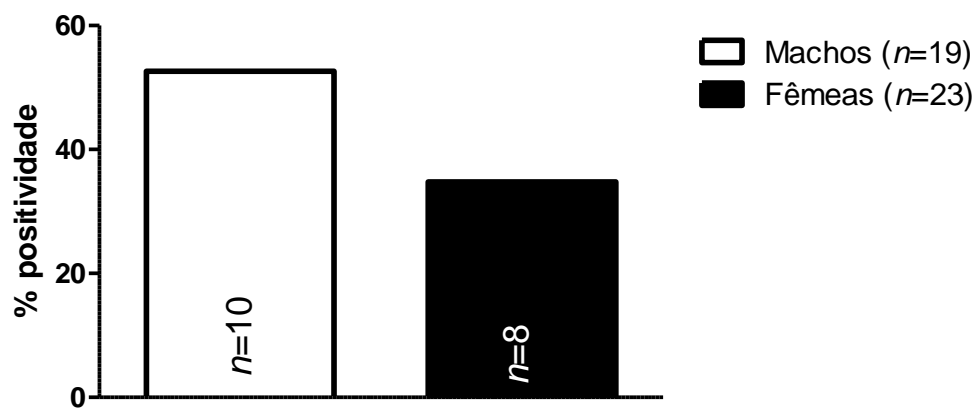


Figura 9. Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas de *A. jacutinga* da CRAX e do Criatório Poços de Caldas. Comparação entre as proporções realizadas pelo teste Qui-quadrado.

5.2. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, comparações entre aves positivas e negativas para infecção por *Plasmodium* spp.

Com o intuito de avaliar as influências da infecção por *Plasmodium* spp. em machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$) de *C. blumenbachii*, foram comparadas as médias das variáveis hematológicas, bioquímicas e dos valores das proteínas plasmáticas, entre as aves parasitadas e não parasitadas. As comparações abrangeram o período de um ano, suficiente para retratar as flutuações sazonais relativas ao período reprodutivo e não reprodutivo de *C. blumenbachii*, assim como as variações das estações de chuva e de seca. Infelizmente, não foi possível demonstrar as diferenças entre os períodos de fartura e de restrição alimentar aos quais estão expostos os indivíduos mantidos na natureza, uma vez que em cativeiro a oferta de alimentos é contínua e balanceada. Optamos por unir os indivíduos num só grupo, após comparações estatísticas dos valores hematológicos das aves do plantel da FZB-BH e do Criatório Poços de Caldas, para possibilitar a análise de um número maior de aves. Foi utilizado o teste-*t* para a comparação entre as médias dos animais positivos e negativos em cada coleta. Utilizamos o teste ANOVA para avaliar a existência de variação anual dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e das proteínas plasmáticas nos grupos negativos ou positivos independentemente; o teste *post-hoc* de Tukey foi usado para indicar entre quais meses ocorreram as diferenças responsáveis pela variação.

5.2.1. Comparações entre os valores médios do eritrograma de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 10 (A, B, C, D e E) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios do eritrograma de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 10 (A e B) representa os valores de hematócrito para machos e fêmeas respectivamente. Através do teste de ANOVA e Tukey não foram observadas variações e diferenças, estatisticamente significativas, dos valores

médios de hematócrito entre os meses de setembro, dezembro, março e junho, em ambos os grupos: machos negativos, machos positivos, fêmeas negativas e fêmeas positivas. Os dados da Figura 10A mostram diferenças, estatisticamente significativas, entre os indivíduos parasitados e não parasitados nos meses de dezembro ($P=0,0479$) e junho ($P=0,0398$): machos negativos apresentaram médias superiores aos positivos. Nas fêmeas (Figura 10) não foram observadas variações ou diferenças significativas entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado.

As comparações entre os valores médios da contagem total de eritrócitos de *C. blumenbachii*, positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. estão representadas na Figura 10 (C e D). Os indivíduos machos na Figura 10C e as fêmeas na Figura 10D. Foram observadas variações, estatisticamente significativas, nos valores médios de eritrócitos dos machos parasitados durante o período analisado ($P=0,0406$); uma diferença significativa ocorreu entre o mês de março e junho. Os dados da Figura 10C mostram diferenças, estatisticamente significativas, entre os indivíduos parasitados e não parasitados nos meses de dezembro ($P=0,0489$) e março ($P=0,0333$): os machos parasitados apresentam valores inferiores aos dos não parasitados. Na Figura 10D não foram observadas variações, estatisticamente significativas, entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado.

Os dados da Figura 10 (E e F) mostram as comparações entre os valores médios de hemoglobina de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. Os indivíduos machos estão representados na Figura 8E e as fêmeas na Figura 10F. Não foram observadas variações, estatisticamente significativas, dos valores médios de hemoglobina entre os meses de setembro, dezembro, março e junho em ambos os sexos. Os dados da Figura 10E mostram uma diferença, estatisticamente significativa, entre o grupo de machos parasitados e não parasitados no mês de junho ($P=0,0446$): machos parasitados apresentaram valores de hemoglobina inferiores aos dos não parasitados. Percebe-se, entretanto, uma tendência à manutenção das médias de hemoglobina com valores inferiores nos machos parasitados, quando comparadas aos machos não parasitados. Não foram observadas nas

fêmeas (Figura 10F) variações significativas entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado.

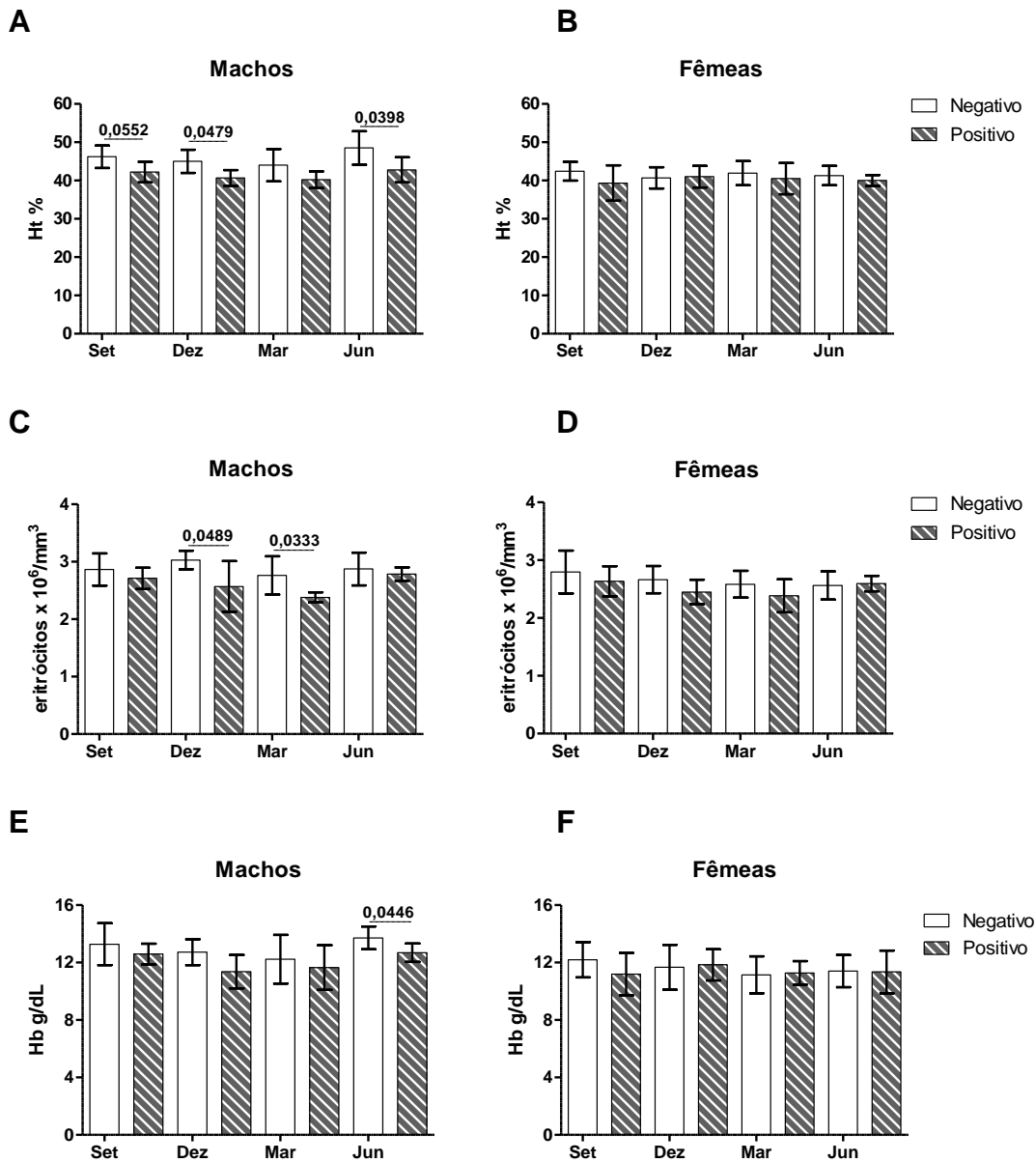


Figura 10. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Ht (%) (A e B), Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) (C e D) e Hb (g/dL) (E e F) entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste- t .

5.2.2. Comparações entre os valores médios do leucograma de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 11 (A e B) mostra a variação anual e as comparações entre os valores médios da contagem total de leucócitos de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. Os indivíduos machos estão representados na Figura 11A e as fêmeas na Figura 11B.

Na Figura 11A foi observada variação, estatisticamente significativa, nos valores médios de leucócitos em machos não parasitados durante o período analisado ($P=0,0191$): uma diferença significativa ocorreu entre o mês de setembro e março. Nos machos positivos também se observou variação significativa dos leucócitos durante o ano ($P=0,0038$): diferenças significativas ocorreram entre setembro e dezembro, setembro e março e, ainda, entre dezembro e junho. Os dados da Figura 11A mostram diferença, estatisticamente significativa, entre o grupo de machos parasitados e não parasitados no mês de dezembro ($P=0,0160$): machos parasitados apresentam valores de leucócitos inferiores aos dos não parasitados. Percebeu-se uma sensível depressão nas contagens de leucócitos dos machos entre os meses de dezembro e março.

Nas fêmeas (Figura 11B) não foram observadas variações significativas entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado, porém, observa-se nas fêmeas negativas uma tendência à diminuição das médias de contagens de leucócitos no decorrer de setembro a junho.

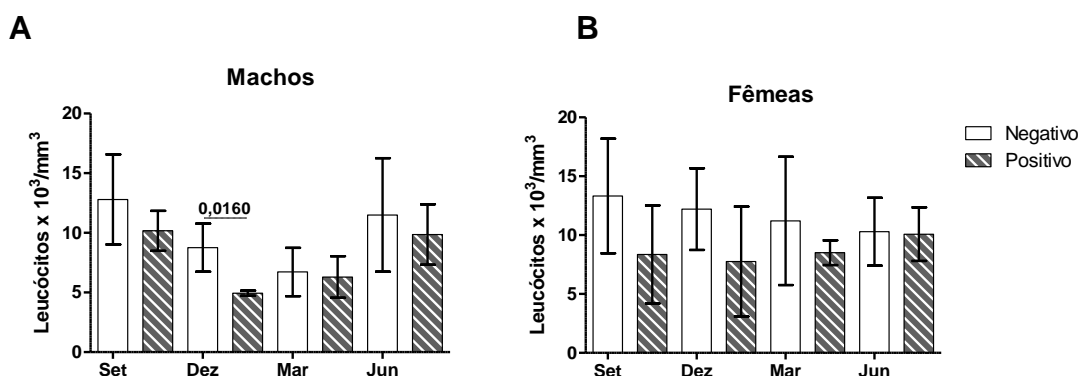


Figura 11. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (A e B), entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

A Tabela 1 apresenta e compara os dados relativos à contagem absoluta de linfócitos e heterófilos dos grupos negativos e positivos de machos e de fêmeas de *C. blumenbachii*.

Observou-se diferença significativa entre machos positivos e negativos no mês de dezembro ($P=0,0158$), onde a média de linfócitos é inferior nos animais parasitados. Nos demais meses esta tendência se mantém entre os grupos. Percebeu-se variação, estatisticamente significativa, nas contagens de linfócitos dos machos negativos durante o ano ($P=0,0379$), com diferença significativa entre o mês de setembro e março. Nos machos positivos também ocorreram variações ao longo do ano ($P=0,0022$), com diferenças entre os meses de setembro e dezembro, setembro e março, dezembro e março e março e junho. As médias de linfócitos nos indivíduos machos acompanham a mesma tendência observada na contagem de leucócitos - nos meses de dezembro e março houve uma sensível diminuição. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas médias de linfócitos entre fêmeas parasitadas e não parasitadas.

Nas contagens de heterófilos não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, entre os grupos estudados, porém, percebeu-se que em alguns meses, como setembro e março nos machos e setembro nas fêmeas, as médias de heterófilos são discretamente mais altas nos animais negativos, contrariando a tendência geral observada nos leucócitos.

Tabela 1. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e Heterófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Linfócitos						Heterófilos					
	Macho (n=15)			Fêmea (n=26)			Macho (n=15)			Fêmea (n=26)		
	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]
Setembro	10,110 \pm 3,567	7,550 \pm 1,390	0,173	11,040 \pm 4,744	6,340 \pm 3,656	0,211	1,926 \pm 0,324	2,026 \pm 0,765	0,793	1,571 \pm 0,372	1,600 \pm 0,262	0,919
Dezembro	6,846 \pm 1,719	3,468 \pm 0,764	0,015	9,652 \pm 3,086	5,693 \pm 4,550	0,117	1,594 \pm 0,342	1,202 \pm 0,664	0,265	1,922 \pm 0,795	1,617 \pm 0,068	0,604
Março	5,432 \pm 1,799	4,479 \pm 1,398	0,387	9,015 \pm 5,002	7,286 \pm 1,162	0,563	1,069 \pm 0,624	1,474 \pm 0,192	0,246	1,717 \pm 0,783	1,057 \pm 0,320	0,168
Junho	8,826 \pm 3,622	7,742 \pm 1,822	0,560	8,095 \pm 2,494	7,352 \pm 0,103	0,686	2,017 \pm 1,102	1,674 \pm 0,623	0,554	1,693 \pm 1,137	2,258 \pm 2,026	0,540
<i>P</i>[*]	0,037	0,002		0,269	0,900		0,088	0,324		0,328	0,426	

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]), variação anual das médias calculadas por ANOVA (*P*^{*})

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados relativos à contagem absoluta de eosinófilos e monócitos dos grupos negativos e positivos de machos e de fêmeas de *C. blumenbachii*.

Não foram constatadas diferenças, estatisticamente significativas, na contagem de eosinófilos entre os grupos observados.

Na contagem absoluta de monócitos percebeu-se variação, estatisticamente significativa, no grupo dos machos negativos durante o ano ($P=0,0016$), com diferença significativa entre os meses de setembro e dezembro, dezembro e março, dezembro e junho e entre março e junho. As médias de monócitos nos machos acompanham a tendência observada na contagem de leucócitos, onde se observou uma diminuição das médias nos meses de dezembro e março. No grupo das fêmeas negativas observou-se variação anual, estatisticamente significativa, na contagem de monócitos ($P=0,0129$); houve diferença significativa no mês de setembro em relação aos meses de março e junho, que apresentaram médias inferiores.

Tabela 2. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Eosinófilos						Monócitos					
	Macho (n=15)			Fêmea (n=26)			Macho (n=15)			Fêmea (n=26)		
	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]	Negativo	Positivo	<i>P</i> [#]
Setembro	0,349 \pm 0,043	0,307 \pm 0,121	0,490	0,296 \pm 0,286	0,219 \pm 0,171	0,723	0,409 \pm 0,176	0,261 \pm 0,208	0,258	0,411 \pm 0,235	0,201 \pm 0,077	0,245
Dezembro	0,158 \pm 0,141	0,139 \pm 0,771	0,841	0,327 \pm 0,313	0,191 \pm 0,799	0,561	0,111 \pm 0,772	0,127 \pm 0,019	0,733	0,252 \pm 0,192	0,255 \pm 0,106	0,985
Março	0,121 \pm 0,118	0,237 \pm 0,297	0,372	0,262 \pm 0,160	0,194 \pm 0,083	0,426	0,098 \pm 0,114	0,099 \pm 0,082	0,993	0,201 \pm 0,143	0,092 \pm 0,102	0,220
Junho	0,226 \pm 0,278	0,251 \pm 0,164	0,865	0,310 \pm 0,127	0,154 \pm 0,217	0,139	0,426 \pm 0,244	0,175 \pm 0,119	0,066	0,192 \pm 0,208	0,287 \pm 0,173	0,545
<i>P</i>[*]	0,153	0,674		0,741	0,971		0,0016	0,3640		0,0129	0,3528	

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]), variação anual das médias calculadas por ANOVA (*P*^{*})

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados relativos à contagem absoluta de basófilos, dos grupos negativos e positivos, de machos e de fêmeas de *C. blumenbachii*. Não foi possível realizar o teste-*t* devido à ausência de valores para alguns grupos. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, entre os grupos observados.

Tabela 3. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Basófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

Basófilos						
	Macho (<i>n</i> =15)		<i>P</i> [#]	Fêmea (<i>n</i> =26)		<i>P</i> [#]
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Setembro	0	0,022 \pm 0,030	-	0,004 \pm 0,015	0	-
Dezembro	0,049 \pm 0,077	0	-	0,021 \pm 0,048	0	-
Março	0	0,008 \pm 0,016	-	0,010 \pm 0,034	0	-
Junho	0	0,013 \pm 0,028	-	0	0,027 \pm 0,038	-
<i>P</i>[*]	0,0996	0,6434		0,3051	0,3208	

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]), variação anual das médias calculadas por ANOVA (*P*^{*})

5.2.3. Comparações entre os valores médios de trombócitos de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 12 mostra as comparações entre os valores médios de trombócitos de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. Os indivíduos machos estão representados na Figura 12A e as fêmeas na Figura 12B.

Há variação, estatisticamente significativa, nos valores médios de trombócitos nos machos não parasitados durante o período analisado ($P=0,0099$). Foi observada uma diferença significativa entre o mês de dezembro e junho.

Nas fêmeas (Figura 12B) não foram observadas variações significativas entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado.

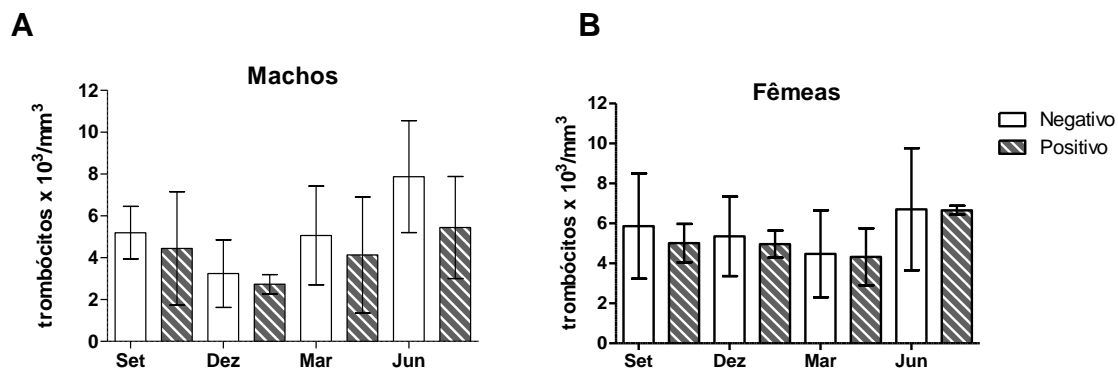


Figura 12. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de trombócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (A e B), entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

5.2.4. Comparações entre os parâmetros bioquímicos de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 13 (A, B, C, D, E e F) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de PPT, AST e ALT de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 13 (A e B) estão representadas as médias de PPT para machos e fêmeas, respectivamente. Observou-se variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de PPT no grupo dos machos negativos ($P=0,0469$); a diferença ocorreu entre o mês de dezembro e março. Na Figura 13B não se encontrou variação significativa das médias ao longo do ano. Não foram observadas diferenças entre o grupo de animais negativos e positivos, machos ou fêmeas.

As médias para AST dos grupos de machos e de fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 13 (C e D). Na Figura 13C observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0479$) e a diferença ocorreu entre dezembro e março; no mês de junho o grupo de machos positivos apresentou média de AST superior a observada nos machos negativos ($P=0,0481$). Na Figura 13D observou-se variação anual significativa no grupo das fêmeas negativas ($P=0,0024$) e a diferença ocorreu entre setembro e março; no mês de março as fêmeas positivas apresentaram média de AST superior à observada nas fêmeas negativas ($P=0,0010$).

A Figura 13 (E e F) representa as médias de ALT para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 13E não se identificou variação anual das médias nos grupos de machos; no entanto, no mês de junho ocorreu diferença significativa entre as médias dos negativos e dos positivos ($P=0,0087$) e os últimos apresentaram valor superior. Na Figura 13F observou-se variação anual significativa ($P=0,0050$) no grupo das fêmeas positivas entre os meses de setembro e março e entre setembro e junho. As fêmeas negativas apresentaram variação anual ($P=0,0032$), com diferença entre o mês de setembro e dezembro. As fêmeas do grupo positivo apresentaram médias de ALT significativamente superiores nos meses de março ($P=0,0098$) e junho ($P=0,0101$).

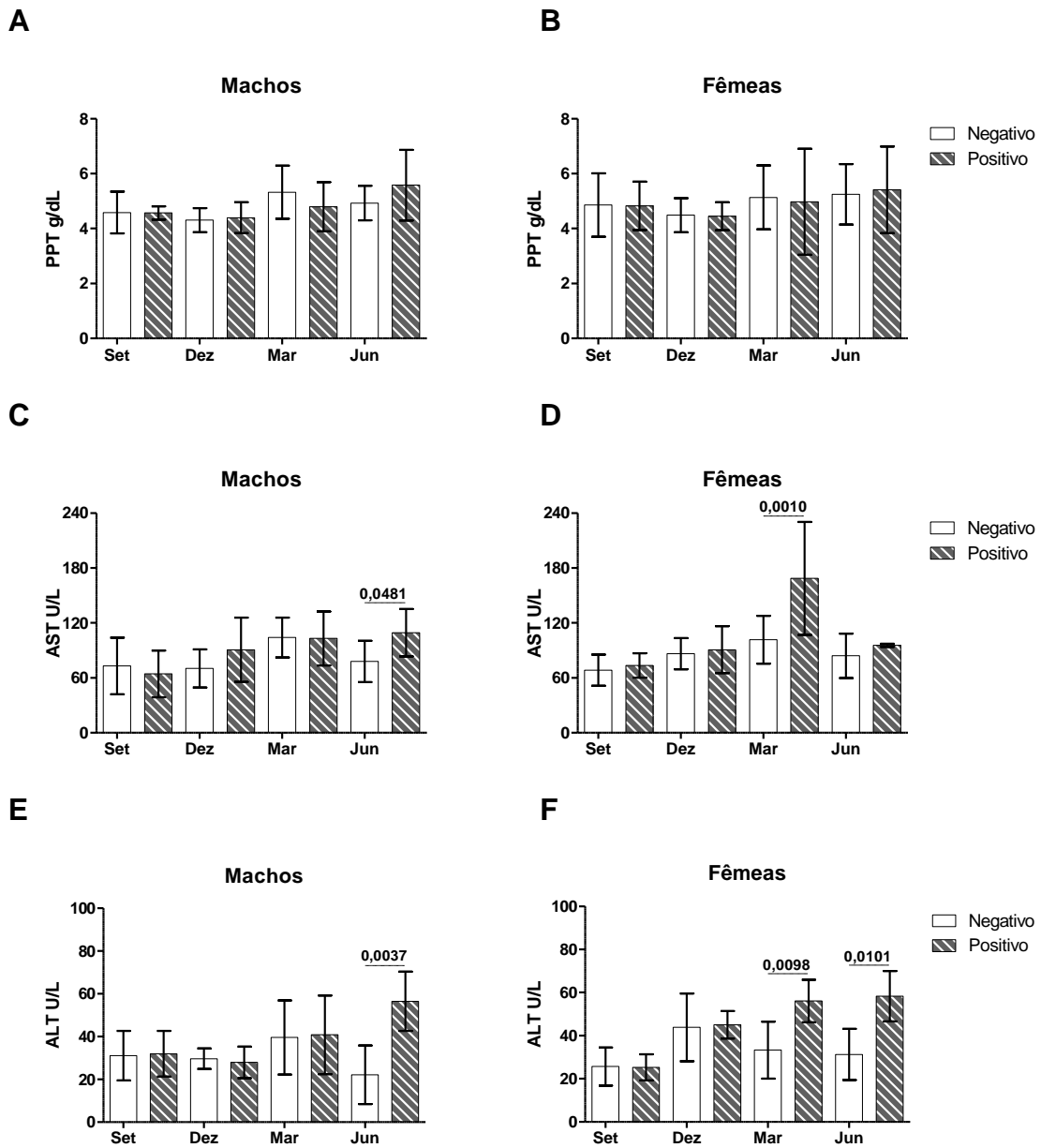


Figura 13. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de PPT (g/dL) (A e B), AST (U/L) (C e D) e ALT (U/L) (E e F) entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo ; machos (n=15) e fêmeas (n=26). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-t.

A Figura 14 (A, B, C, D, E e F) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de AU, CREAT e Uréia de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 14 (A e B) estão representadas as médias de AU para machos e fêmeas, respectivamente. Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de AU dos grupos. Também não se identificou diferença significativa entre animais positivos e negativos, em ambos os sexos.

As médias para CREAT dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 14 (C e D). Na Figura 14C observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0017$) e as diferenças ocorreram entre dezembro e março e entre dezembro e junho. Não se observou diferença significativa entre animais positivos e negativos, em ambos os sexos.

A Figura 14 (E e F) representa as médias de Uréia para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 14E observou-se variação anual das médias nos grupos de machos negativos ($P=0,0457$) e ocorreu uma diferença entre o mês de setembro e março; não houve diferença, estatisticamente significativa, entre machos positivos e negativos. Na Figura 14F observou-se variação anual significativa ($P=0,0034$) no grupo das fêmeas e a diferença ocorreu entre os meses de setembro e dezembro e entre dezembro e março; não ocorreu diferença significativa entre fêmeas positivas e negativas.

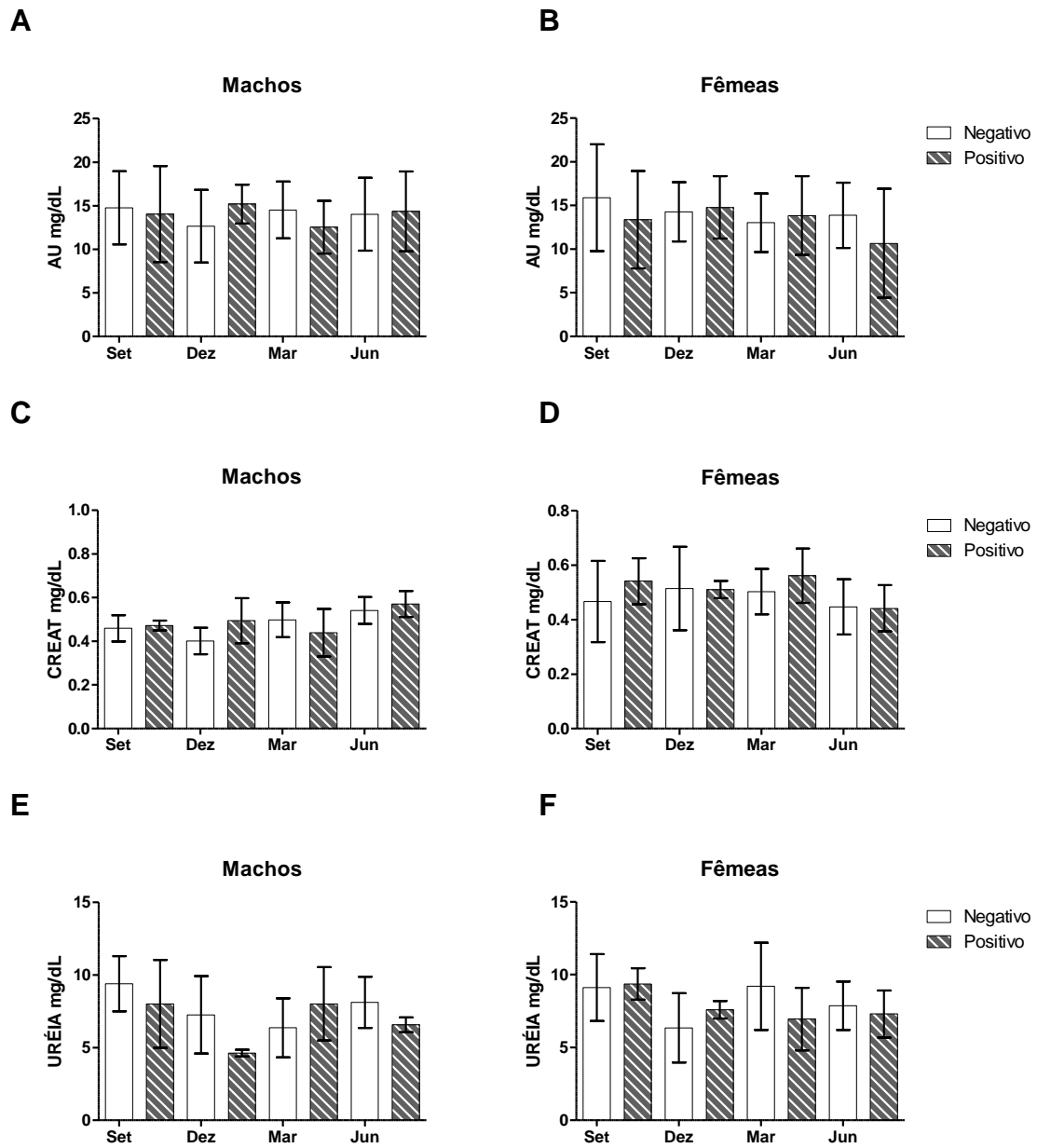


Figura 14. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de AU (mg/dL) (A e B), CREAT (mg/dL) (C e D) e Uréia (mg/dL) (E e F) entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste- t .

A Figura 15 (A, B, C, D, E e F) exibe a variação anual e as comparações entre os valores médios de Ca, P e FA de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 15 (A e B) apresenta as médias de Ca para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 15A não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de Ca dos grupos negativo ou positivo e também não ocorreram diferenças entre as médias. Na FIGURA 15B observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,002$); as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro, entre setembro e março e entre setembro e junho. Não foram observadas diferenças entre as médias do grupos negativo e positivo.

As médias para P dos grupos dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 15 (C e D). Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de P dos grupos avaliados. Também não se identificou diferença significativa entre animais positivos e negativos em ambos os sexos.

A Figura 15 (E e F) representa as médias de FA para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 15E não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de FA dos grupos negativo ou positivo e também não ocorreram diferenças entre as médias. Na Figura 15F observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0392$); as diferenças ocorreram entre março e junho e não ocorreu diferença, estatisticamente significativa, entre fêmeas negativas e positivas.

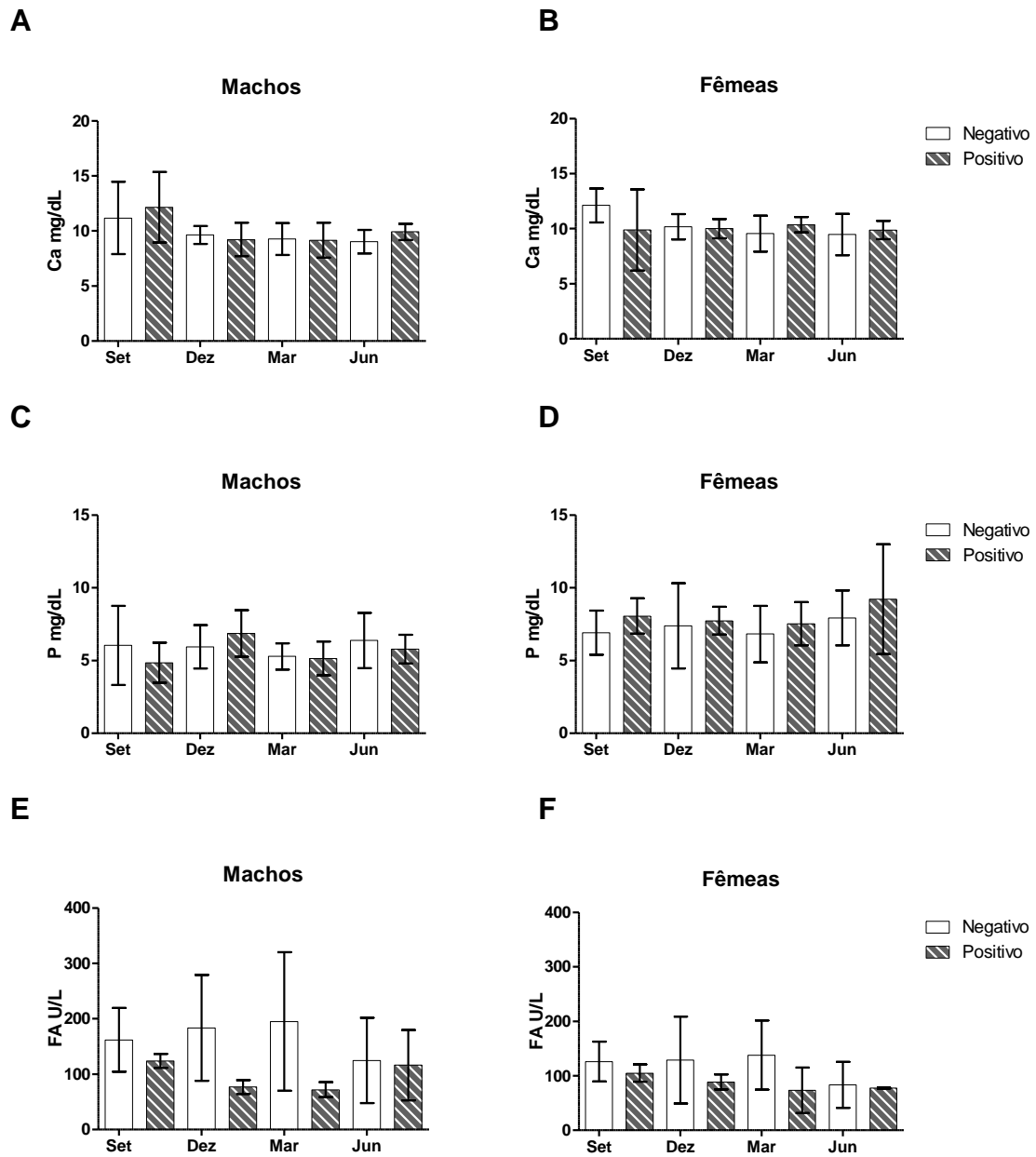


Figura 15. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Ca (mg/dL) (A e B), P (mg/dL) (C e D) e FA (U/L) (E e F) entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

A Figura 16 (A, B, C e D) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de LDH e Glicose em *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 16 (A e B) exibe as médias de LDH para machos e fêmeas, respectivamente. Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de LDH no grupo de machos negativos ou positivos (Figura 16A) e também não ocorreu diferença entre grupos. Na Figura 16B observou-se variação anual significativa ($P=0,0411$) no grupo das fêmeas negativas e a diferença ocorreu entre setembro e dezembro.

As médias para Glicose dos grupos dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 16 (C e D). Na Figura 16C observou-se variação anual significativa ($P=0,0400$) no grupo negativo; as diferenças ocorreram entre setembro e junho, e entre março e junho; Não ocorreram diferenças entre as médias dos machos negativos e positivos. Na Figura 16D observou-se variação anual significativa ($P=0,0372$) no grupo das fêmeas negativas e a diferença ocorreu entre dezembro e março; no mês de junho as fêmeas positivas apresentaram média de glicose superior a observada nas fêmeas negativas ($P=0,0433$).

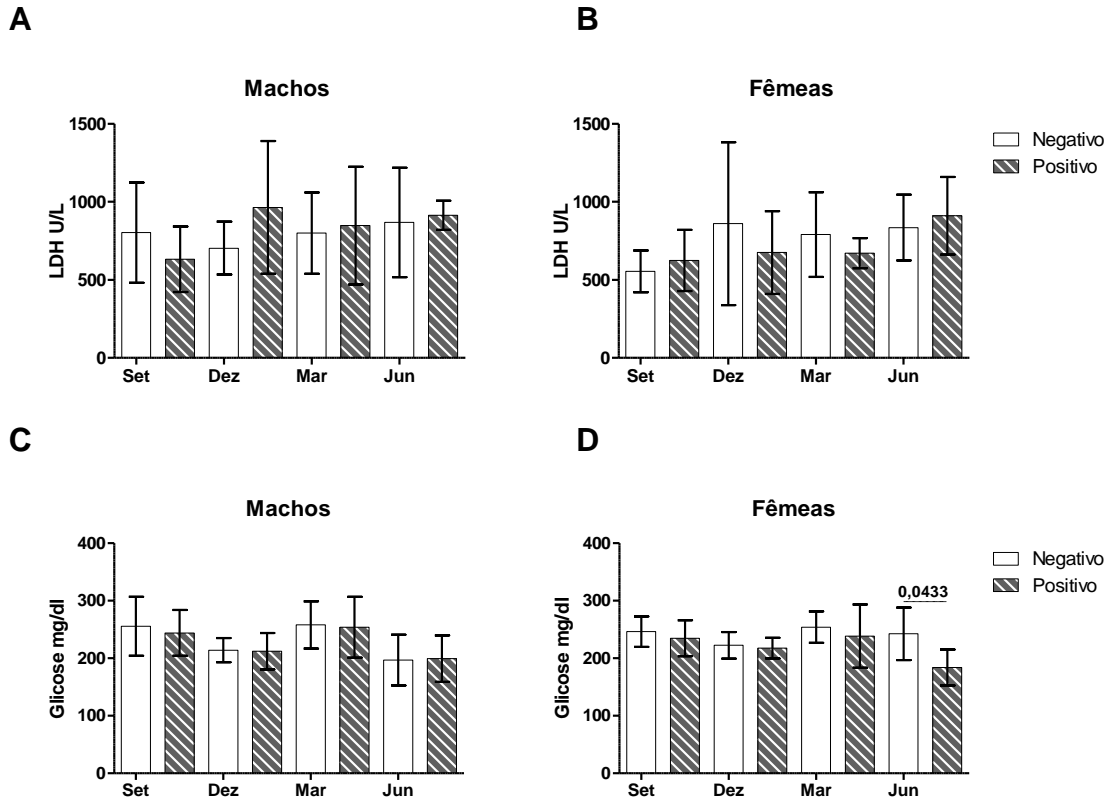


Figura 16. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de LDH (U/L) (A e B) e Glicose (mg/dL) (C e D) entre *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=15$) e fêmeas ($n=26$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

5.2.5. Eletroforese das proteínas plasmáticas: comparações dos valores das frações protéicas de *C. blumenbachii* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Tabela 4 apresenta a variação anual e as comparações dos valores médios de Pré-albumina, Albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina em machos da espécie *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp.

Observou-se no grupo de animais negativos variação anual significativa, com diferenças entre as médias mensais para as seguintes variáveis: β_2 -globulina entre setembro e março e entre dezembro e março; γ -globulina entre setembro e junho e entre dezembro e junho.

O grupo de animais positivos apresentou variação anual com diferenças entre as médias mensais nas seguintes variáveis: α_2 -globulina entre setembro e junho; β_2 -globulina entre setembro e junho e entre dezembro e junho.

No mês de junho os animais positivos apresentaram valores de α_2 -globulina ($P=0,016$), β_1 -globulina ($P=0,019$) e β_2 -globulina ($P=0,010$) significativamente superiores aos observados no grupo negativo no mesmo mês.

Na Tabela 5 está representada a variação anual e as comparações dos valores médios de Pré-albumina, Albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina em fêmeas da espécie *C. blumenbachii* parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp. Observou-se no grupo de animais negativos variação anual significativa, com diferenças entre as médias mensais, para as seguintes variáveis: β_1 -globulina entre os meses de setembro e março; γ -globulina entre setembro e junho. Não foram observadas diferenças, estatisticamente relevantes, entre fêmeas negativas e positivas.

Tabela 4. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Pré-albumina (g/dL), Albumina (g/dL), α_1 - globulina (g/dL), α_2 - globulina (g/dL), β_1 -globulina (g/dL), β_2 -globulina (g/dL) e γ -globulina (g/dL) em machos ($n=15$) da espécie *C. blumenbachii* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp.

	Setembro		Dezembro		Março		Junho		Setembro-junho					
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo				
			$P^\#$		$P^\#$		$P^\#$		$P^\#$	P^*	P^*			
Pré-alb	0,20 \pm 0,04	0,20 \pm 0,09	0,968	0,16 \pm 0,05	0,15 \pm 0,03	0,624	0,22 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03	0,273	0,17 \pm 0,05	0,19 \pm 0,03	0,545	0,105	0,653
Alb	2,42 \pm 0,45	2,14 \pm 0,10	0,337	2,27 \pm 0,13	2,19 \pm 0,16	0,575	2,65 \pm 0,60	2,47 \pm 0,33	0,643	2,37 \pm 0,40	2,23 \pm 0,03	0,664	0,360	0,290
α_1-glob	0,31 \pm 0,12	0,28 \pm 0,03	0,629	0,23 \pm 0,07	0,25 \pm 0,04	0,631	0,31 \pm 0,09	0,27 \pm 0,08	0,488	0,27 \pm 0,07	0,37 \pm 0,17	0,236	0,235	0,467
α_2-glob	0,14 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	0,536	0,13 \pm 0,04	0,16 \pm 0,04	0,315	0,18 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,445	0,14 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	0,016	0,106	0,028
β_1-glob	0,19 \pm 0,14	0,17 \pm 0,07	0,831	0,12 \pm 0,07	0,13 \pm 0,02	0,794	0,17 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,111	0,14 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02	0,019	0,430	0,110
β_2-glob	0,18 \pm 0,04	0,18 \pm 0,02	0,869	0,23 \pm 0,06	0,24 \pm 0,02	0,769	0,35 \pm 0,10	0,29 \pm 0,12	0,420	0,27 \pm 0,07	0,50 \pm 0,09	0,010	0,002	0,011
γ-glob	1,16 \pm 0,25	1,47 \pm 0,37	0,187	1,16 \pm 0,18	1,28 \pm 0,18	0,384	1,44 \pm 0,20	1,30 \pm 0,10	0,393	1,57 \pm 0,23	1,84 \pm 0,07	0,170	0,005	0,151

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* ($P^\#$), variação anual das médias calculadas por ANOVA (P^*)

Tabela 5. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Pré-albumina (g/dL), Albumina (g/dL), α_1 - globulina (g/dL), α_2 - globulina (g/dL), β_1 -globulina (g/dL), β_2 -globulina (g/dL) e γ -globulina (g/dL) em fêmeas ($n=26$) da espécie *C. blumenbachii* parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp.

	Setembro		Dezembro		Março		Junho		Setembro-junho					
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo				
			$P^\#$		$P^\#$		$P^\#$		$P^\#$	P^*	P^*			
Pré-alb	0,15 \pm 0,06	0,14 \pm 0,07	0,976	0,12 \pm 0,05	0,15 \pm 0,08	0,401	0,13 \pm 0,04	0,13 \pm 0,03	0,887	0,12 \pm 0,05	0,19 \pm 0,03	0,066	0,185	0,702
Alb	2,59 \pm 0,78	2,52 \pm 0,48	0,864	2,11 \pm 0,26	1,96 \pm 0,28	0,474	2,57 \pm 0,60	2,29 \pm 0,35	0,374	2,51 \pm 0,64	2,29 \pm 0,12	0,634	0,081	0,330
α_1 -glob	0,31 \pm 0,10	0,33 \pm 0,09	0,731	0,26 \pm 0,08	0,28 \pm 0,03	0,578	0,30 \pm 0,12	0,31 \pm 0,16	0,928	0,30 \pm 0,10	0,41 \pm 0,23	0,228	0,420	0,757
α_2 -glob	0,20 \pm 0,05	0,20 \pm 0,05	0,969	0,19 \pm 0,06	0,15 \pm 0,03	0,326	0,16 \pm 0,05	0,13 \pm 0,08	0,254	0,17 \pm 0,08	0,23 \pm 0,05	0,404	0,341	0,250
β_1 -glob	0,23 \pm 0,07	0,27 \pm 0,14	0,452	0,18 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03	0,984	0,15 \pm 0,06	0,12 \pm 0,07	0,484	0,19 \pm 0,08	0,20 \pm 0,11	0,830	0,010	0,275
β_2 -glob	0,21 \pm 0,06	0,23 \pm 0,02	0,515	0,21 \pm 0,07	0,26 \pm 0,09	0,317	0,25 \pm 0,07	0,38 \pm 0,37	0,123	0,27 \pm 0,10	0,28 \pm 0,12	0,886	0,095	0,811
γ -glob	1,17 \pm 0,27	1,13 \pm 0,29	0,794	1,43 \pm 0,43	1,46 \pm 0,64	0,900	1,59 \pm 0,58	1,62 \pm 1,04	0,921	1,69 \pm 0,46	1,81 \pm 0,98	0,755	0,016	0,722

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* ($P^\#$), variação anual das médias calculadas por ANOVA (P^*)

5.3. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. fasciolata*, comparações entre aves positivas e negativas para infecção por *Plasmodium* spp.

Foram comparadas as médias das variáveis hematológicas, bioquímicas e dos valores das proteínas plasmáticas entre as aves parasitadas e não parasitadas com o intuito de avaliar as influências da infecção por *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas de *C. fasciolata*. As comparações abrangeram o período de um ano, suficiente para retratar as flutuações sazonais relativas ao período reprodutivo e não reprodutivo de *C. fasciolata*, assim como as variações das estações de chuva e de seca. Infelizmente, não foi possível demonstrar as diferenças entre os períodos de fartura e de restrição alimentar aos quais estão expostos os indivíduos mantidos na natureza, uma vez que em cativeiro a oferta de alimentos é contínua e balanceada.

Optamos por unir os indivíduos num só grupo para possibilitar a análise de um número maior de aves após comparações estatísticas dos valores hematológicos das aves do plantel da FZB-BH e do Criatório Poços de Caldas.

5.3.1. Comparações entre os valores médios do eritrograma de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 17 (A, B, C, D, E e F) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios do eritrograma de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 17 (A e B) representa os valores de Ht para machos e fêmeas, respectivamente. Os dados da Figura 17A mostram diferença, estatisticamente significativa, entre os indivíduos parasitados e não parasitados no mês de março ($P=0,0153$), onde os machos positivos apresentaram valores inferiores aos machos negativos. Notou-se que esta tendência é perceptível nos outros meses analisados. Foi observada variação, estatisticamente significativa, no valor médio de Ht de machos negativos durante o período analisado ($P=0,0056$): uma diferença significativa ocorreu entre o mês de setembro e dezembro. Nas fêmeas (Figura 17B) não foram observadas variações

significativas entre os grupos positivos e negativos no decorrer do período analisado.

As comparações entre os valores médios da contagem total de eritrócitos de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. estão representadas na Figura 17 (C e D), machos e fêmeas, respectivamente. Os dados da Figura 17C mostram diferenças, estatisticamente significativas, entre os indivíduos parasitados e não parasitados nos meses de dezembro ($P=0,0372$) e março ($P=0,0308$): os machos parasitados apresentam valores inferiores aos dos não parasitados. Observa-se que a tendência se repete nos outros meses analisados. Na Figura 17D não foram observadas variações, estatisticamente significativas, entre os grupos positivos e negativos. Observou-se variação, estatisticamente significativa, no valor médio de eritrócitos nas fêmeas negativas durante o período analisado ($P=0,0254$): ocorreu uma diferença significativa entre o mês de dezembro e junho.

A Figura 17 (E e F) apresenta as comparações entre os valores médios de Hb de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. Os indivíduos machos estão representados na Figura 17E e as fêmeas na Figura 17F. Na Figura 17E observou-se variação, estatisticamente significativa, no valor médio de hemoglobina no grupo de animais negativos durante o período analisado ($P=0,0162$); uma diferença significativa ocorreu entre o mês de setembro e dezembro. Foi observada diferença significativa no valor de Hb entre machos positivos e negativos no mês de março ($P=0,0106$): os animais negativos apresentaram média superior à observada nos animais positivos. Na Figura 17F não se observou variação anual nem diferenças, estatisticamente significativas, entre as médias das fêmeas de ambos os grupos.

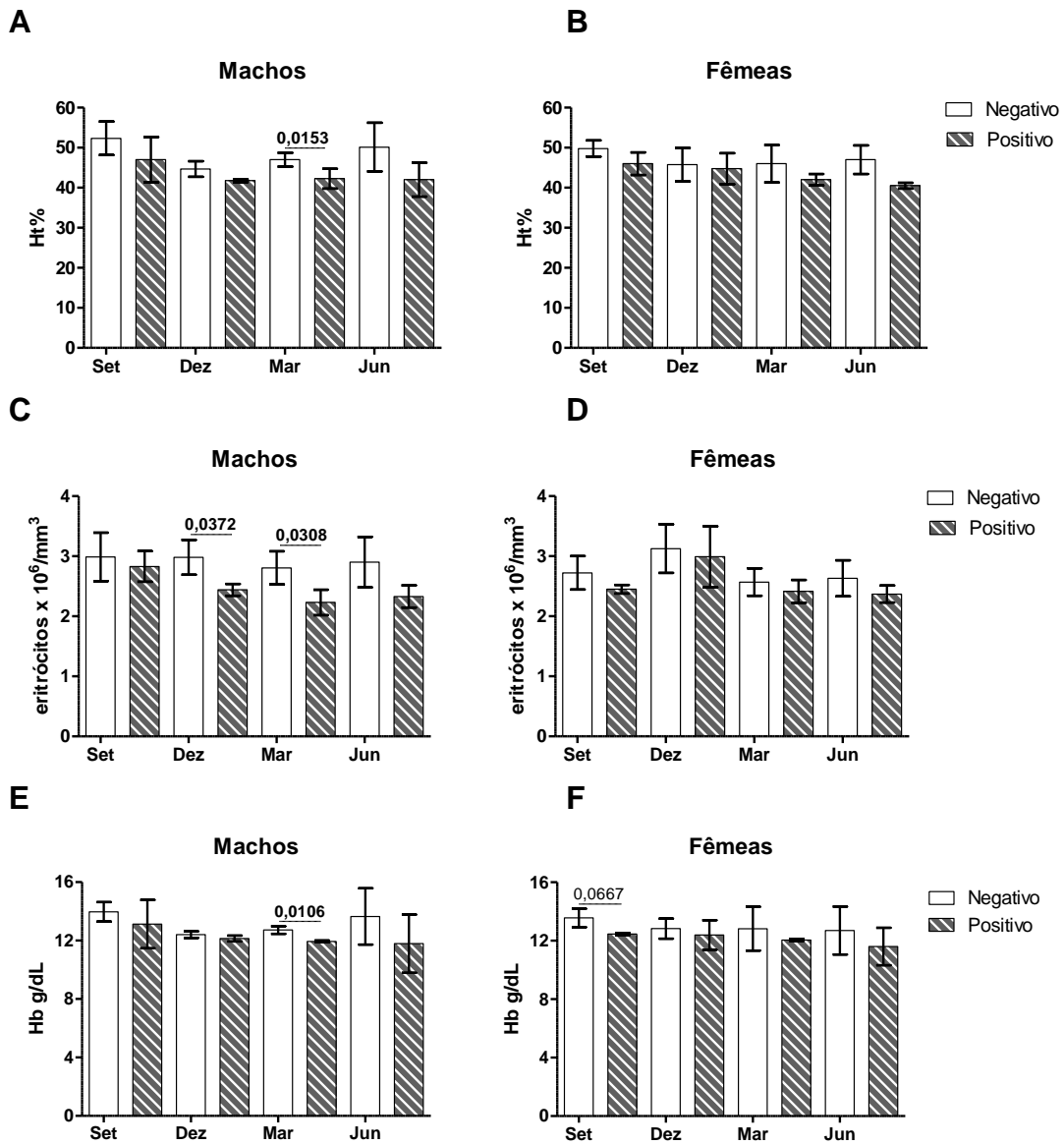


Figura 17. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Ht (%) (A e B), Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) (C e D) e Hb (g/dL) (E e F) entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

5.3.2. Comparações entre os valores médios do leucograma de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 18 (A e B) mostra a variação anual e as comparações entre os valores médios do leucograma de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp. Os indivíduos machos estão representados na Figura 18A e as fêmeas na Figura 18B.

Os dados da Figura 18A mostram uma diferença, estatisticamente significativa, entre o grupo de machos parasitados e não parasitados no mês de junho ($P=0,0481$): machos parasitados apresentaram valores de leucócitos inferiores aos dos não parasitados.

Nas fêmeas (Figura 18B) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos positivo e negativo no decorrer do período analisado. Observa-se nas fêmeas negativas, no entanto, uma tendência à diminuição nas médias de contagens de leucócitos no decorrer de setembro a junho.

Não ocorreram variações significativas ao longo do ano nos grupos negativos e positivos, de ambos os sexos.

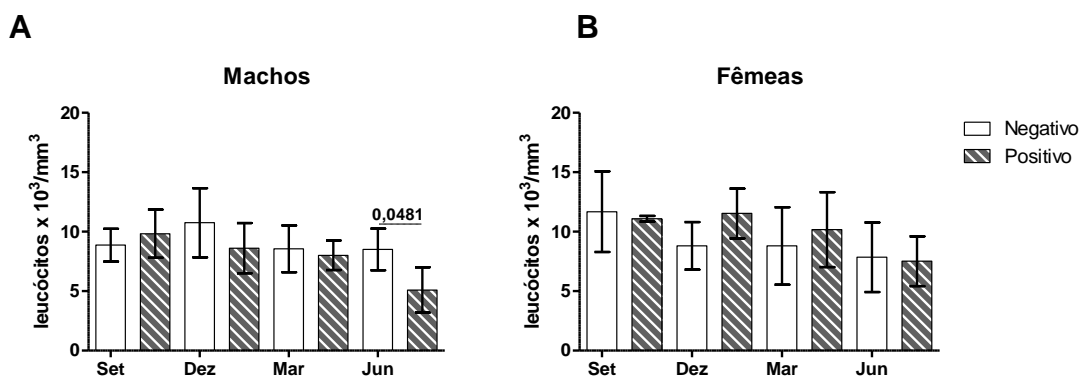


Figura 18. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (A e B), entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste- t .

A Tabela 6 apresenta a variação anual e compara os dados relativos à contagem absoluta de linfócitos e heterófilos dos grupos negativos e positivos de machos e fêmeas de *C. fasciolata*.

Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas médias de linfócitos entre os grupos negativos e positivos em ambos os sexos. Também não foi observada variação anual significativa na contagem de linfócitos para os grupos avaliados. No mês de junho percebem-se médias mais baixas de linfócitos, mais especificamente, em fêmeas e machos parasitados.

Observou-se diferença significativa das médias de heterófilos entre machos positivos e negativos no mês de setembro ($P=0,0223$), onde o valor é inferior nos animais não parasitados. No mês de junho os machos não parasitados apresentaram média superior aos parasitados ($P=0,0452$). Fêmeas parasitadas não apresentaram médias significativamente diferentes quando comparadas com fêmeas não parasitadas. Além disso, não foi percebida variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de heterófilos nos grupos de machos ou fêmeas.

A Tabela 7 exibe a variação anual e os resultados relativos à comparação das médias da contagem absoluta de eosinófilos e monócitos dos grupos negativos e positivos de machos e de fêmeas de *C. fasciolata*.

Não foi observada variação anual, tampouco diferenças, estatisticamente significativas, entre as médias de eosinófilos para os grupos negativos e positivos de ambos os sexos.

Não foram observadas variações significativas nem diferenças entre os valores médios da contagem de monócitos entre os machos ou fêmeas.

Não foi possível realizar comparações entre os valores médios de basófilos de *C. fasciolata* positivos e negativos, uma vez que, não foram observados basófilos em nenhum dos animais da amostra.

Tabela 6. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e Heterófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Linfócitos						Heterófilos					
	Macho (n=11)			Fêmea (n=10)			Macho (n=11)			Fêmea (n=10)		
	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$
Setembro	6,163 \pm 1,436	6,357 \pm 1,767	0,883	7,561 \pm 2,448	8,119 \pm 0,008	0,770	2,200 \pm 0,344	3,045 \pm 0,495	0,022	3,352 \pm 1,735	2,465 \pm 0,254	0,519
Dezembro	7,528 \pm 2,499	6,698 \pm 5,172	0,754	5,875 \pm 2,086	8,582 \pm 1,636	0,139	2,605 \pm 0,556	1,790 \pm 1,230	0,211	2,581 \pm 0,890	2,702 \pm 0,384	0,862
Março	6,012 \pm 1,184	5,373 \pm 0,2722	0,515	6,494 \pm 3,091	8,120 \pm 5,148	0,576	2,070 \pm 0,699	2,275 \pm 1,435	0,813	2,093 \pm 0,825	1,675 \pm 0,685	0,538
Junho	5,422 \pm 1,503	3,170 \pm 1,598	0,106	5,253 \pm 2,189	4,758 \pm 2,500	0,796	2,803 \pm 0,646	1,620 \pm 0,2546	0,045	2,202 \pm 1,939	2,318 \pm 0,625	0,935
P^*	0,2343	0,6373		0,4373	0,5953		0,1675	0,5168		0,3948	0,3565	

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* ($P^{\#}$), variação anual das médias calculadas por ANOVA (P^*)

Tabela 7. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Eosinófilos						Monócitos					
	Macho (n=11)			Fêmea (n=10)			Macho (n=11)			Fêmea (n=10)		
	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$	Negativo	Positivo	$P^{\#}$
Setembro	0,204 \pm 0,125	0,249 \pm 0,055	0,657	0,372 \pm 0,4331	0,429 \pm 0,848	0,285	0,300 \pm 0,161	0,180 \pm 0,154	0,409	0,077 \pm 0,053	0,074 \pm 0,104	0,936
Dezembro	0,346 \pm 0,243	0,040 \pm 0,056	0,143	0,274 \pm 0,184	0,188 \pm 0,169	0,575	0,271 \pm 0,170	0,087 \pm 0,010	0,198	0,078 \pm 0,052	0,067 \pm 0,095	0,828
Março	0,288 \pm 0,201	0,157 \pm 0,074	0,446	0,135 \pm 0,099	0,269 \pm 0,028	0,137	0,174 \pm 0,171	0,215 \pm 0,010	0,769	0,078 \pm 0,082	0,120 \pm 0,169	0,621
Junho	0,163 \pm 0,159	0,125 \pm 0,035	0,757	0,327 \pm 0,398	0,386 \pm 0,301	0,856	0,115 \pm 0,114	0,185 \pm 0,091	0,457	0,071 \pm 0,060	0,057 \pm 0,081	0,806
P^*	0,3453	0,0877		0,5252	0,5651		0,1666	0,5789		0,9500	0,9248	

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-t ($P^{\#}$), variação anual das médias calculadas por ANOVA (P^*)

5.3.3. Comparações entre os valores médios de trombócitos de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 19 estão apresentados os resultados relativos à contagem de trombócitos dos grupos negativos e positivos de machos e fêmeas de *C. fasciolata*. Não se observou variação anual entre os grupos estudados. Da mesma forma, não houve diferenças, estatisticamente significativas, entre as médias de trombócitos de animais positivos e negativos de ambos os sexos.

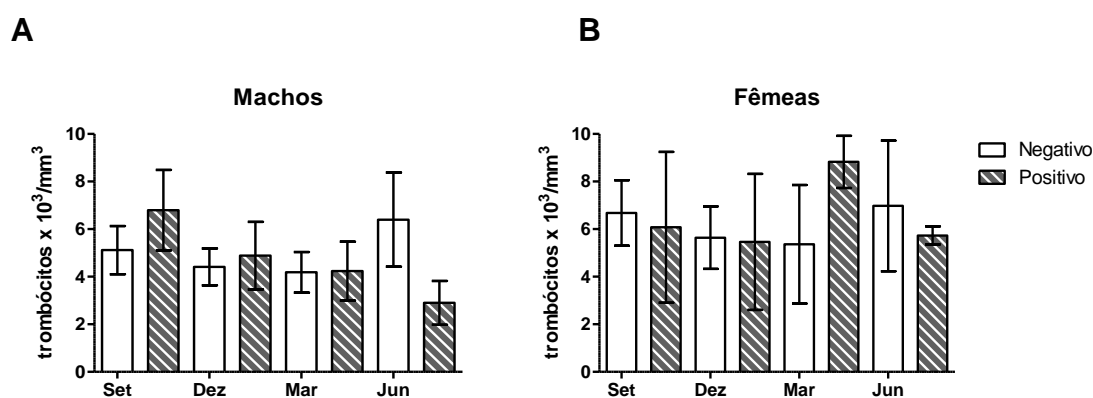


Figura 19. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de trombócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (A e B), entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-t.

5.3.4. Comparações entre os parâmetros bioquímicos de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 20 (A, B, C, D, E e F) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de PPT, AST e ALT de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 20 (A e B) estão representadas as médias de PPT para machos e fêmeas, respectivamente. Observou-se variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de PPT no grupo dos machos negativos ($P=0,0010$) e as diferenças ocorreram entre: setembro e março, setembro e junho, dezembro e março e entre março e junho. Ocorreu uma diferença significativa entre machos negativos e positivos no mês de março

($P=0,0246$); machos negativos apresentaram média superior. Na Figura 20B dos grupos das fêmeas negativas e positivas não se notou variação significativa das médias ao longo do ano. Observou-se diferença na média de PPT entre fêmeas positivas e negativas no mês de setembro ($P=0,0433$); o grupo negativo apresentou média mais alta.

As médias para AST dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 20 (C e D). Na Figura 20C observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0050$) e as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro e entre setembro e março. Os machos positivos também apresentaram variação anual, estatisticamente significativa ($P=0,0080$): diferenças ocorreram entre setembro e março, setembro e junho e entre dezembro e março. Ocorreram diferenças entre machos positivos e negativos em março ($P=0,0446$) e junho ($P=0,0264$): em ambos os meses, as médias do grupo dos negativos foram inferiores as observadas no dos positivos. Na Figura 20D observou-se variação anual significativa ($P=0,0020$) no grupo das fêmeas negativas e as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro, setembro e março e entre março e junho. As fêmeas positivas também apresentaram variação anual, estatisticamente significativa ($P=0,0065$) e as diferenças ocorreram entre setembro e março, setembro e junho e entre dezembro e março. Nos meses de março e junho as fêmeas positivas apresentaram média de AST superiores as observadas nas fêmeas negativas ($P=0,0029$; $P=0,0028$).

A Figura 20 (E e F) representa as médias de ALT para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 20E notou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0002$); as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro, dezembro e junho e entre março e junho. As médias de ALT foram significativamente inferiores no grupo negativo em relação ao grupo positivo, nos meses de setembro ($P=0,0107$) e junho ($P=0,0003$). Na Figura 20F observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0020$), ocorreu uma diferença, estatisticamente significativa, entre o meses de setembro e junho e entre setembro e junho. O grupo das fêmeas positivas apresentou variação anual ($P=0,0052$) entre os meses de setembro e dezembro, dezembro e março e entre dezembro e junho. O grupo das fêmeas positivas apresentou

médias de ALT significativamente superiores, nos meses de dezembro ($P>0,0001$) e junho ($P=0,0087$).

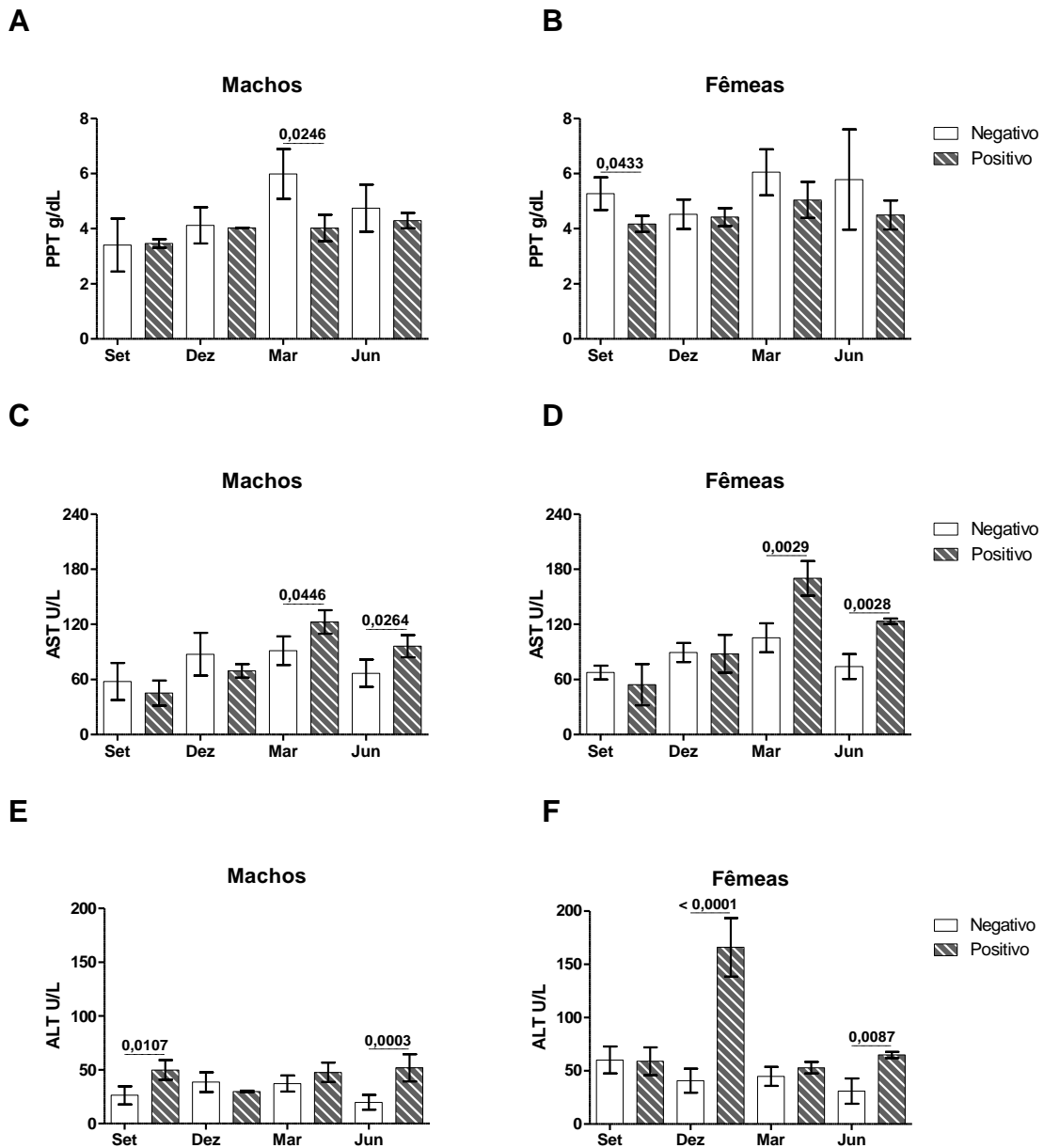


Figura 20. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de PPT (g/dL) (A e B), AST (U/L) (C e D) e ALT (U/L) (E e F) entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-t.

A Figura 21 (A, B, C, D, E e F) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de AU, CREAT e Uréia de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 21 (A e B) estão representadas as médias de AU para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 21A observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0360$) e uma diferença significativa ocorreu entre o mês de setembro e dezembro; não foi identificada diferença significativa entre machos positivos e negativos. Não ocorreu variação anual significativa nos grupos de fêmeas (Figura 21B), nem diferenças entre as médias dos grupos negativo e positivo.

As médias para CREAT dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 21 (C e D). Na Figura 21C não ocorreu variação anual, nem diferenças entre as médias de machos negativos e positivos. Na Figura 21D observou-se variação anual significativa no grupo positivo ($P=0,0027$); as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro, setembro e junho e entre março e junho. No mês de março as fêmeas negativas apresentaram valor médio de CREAT superior ao determinado nas positivas ($P=0,0439$).

A Figura 21 (E e F) representa as médias de Uréia para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 21E observou-se variação anual das médias nos grupos de machos negativos ($P=0,0427$). Ocorreu uma diferença entre os meses de março e junho; não houve diferença, estatisticamente significativa, entre machos positivos e negativos. Na Figura 21F não se observou variação anual significativa e também não ocorreu diferença significativa entre fêmeas positivas e negativas.

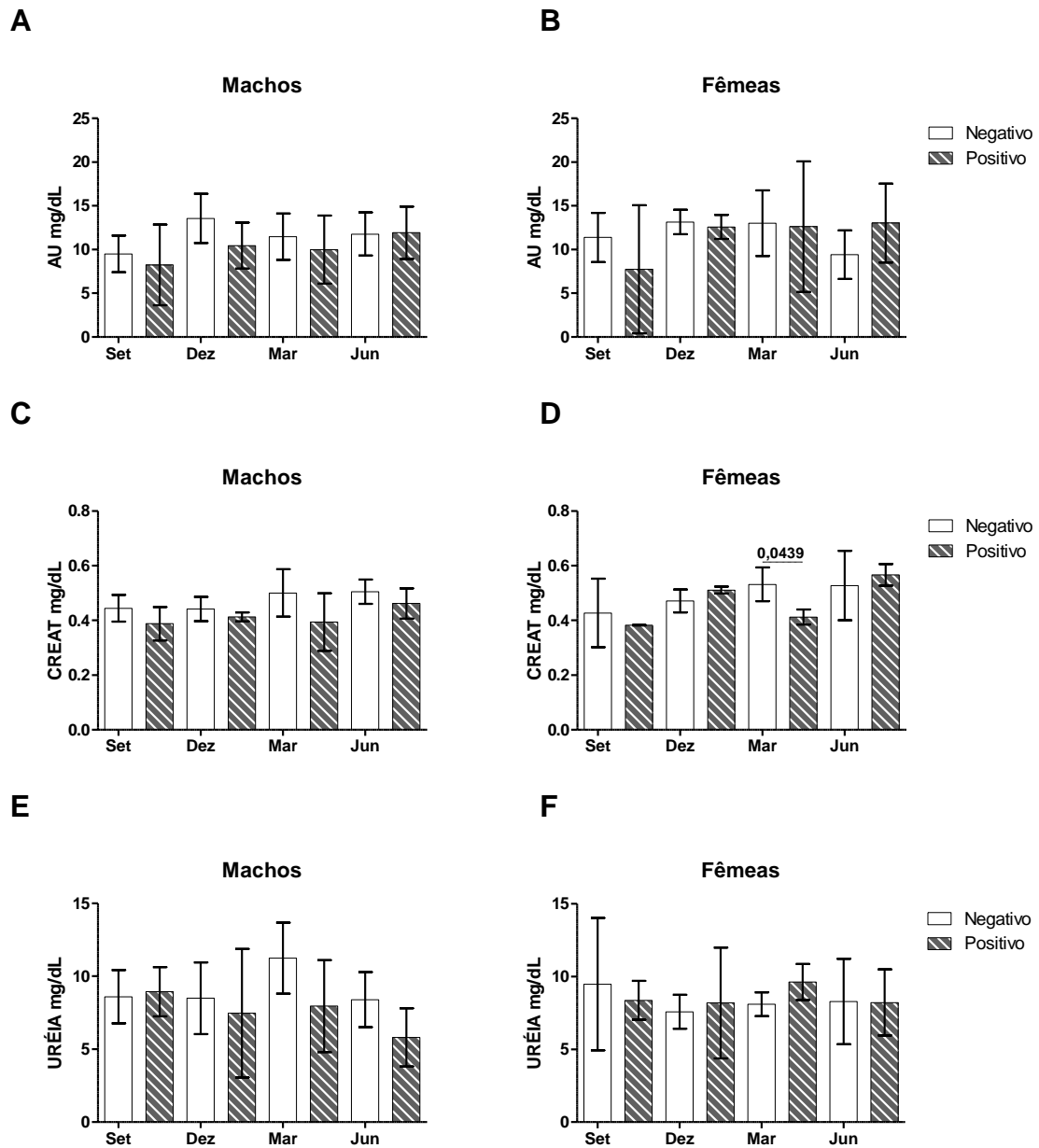


Figura 21. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de AU (mg/dL) (A e B), CREAT (mg/dL) (C e D) e Uréia (mg/dL) (E e F) entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

A Figura 22 (A, B, C, D, E e F) exibe a variação anual e as comparações entre os valores médios de Ca, P e FA de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 22 (A e B) apresenta as médias de Ca para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 22A observou-se variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de Ca no grupo dos machos negativos ($P=0,0378$) e as diferenças ocorreram entre os meses de dezembro e junho; não ocorreram diferenças entre as médias de negativos e positivos. Na Figura 22B observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0012$): as diferenças ocorreram entre setembro e dezembro, entre setembro e março e entre setembro e junho; não foram observadas diferenças entre as médias do grupos negativo e positivo.

As médias para P dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 22 (C e D). Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de P dos grupos estudados. Também não foram identificadas diferenças significativas entre animais positivos e negativos em ambos os sexos.

A Figura 22 (E e F) representa as médias de FA para machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 22E observou-se variação anual significativa no grupo negativo ($P=0,0057$) e as diferenças ocorreram entre setembro e março e entre março e junho; não ocorreu diferença, estatisticamente significativa, entre machos negativos e positivos. Na Figura 22F não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de FA dos grupos negativo ou positivo e também não ocorreram diferenças entre as médias.

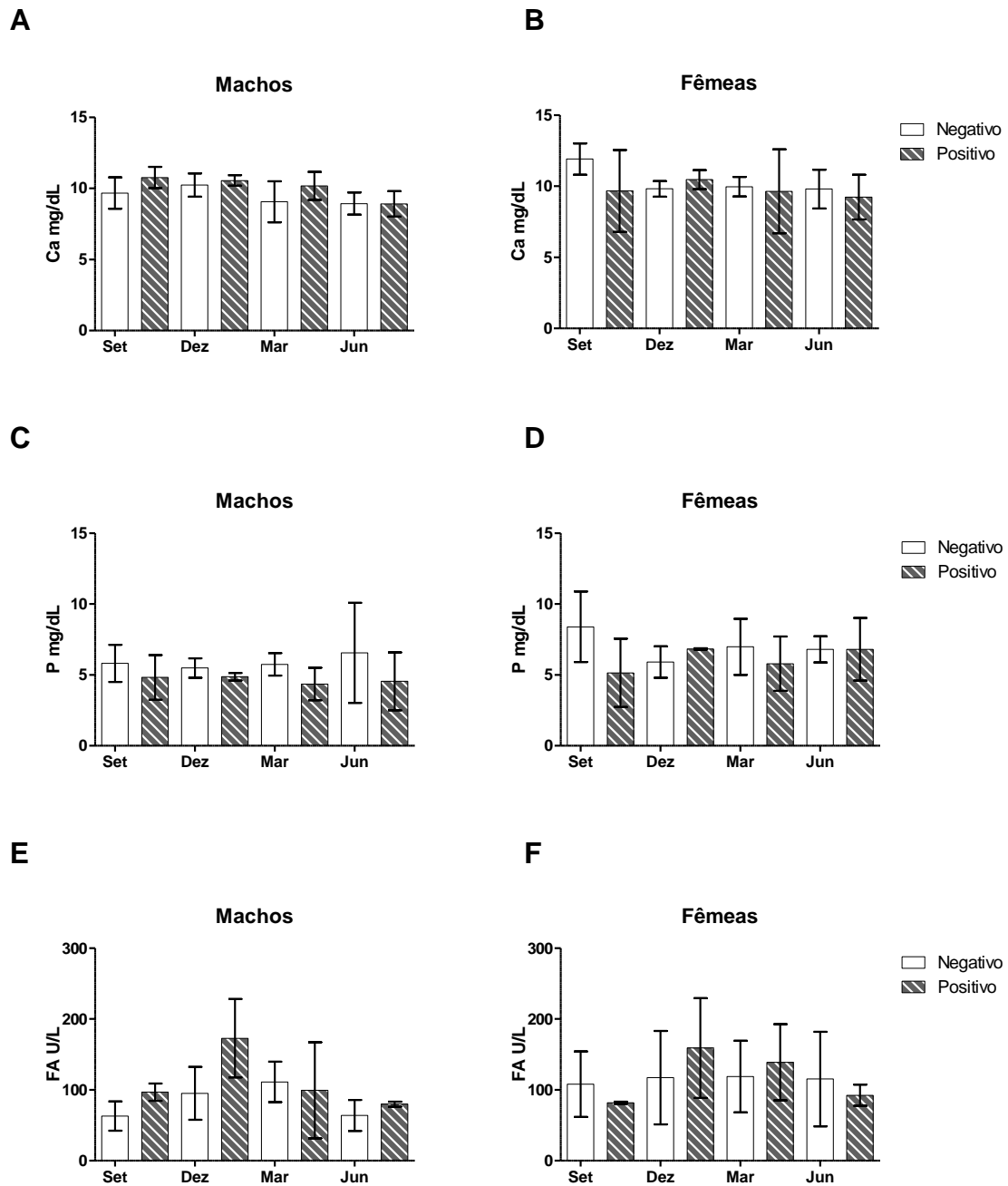


Figura 22. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Ca (mg/dL) (A e B), P (mg/dL) (C e D) e FA (U/L) (E e F) entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

A Figura 23 (A, B, C e D) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores médios de LDH e Glicose em *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Figura 23 (A e B) exibe as médias de LDH para machos e fêmeas, respectivamente. Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de LDH no grupo de machos negativos ou positivos (Figura 23A); também não ocorreu diferença significativa entre grupos. Na Figura 23B observou-se variação anual significativa somente no grupo das fêmeas positivas ($P=0,0259$): ocorreu diferença entre setembro e dezembro ($P<0,05$) e entre dezembro e junho ($P<0,05$).

As médias para Glicose dos machos e das fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 23 (C e D). Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de Glicose dos grupos avaliados. Ocorreu uma diferença significativa entre fêmeas negativas e positivas no mês de junho ($P=0,0448$); fêmeas negativas apresentaram média superior.

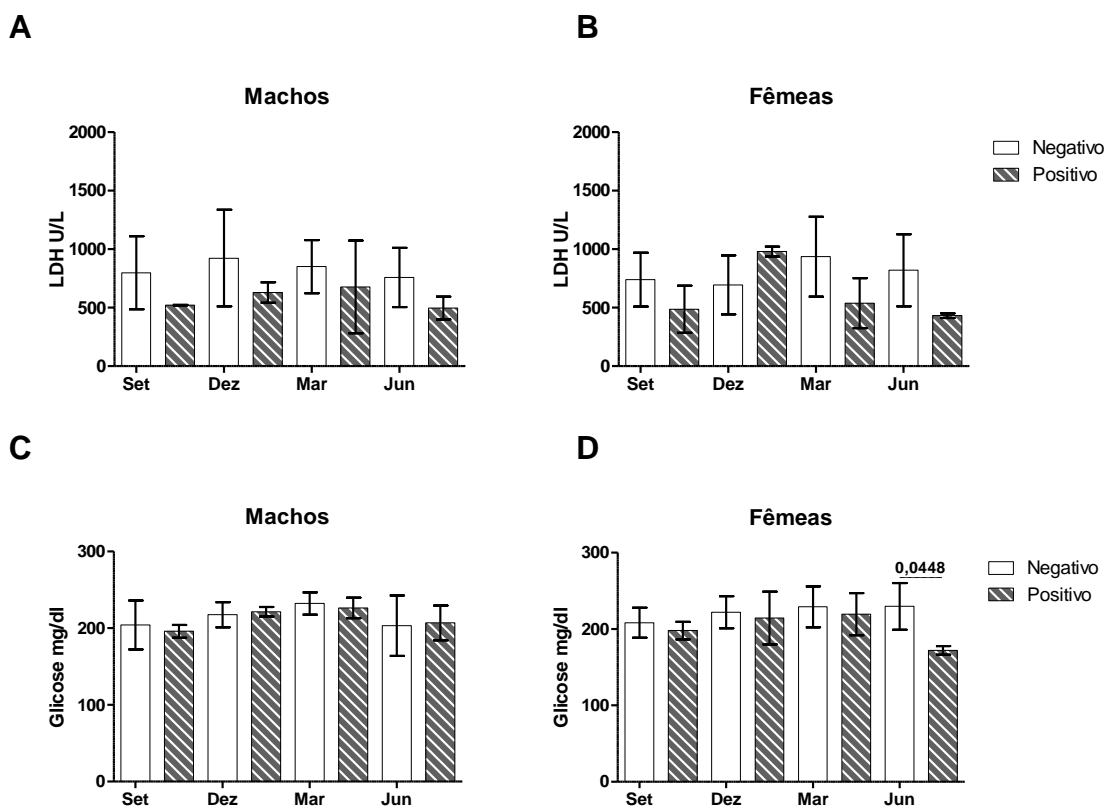


Figura 23. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de LDH (U/L) (A e B) e Glicose (mg/dL) (C e D) entre *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo; machos ($n=11$) e fêmeas ($n=10$). Diferenças entre médias do grupo positivo e negativo calculadas pelo teste-*t*.

5.3.5. Eletroforese das proteínas plasmáticas: comparações dos valores das frações protéicas de *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Tabela 8 apresenta a variação anual e as comparações dos valores médios de Pré-albumina, Albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina em machos da espécie *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp.

Observou-se no grupo de animais negativos variação anual significativa, com diferenças entre as médias mensais para as seguintes variáveis: Albumina entre setembro e março, dezembro e março e entre março e junho; α_1 -globulina entre setembro e março, dezembro e março e entre março e junho; α_2 -globulina entre dezembro e março; β_1 -globulina entre dezembro e junho; β_2 -globulina entre setembro e março, setembro e junho e entre dezembro e março; γ -globulina entre setembro e março e entre setembro e junho. O grupo de animais positivos apresentou variação anual significativa para γ -globulina, a diferença ocorreu entre o mês de setembro e junho. Os animais negativos apresentaram valores de Albumina mais altos que positivos nos meses de março e junho ($P=0,030$; $P=0,030$).

Na Tabela 9 representam-se a variação anual e as comparações dos valores médios de Pré-albumina, Albumina, α_1 - globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina em fêmeas da espécie *C. fasciolata* parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp. Observou-se no grupo de animais negativos variação anual significativa, com diferença entre as médias mensais para a variável γ -globulina entre dezembro e março. Nos meses de setembro e março os animais negativos apresentaram valores de albumina significativamente superiores aos observados para o grupo positivo ($P=0,050$; $P=0,012$).

Tabela 8. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Pré-albumina (g/dL), Albumina (g/dL), α_1 - globulina (g/dL), α_2 - globulina (g/dL), β_1 -globulina (g/dL), β_2 -globulina (g/dL) e γ -globulina (g/dL) em machos da espécie *C. fasciolata* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp.

	Setembro		Dezembro		Março		Junho		Setembro-junho					
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo				
			<i>P</i> [#]		<i>P</i> [#]		<i>P</i> [#]		<i>P</i> [#]	<i>P</i> [*]	<i>P</i> [*]			
Pré-alb	0,17 \pm 0,06	0,15 \pm 0,07	0,718	0,14 \pm 0,04	0,20 \pm 0,07	0,154	0,18 \pm 0,07	0,14 \pm 0,04	0,475	0,13 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02	0,059	0,393	0,512
Alb	1,77 \pm 0,46	1,82 \pm 0,12	0,891	1,93 \pm 0,32	1,86 \pm 0,16	0,704	3,14 \pm 0,74	1,63 \pm 0,08	0,030	2,15 \pm 0,17	1,85 \pm 0,09	0,030	0,001	0,255
α_1-glob	0,20 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	0,839	0,23 \pm 0,05	0,22 \pm 0,05	0,890	0,36 \pm 0,10	0,21 \pm 0,03	0,080	0,24 \pm 0,09	0,23 \pm 0,04	0,791	0,002	0,870
α_2-glob	0,14 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03	0,297	0,13 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,664	0,20 \pm 0,05	0,13 \pm 0,04	0,121	0,17 \pm 0,07	0,12 \pm 0,03	0,361	0,031	0,935
β_1-glob	0,14 \pm 0,05	0,12 \pm 0,03	0,731	0,11 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,209	0,18 \pm 0,05	0,12 \pm 0,03	0,148	0,17 \pm 0,05	0,10 \pm 0,03	0,075	0,041	0,398
β_2-glob	0,17 \pm 0,07	0,15 \pm 0,02	0,754	0,20 \pm 0,04	0,16 \pm 0,06	0,280	0,29 \pm 0,05	0,22 \pm 0,05	0,090	0,31 \pm 0,09	0,19 \pm 0,04	0,063	0,001	0,523
γ-glob	0,83 \pm 0,31	0,91 \pm 0,04	0,754	1,37 \pm 0,35	1,38 \pm 0,28	0,991	1,65 \pm 0,31	1,58 \pm 0,27	0,780	1,52 \pm 0,32	1,61 \pm 0,11	0,687	0,001	0,034

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]), variação anual das médias calculadas por ANOVA (*P*^{*})

Tabela 9. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) de Pré-albumina (g/dL), Albumina (g/dL), α_1 - globulina (g/dL), α_2 - globulina (g/dL), β_1 -globulina (g/dL), β_2 -globulina (g/dL) e γ -globulina (g/dL) em fêmeas da espécie *C. fasciolata* parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp.

	Setembro		Dezembro		Março		Junho		Setembro-junho					
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo				
Pré-alb	0,18 \pm 0,04	0,13 \pm 0,09	<i>P</i> [#] 0,287	0,19 \pm 0,06	0,15 \pm 0,05	<i>P</i> [#] 0,454	0,18 \pm 0,07	0,13 \pm 0,05	<i>P</i> [#] 0,425	0,12 \pm 0,06	0,11 \pm 0,10	<i>P</i> [#] 0,785	<i>P</i> [*] 0,205	<i>P</i> [*] 0,949
Alb	2,60 \pm 0,45	1,67 \pm 0,37	0,050	2,15 \pm 0,33	2,04 \pm 0,06	0,460	2,70 \pm 0,52	2,21 \pm 0,05	0,012	2,78 \pm 1,27	2,02 \pm 0,33	0,455	0,364	0,321
α_1-glob	0,33 \pm 0,06	0,24 \pm 0,01	0,098	0,29 \pm 0,06	0,29 \pm 0,07	0,929	0,40 \pm 0,10	0,24 \pm 0,07	0,089	0,31 \pm 0,08	0,23 \pm 0,06	0,295	0,090	0,766
α_2-glob	0,22 \pm 0,06	0,28 \pm 0,14	0,339	0,16 \pm 0,03	0,20 \pm 0,07	0,274	0,20 \pm 0,07	0,20 \pm 0,01	0,951	0,20 \pm 0,06	0,17 \pm 0,04	0,578	0,366	0,586
β_1-glob	0,23 \pm 0,08	0,25 \pm 0,14	0,740	0,16 \pm 0,06	0,13 \pm 0,05	0,665	0,18 \pm 0,05	0,23 \pm 0,01	0,352	0,21 \pm 0,07	0,21 \pm 0,13	0,877	0,238	0,698
β_2-glob	0,22 \pm 0,06	0,20 \pm 0,09	0,634	0,21 \pm 0,06	0,23 \pm 0,01	0,603	0,30 \pm 0,07	0,19 \pm 0,01	0,108	0,27 \pm 0,12	0,16 \pm 0,05	0,278	0,156	0,683
γ-glob	1,49 \pm 0,39	1,40 \pm 0,20	0,757	1,36 \pm 0,22	1,38 \pm 0,13	0,907	2,09 \pm 0,55	1,84 \pm 0,21	0,576	1,90 \pm 0,47	1,60 \pm 0,06	0,422	0,014	0,128

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]), variação anual das médias calculadas por ANOVA (*P*^{*})

5.4. Hematologia, bioquímica plasmática e fracionamento eletroforético das proteínas séricas de *A. jacutinga*, comparações entre aves positivas e negativas para infecção por *Plasmodium* spp.

Foram comparadas as médias das variáveis hematológicas, bioquímicas e dos valores das proteínas séricas entre as aves parasitadas e não parasitadas, para que pudéssemos avaliar as influências da infecção por *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas de *A. jacutinga*. As coletas foram realizadas na CRAX – Sociedade de Pesquisa da Fauna Silvestre e no Criatório Conservacionista de Poços de Caldas. Após comparações estatísticas das variáveis estudadas nas aves do plantel da CRAX e do Criatório Poços de Caldas, unimos os indivíduos num só grupo para possibilitar a análise de um número maior de aves.

Foi utilizado o teste-*t* para a comparação entre as médias dos animais positivos e negativos.

5.4.1. Comparação entre os valores médios do eritrograma e leucograma de *A. jacutinga* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Tabela 10 estão apresentados os dados relativos ao eritrograma e leucograma de *A. jacutinga*. As comparações apresentadas foram realizadas entre indivíduos do mesmo sexo negativos e positivos para *Plasmodium* spp. Não observamos diferenças, estatisticamente significativas, entre o eritrograma de aves infectadas e não infectadas em ambos os sexos. Entretanto, nota-se que as fêmeas parasitadas possuem médias para hematócrito, eritrócitos e hemoglobina discretamente inferiores às observadas nas fêmeas positivas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias do leucograma de machos positivos e negativos. Percebeu-se diferença, estatisticamente significativa, na contagem de monócitos entre fêmeas negativas e positivas: as fêmeas infectadas apresentaram médias superiores ($P=0,0114$). Fêmeas positivas apresentaram média de leucócitos visivelmente superior à observada no grupo negativo.

Tabela 10. Comparações dos valores (média \pm dp) do eritrograma e leucograma de *A. jacutinga* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Machos (n=19)		P	Fêmeas (n=23)		P
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Ht%	38,67 \pm 1,730	39,90 \pm 5,260	0,5119	38,21 \pm 4,300	35,50 \pm 3,550	0,1463
Hb g/dL	13,31 \pm 2,220	12,78 \pm 1,710	0,5681	12,54 \pm 1,200	11,32 \pm 1,670	0,1433
Eritrócitos/mm ³ x10 ⁶	2,243 \pm 0,492	2,329 \pm 0,531	0,7223	2,095 \pm 0,460	1,984 \pm 0,369	0,5681
Trombócitos/mm ³ x10 ³	6,771 \pm 2,401	5,271 \pm 1,038	0,0927	5,967 \pm 1,541	5,995 \pm 2,683	0,9749
Leucócitos/mm ³ x10	8,104 \pm 3,469	7,679 \pm 2,373	0,7617	8,855 \pm 3,358	12,412 \pm 5,561	0,0742
Linfócitos/mm ³ x10 ³	5,884 \pm 2,421	5,499 \pm 2,187	0,7280	6,530 \pm 2,906	9,027 \pm 4,449	0,1256
Heterófilos/mm ³ x10 ³	1,607 \pm 0,617	1,705 \pm 0,641	0,7460	1,758 \pm 0,695	2,505 \pm 1,636	0,1478
Eosinófilos/mm ³ x10 ³	0,337 \pm 0,277	0,318 \pm 0,218	0,8765	0,338 \pm 0,308	0,517 \pm 0,402	0,2557
Monócitos/mm ³ x10 ³	0,134 \pm 0,094	0,183 \pm 0,163	0,4665	0,141 \pm 0,123	0,333 \pm 0,160	0,0114
Basófilos/mm ³ x10 ³	0,018 \pm 0,050	0,014 \pm 0,042	0,8708	0,086 \pm 0,193	0,030 \pm 0,057	0,4336

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-t (P).

5.4.2. Comparação entre os parâmetros bioquímicos de *A. jacutinga* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Tabela 11 estão representados e comparados os valores de PPT, AST, ALT, AU, CREAT, Uréia, Ca, P, FA, LDH e Glicose de machos e de fêmeas de *A. jacutinga* infectados e não infectados por *Plasmodium* spp. Não foram observadas diferenças significativas nas médias dos parâmetros bioquímicos entre fêmeas negativas e positivas. Entretanto, foi observada diferença, estatisticamente significativa, nos valores médios de LDH entre machos negativos e positivos; o grupo negativo apresentou valores superiores aos observados nos machos positivos ($P=0,0201$).

5.4.3. Eletroforese das proteínas séricas: comparações dos valores das frações protéicas de *A. jacutinga* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

A Tabela 12 apresenta e compara os valores médios de Pré-albumina, Albumina, α_1 - globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina entre aves positivas e negativas de ambos os sexos. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nos valores de proteínas séricas entre as aves positivas e negativas em ambos os sexos.

Tabela 11. Comparações dos valores (média \pm dp) de PPT (g/dL), AST (U/L), ALT (U/L), AU (mg/dL), CREAT (mg/dL), Uréia (mg/dL), Ca (mg/dL), P (mg/dL), FA (U/L), LDH (U/L) e Glicose (mg/dL) entre *A. jacutinga* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo.

	Macho (n=19)		P	Fêmeas (n=23)		P
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
AST	117,50 \pm 49,53	118,30 \pm 49,41	0,9716	116,14 \pm 48,53	128,00 \pm 40,75	0,5670
ALT	105,70 \pm 23,35	93,20 \pm 21,84	0,2529	94,07 \pm 32,62	108,87 \pm 30,69	0,3085
AU	14,70 \pm 5,48	16,45 \pm 6,42	0,5203	16,16 \pm 7,08	15,97 \pm 6,79	0,9518
CREAT	0,360 \pm 0,184	0,370 \pm 0,189	0,9058	0,350 \pm 0,285	0,325 \pm 0,225	0,8339
Uréia	7,90 \pm 5,36	7,80 \pm 3,01	0,9596	8,64 \pm 3,30	7,87 \pm 4,121	0,6361
Ca	10,80 \pm 1,03	10,90 \pm 1,31	0,8514	11,51 \pm 3,23	11,30 \pm 1,18	0,8595
P	7,87 \pm 3,50	7,75 \pm 3,41	0,9390	8,29 \pm 2,81	7,75 \pm 2,55	0,6619
FA	266,57 \pm 105,50	228,37 \pm 92,75	0,4686	228,90 \pm 65,40	257,43 \pm 113,75	0,5206
LDH	207,00 \pm 48,20	123,80 \pm 68,38	0,0201	207,50 \pm 79,33	191,40 \pm 134,00	0,6839
Glicose	308,00 \pm 59,46	290,10 \pm 45,02	0,4577	287,79 \pm 31,34	284,12 \pm 26,40	0,7838

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-t ($P^{\#}$).

Tabela 12. Comparações dos valores (média \pm dp) de Pré-albumina (g/dL), Albumina (g/dL), α_1 -globulina (g/dL), α_2 -globulina (g/dL), β_1 -globulina (g/dL), β_2 -globulina (g/dL) e γ -globulina (g/dL) em machos e fêmeas da espécie *A. jacutinga* parasitados e não parasitados por *Plasmodium* spp.

	Machos			Fêmeas		
	Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>
PPT	4,300 \pm 0,570	4,250 \pm 0,570	0,846	4,320 \pm 0,670	4,190 \pm 0,720	0,665
Pré-albumina	0,309 \pm 0,081	0,282 \pm 0,086	0,496	0,263 \pm 0,094	0,286 \pm 0,094	0,584
Albumina	2,728 \pm 0,294	2,619 \pm 0,380	0,498	2,742 \pm 0,489	2,714 \pm 0,380	0,895
α_1 -globulina	0,342 \pm 0,161	0,300 \pm 0,137	0,547	0,266 \pm 0,115	0,233 \pm 0,116	0,532
α_2 -globulina	0,141 \pm 0,081	0,179 \pm 0,076	0,310	0,206 \pm 0,146	0,177 \pm 0,146	0,653
β_1 -globulina	0,286 \pm 0,211	0,367 \pm 0,253	0,525	0,251 \pm 0,115	0,292 \pm 0,234	0,609
β_2 -globulina	0,335 \pm 0,068	0,384 \pm 0,129	0,411	0,485 \pm 0,270	0,336 \pm 0,040	0,140
γ -globulina	0,150 \pm 0,061	0,120 \pm 0,049	0,255	0,140 \pm 0,062	0,145 \pm 0,267	0,854

Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t* (*P*[#]).

5.5. Relação Heterófilo/Linfócito em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*

A Figura 24 (A, B, C e D) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores da relação heterófilo/linfócito (H/L) de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

Na Figura 24 (A e B) estão representadas as médias da relação heterófilo/linfócito para *C. blumenbachii* machos e fêmeas, respectivamente. A Figura 24A evidencia diferença significativa entre machos negativos e positivos no mês de dezembro ($P=0,0083$); machos positivos apresentaram médias superiores. Na Figura 24B nota-se que fêmeas positivas apresentaram média superior às fêmeas negativas no mês de dezembro ($P=0,0173$). Em *C. blumenbachii* não foi observada variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias em ambos os sexos.

Na Figura 24 (C e D) estão representadas as médias da relação heterófilo/linfócito para *C. fasciolata* machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 24D do grupo das fêmeas positivas nota-se variação significativa das médias ao longo do ano ($P=0,0237$); ocorreu diferença significativa entre os meses de setembro e junho e entre março e junho. Não foram observadas diferenças, estatisticamente relevantes, nas médias da relação H/L entre os grupos positivos e negativos da espécie *C. fasciolata*.

Na Figura 25 estão representadas as médias da relação H/L em *A. jacutinga* parasitadas e não por *Plasmodium* spp. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos negativos e positivos em ambos os sexos.

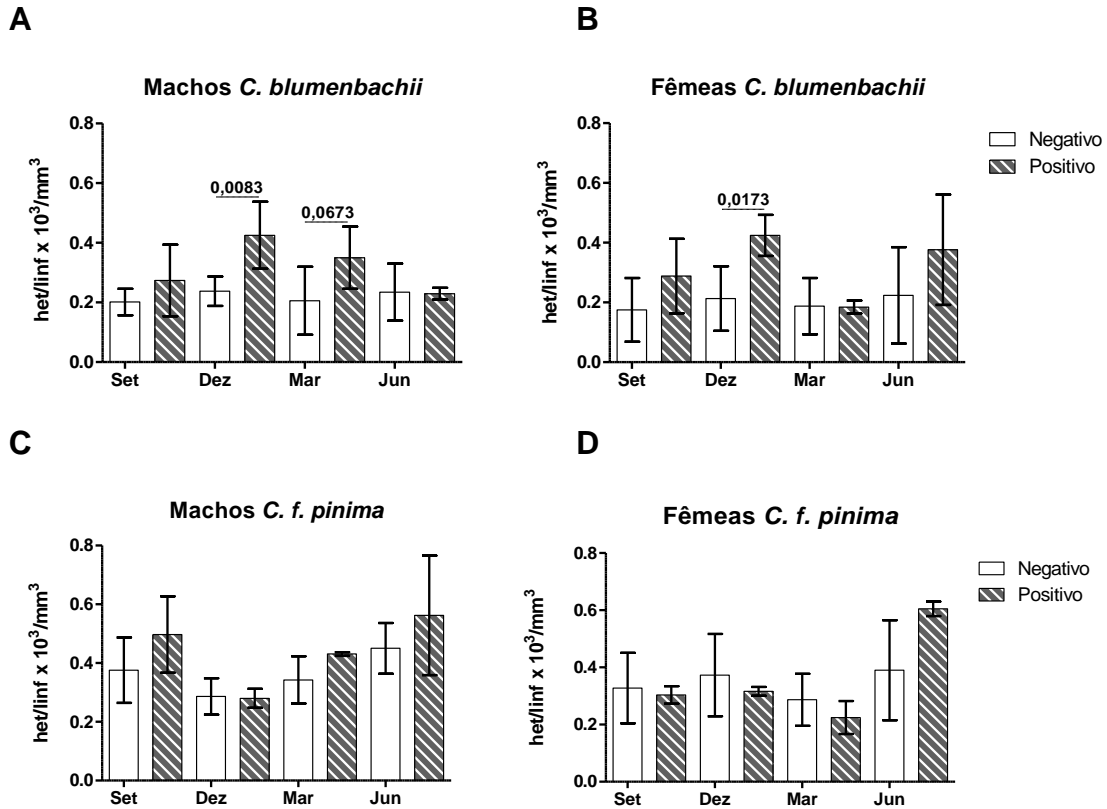


Figura 24. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) da relação Heterófilo/linfócito. Machos *C. blumenbachii* (A); Fêmeas *C. blumenbachii* (B); Machos *C. fasciolata* (C) e Fêmeas *C. fasciolata* (D) aves parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo. Diferenças entre médias calculadas pelo teste-t.

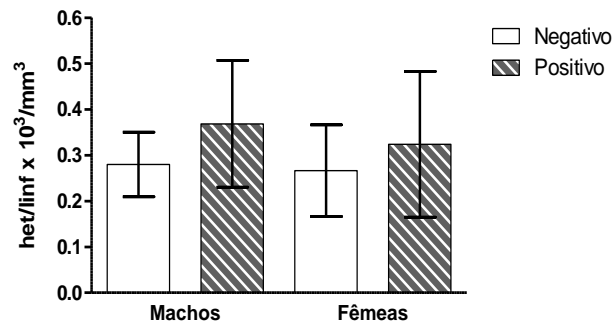


Figura 25. Comparação dos valores (média \pm dp) da relação heterófilo/linfócito de *A. jacutinga* aves parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo. Diferenças entre médias calculadas pelo teste-t.

5.6. Relação Albumina/Globulina em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*

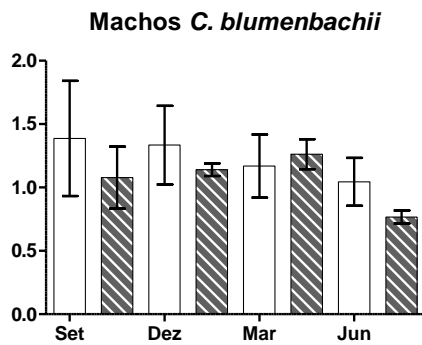
A Figura 26 (A, B, C e D) apresenta a variação anual e as comparações entre os valores da relação albumina/globulina (A/G) de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* positivos e negativos para infecção por *Plasmodium* spp.

As médias para relação A/G de *C. blumenbachii*, machos e fêmeas, respectivamente, estão representadas na Figura 26 (A e B). Não se observou variação anual, estatisticamente significativa, entre as médias de relação A/G dos grupos estudados. Também não foram identificadas diferenças significativas entre animais positivos e negativos em ambos os sexos.

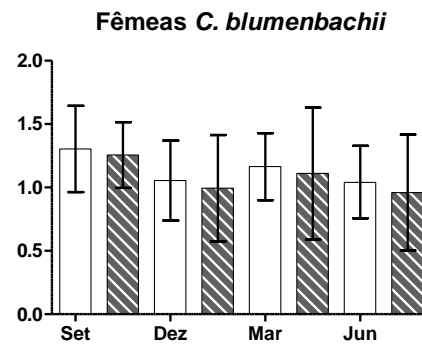
A Figura 26 (C e D) representa as médias de relação A/G para *C. fasciolata*, machos e fêmeas, respectivamente. Na Figura 26C observou-se variação anual significativa no grupo positivo ($P=0,0409$) e a diferença ocorreu entre setembro e março; não ocorreu diferença, estatisticamente significativa, entre machos negativos e positivos. Na Figura 26D não se observou variação anual, estatisticamente significativa, nas médias de relação A/G dos grupos negativo ou positivo e também não ocorreram diferenças entre as médias.

Na Figura 27 estão representadas as médias da relação A/G em *A. jacutinga* parasitadas e não por *Plasmodium* spp. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos negativos e positivos em ambos os sexos.

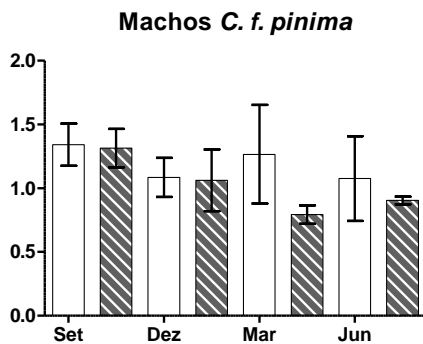
A



B



C



D

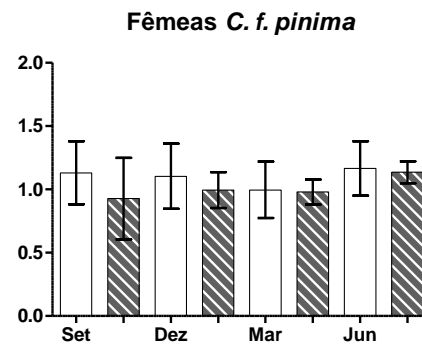


Figura 26. Variação anual e comparações dos valores (média \pm dp) da relação Albumina/Globulina (g/dL). Machos *C. blumenbachii* (A); Fêmeas *C. blumenbachii* (B); Machos *C. fasciolata* (C) e Fêmeas *C. fasciolata* (D) aves parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo. Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t*.

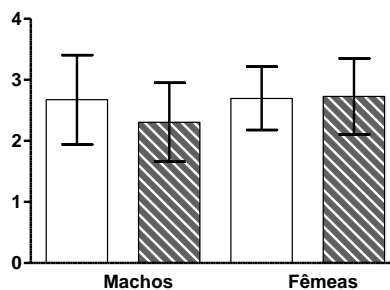


Figura 27. Comparação dos valores (média \pm dp) da relação Albumina/Globulina (g/dL) de *A. jacutinga* aves parasitadas e não parasitadas por *Plasmodium* spp., de acordo com o sexo. Diferenças entre médias calculadas pelo teste-*t*.

6. DISCUSSÃO

Há uma grande escassez de informações acerca dos parâmetros fisiológicos básicos e dos aspectos sanitários de *C. fasciolata*, *C. blumenbachii*, e *A. jacutinga*, apesar destas duas últimas serem reconhecidas como espécies de cracídeos ameaçadas de extinção. É de extrema dificuldade o encontro de exemplares destes cracídeos tanto na natureza quanto em criadouros científicos e de conservação. Agravando ainda mais a situação, os órgãos fiscalizadores da fauna silvestre e a legislação vigente dificultam o acesso às espécies ameaçadas de extinção. De fato, durante o desenvolvimento de nosso trabalho percebemos grande resistência por parte dos poucos criadores dessas espécies em permitir o acesso às mesmas para estudos científicos, uma vez que os procedimentos experimentais tais como captura, contenção e coleta de sangue podem trazer prejuízos ao seu desempenho reprodutivo no cativeiro.

É importante ressaltar que o nosso trabalho constitui o primeiro estudo a determinar a prevalência de *Plasmodium* spp. e avaliar a influência da malária aviária na saúde de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*. É a primeira vez, ainda, que se estuda a hematologia e a bioquímica sanguínea de *C. blumenbachii* e o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de cracídeos.

Os plasmódios aviários são muito importantes para diferentes estudos relacionados à biologia da conservação, sendo seu papel reconhecido como reguladores do tamanho de populações de hospedeiros bem como causadores de extinção de determinadas espécies (revisto por Braga *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho, utilizamos em paralelo três metodologias de diagnóstico para possibilitar o estudo da prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*, quais sejam: avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos, amplificação dos genes estrutural 18S RNA e mitocondrial SSU de *Plasmodium* spp. A combinação da análise microscópica e molecular propicia um diagnóstico mais acurado e evita resultados falso-negativos que normalmente ocorrem na leitura de esfregaços sanguíneos provenientes de indivíduos com baixas parasitemias (Jarvi *et al.*, 2002; Valkiūnas *et al.*, 2008, Braga *et al.*, 2011). Em trabalhos anteriores de nosso grupo temos demonstrado a importância de se utilizar estes métodos

diagnósticos paralelamente, a fim de se obter informações mais precisas e reprodutíveis da prevalência de malária aviária entre aves silvestres ou de cativeiro (Ribeiro *et al.* 2005; Belo *et al.*, 2009, Belo *et al.*, 2011, Braga *et al.*, 2011). Desta forma, esta prática foi priorizada neste estudo e acredita-se que a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. seja representativa entre os cracídeos estudados no estado de Minas Gerais. Cabe ressaltar que não foi verificada concordância entre os três métodos utilizados, o que corrobora dados referentes aos nossos estudos prévios mencionados acima.

Nossos resultados mostram que não há diferenças, estatisticamente significativas, na prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. entre machos e fêmeas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*, o que demonstra não existir nelas relação entre a infecção por *Plasmodium* spp. e a variável sexo. Os resultados da prevalência de infecção em *A. jacutinga* foram similares aos encontrados para outras aves silvestres brasileiras em estudos conduzidos por nosso grupo (Ribeiro *et al.*, 2005; Belo *et al.*, 2011). Entretanto, observamos que as prevalências obtidas para as espécies *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* foram inferiores à observada para *A. jacutinga*, sugerindo que as primeiras possam possuir uma maior resistência à infecção por *Plasmodium* spp. Esta é uma observação intrigante e que certamente compreenderá assunto a ser posteriormente investigado por nosso grupo de pesquisa.

Não percebemos variações sazonais significativas na parasitemia e na prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. nas aves estudadas. Sabe-se que a sazonalidade observada na prevalência e na intensidade da infecção por hemosporídeos está intimamente relacionada a fatores ambientais, tais como umidade e temperatura. Nas regiões onde existem diferenças marcantes entre as estações, a redução da atividade dos vetores, que ocorre nos períodos mais frios ou secos, se reflete na interrupção no ciclo de transmissão. A retomada da transmissão coincide com os meses mais quentes ou chuvosos e com o período reprodutivo das aves nativas (Schrader *et al.*, 2003; Valkiūnas, 2005; Ricklefs & Sheldon, 2007) . Durante este período ocorrem as recaídas, o aumento da densidade populacional dos vetores e o nascimento de jovens hospedeiros altamente suscetíveis ao desenvolvimento de infecções agudas; como conseqüências, observam-se índices de parasitemia e de prevalência mais elevados (Valkiūnas, 2005). Nossas observações podem estar

relacionadas à ausência de diferenças climáticas regionais, que restringissem a atividade do vetor em determinado período do ano. A presença constante do parasito no ambiente pode ter determinado, nas aves expostas, o desenvolvimento de uma resposta imune responsável pelo controle da infecção, resultando em infecções crônicas com baixas parasitemias e sutis variações na prevalência.

1- Parâmetros hematológicos e malária aviária em cracídeos

No eritrograma de *C. blumenbachii* as interferências negativas associadas ao parasitismo foram mais evidentes nos machos. Tais interferências foram observadas nos valores de hematócrito, na contagem de eritrócitos e na concentração de hemoglobina. No grupo das fêmeas não ocorreram diferenças significativas entre aves negativas e positivas. Um dos principais sinais clínicos da infecção por *Plasmodium* é a anemia. O desenvolvimento deste quadro pode estar relacionado à destruição dos eritrócitos causada pelas formas eritrocíticas do parasito (Valkiūnas, 2005; Atkinson, 2008). Em nosso trabalho, as diferenças encontradas entre os machos podem estar ligadas à hemólise e ao consumo de hemoglobina acarretado pelo parasitismo (Sorci, 1995; Oppliger *et al.*, 1996; Madsen *et al.*, 2005); no entanto, as médias de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina observadas no grupo positivo, ainda que inferiores, não são suficientemente baixas para considerarmos que estes indivíduos apresentaram um quadro de anemia, fato corroborado pela ausência de sinais clínicos pertinentes à condição. O eritrograma de *C. blumenbachii* parece não sofrer influências marcantes das variações sazonais, porém, no grupo de machos infectados a média de eritrócitos na coleta de março foi inferior à apresentada em junho. Este fato pode estar ligado ao final do processo reprodutivo que ocorre em março; o estresse vivenciado durante o período de reprodução pode elevar os níveis de corticosterona plasmática, levando a uma imunossupressão transitória. Isso acarreta a elevação da parasitemia, que se reflete em uma maior taxa de destruição de eritrócitos, traduzida pela redução na contagem dos mesmos (Applegate & Bealdoin, 1970; Cranfield *et al.*, 1994).

Diferenças nas contagens de leucócitos podem refletir o “status” basal do sistema imune, ou mesmo variações na saúde de um determinado indivíduo ou espécie (Hörak *et al.*, 1998; Rickfles & Sheldon, 2007). Médias elevadas de leucócitos podem estar relacionadas a uma constituição individual que antecipa às infecções, à resposta exacerbada a uma infecção estabelecida ou mesmo à ineficiência do sistema imune em controlar infecções, gerando a necessidade de se recrutar grande número de leucócitos (Rickfles & Sheldon, 2007). O grupo de machos de *C. blumenbachii* infectados apresentou durante todo o ano médias de leucócitos visivelmente inferiores às encontradas no grupo de machos não infectados; no entanto, somente em dezembro ocorreu diferença, estatisticamente significativa, entre eles. Essa tendência também foi percebida nas fêmeas, porém não observamos diferenças, estatisticamente significativas, entre aves infectadas e não infectadas, tampouco variação anual nos grupos positivo e negativo. Observamos que dezembro foi o período mais crítico na contagem de leucócitos dos machos parasitados, quando foi registrada a média mais baixa. Este fato pode ser explicado levando-se em conta a elevação dos níveis de estresse e do investimento energético dispensado ao auge da temporada reprodutiva. É importante lembrarmos que neste período os machos são responsáveis pela construção do ninho que é item fundamental na corte à fêmea e, ainda, necessitam estabelecer e defender seu território. Alguns estudos demonstram que a reprodução absorve grande parte do metabolismo energético. Durante esse período, é necessário que o organismo mobilize parte dos recursos alocados à função imune para suprir a demanda reprodutiva e tal desvio energético poderia culminar em um quadro de imunossupressão, principalmente em animais debilitados (Oppliger *et al.*, 1996). Além disso, alguns autores já demonstraram o papel do estresse na elevação dos níveis de corticosterona plasmática, tendo como consequência a redução da contagem de leucócitos (Post *et al.*, 2003).

Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes no sangue das aves (Campbell, 2006); conseqüentemente, as variações e as diferenças observadas na contagem total de leucócitos são em grande parte reflexos da dinâmica dos linfócitos. Este fato é corroborado pela observação das médias de linfócitos que se mantiveram inferiores nos animais parasitados ao longo do ano, espelhando as diferenças entre as médias e as variações ocorridas na contagem total de

leucócitos. O mesmo não se repete nas médias de heterófilos que por vezes foram discretamente superiores nos animais parasitados. Os heterófilos representam a segunda linhagem celular mais abundante entre as células brancas das aves e são os principais responsáveis pela resposta inicial do sistema imune frente a infecções. Agem como fagócitos eliminando bactérias e outros agentes infecciosos, tais como vírus e parasitos e, além disso, desempenham um importante papel na resposta inflamatória. Aumento na contagem de heterófilos em resposta a infecção por *Plasmodium* já foi demonstrado em outras aves (Coles, 1997; Apanius *et al.*, 2000; Rickfles & Sheldon, 2007). Quando comparamos a relação heterófilos/linfócitos (H/L) em *C. blumenbachii*, percebemos que as médias tendem a se manter num patamar superior nas aves parasitadas e diferenças, estatisticamente significativas, foram observadas entre machos. A relação H/L funciona como bom preditor dos níveis de corticosterona plasmática; quanto mais alto o valor da relação H/L, maior o nível desse hormônio no organismo. Sabe-se que o estresse é o principal desencadeador da elevação da corticosterona no plasma das aves e esta elevação pode levar à imunossupressão (Ots & Hōrak, 1996; Moreno *et al.*, 2002; Post *et al.*, 2003). O parasitismo por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii* pode funcionar como um fator gerador de estresse fisiológico, uma vez que as aves parasitadas necessitam direcionar recursos energéticos utilizados em outras funções vitais para manter a infecção sob controle.

As médias de eosinófilos não apresentaram diferenças significativas entre as aves negativas e as positivas. Apesar de a eosinofilia estar aparentemente relacionada à infecção por *Plasmodium* em *Turdus* (Rickfles & Sheldon, 2007), não percebemos o mesmo em *C. blumenbachii*. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas médias de monócitos entre aves parasitadas e não parasitadas. Notamos que nos machos e nas fêmeas negativas para *Plasmodium* spp. ocorreram variações significativas durante o ano, porém não observamos elevações que sugerissem monocitose. Os basófilos são os leucócitos mais raros nas aves e, por este motivo, em alguns casos estas células não foram encontradas durante a análise do esfregaço sanguíneo. Não foram percebidas relações entre o parasitismo e as contagens de basófilos e também não houve variação significativa nas médias durante o ano.

As médias de trombócitos não apresentaram diferenças entre animais negativos e positivos. Houve uma diferença entre o mês de dezembro e junho dentro do grupo de machos negativos de *C. blumenbachii*. É importante lembrar que a contagem de trombócitos é muito influenciada pela magnitude dos coágulos formados na amostra (Campbell, 2006). Tendo em vista a grande rapidez com a qual as amostras dos cracídeos se coagulam, variações nas médias de trombócitos podem estar relacionadas a artefatos advindos da coleta de sangue.

No eritrograma de *C. fasciolata* observamos diferenças e variações semelhantes às ocorridas em *C. blumenbachii*. As variáveis do eritrograma de machos parasitados apresentaram médias inferiores; diferenças estatisticamente significativas foram percebidas no hematócrito, na contagem de eritrócitos e na concentração de hemoglobina. Porém, assim como o observado em *C. blumenbachii*, as médias inferiores apresentadas pelos machos infectados de *C. fasciolata* não condizem com um quadro de anemia. Nos machos negativos notamos uma diferença nas médias de hematócrito e hemoglobina entre o mês de setembro e dezembro e as variações podem estar relacionadas com as alterações fisiológicas observadas durante o período da reprodução (Sturkie, 1986; Sergent *et al.*, 2004). O grupo de fêmeas não apresentou diferenças significativas entre as aves positivas e as negativas, porém é possível observar que as médias do eritrograma do grupo infectado apresentam-se num patamar inferior ao observado no grupo não infectado. Estas observações reforçam a teoria segundo a qual os hemoparasitos são responsáveis pela redução dos valores do eritrograma (Oppliger *et al.*, 1996; Booth & Elliott, 2003; Madsen *et al.*, 2005).

Os machos de *C. fasciolata* parasitados apresentaram no mês de junho valores de leucócitos inferiores aos observados nos machos negativos, porém, essa tendência não se confirmou em todos os meses nem entre o grupo das fêmeas. Notamos que a variação no perfil leucocitário das fêmeas de *C. fasciolata* segue o mesmo padrão observado nas fêmeas de *C. blumenbachii*, percebido como uma diminuição nas médias de leucócitos entre o período de setembro a junho e este fato pode estar ligado às variações hormonais vividas ao longo do ano (Dein, 1986; Sturkie, 1986; Sergent *et al.*, 2004). Em contraste ao observado em *C. blumenbachii*, as médias de linfócitos de *C. fasciolata* não

apresentaram diferenças ou variação anual significativa entre os grupos negativos e positivos. As médias de heterófilos não seguiram um padrão definido de diferenças entre animais negativos e positivos. Machos negativos apresentaram média significativamente superior aos positivos em setembro e, ao mesmo tempo, inferior em junho. Ao analisarmos a relação H/L não encontramos diferenças, estatisticamente significativas, entre aves positivas e negativas, a demonstrar que nesta espécie o parasitismo por *Plasmodium* spp. parece não exercer influências sobre esta relação. As médias das contagens de eosinófilos e monócitos não diferiram significativamente entre os grupos negativos e positivos de *C. fasciolata*. Nesta espécie, as influências causadas pelo parasitismo nas populações de leucócitos podem ter sido subestimadas, acreditamos que seja necessário avaliar um número ainda maior de aves a fim de ratificar nossas observações. Entretanto, pelas razões já apresentadas, aumentar este número de aves amostradas constitui uma tarefa difícil.

Na análise dos dados referentes ao eritrograma de *A. jacutinga* não foram observadas diferenças significativas entre as aves positivas e as negativas de ambos os sexos. Contudo, percebemos que entre as fêmeas o grupo parasitado apresentou médias inferiores de hematócrito e hemoglobina. Observou-se média de leucócitos superior entre as fêmeas parasitadas e esta elevação é notada principalmente na média de linfócitos, sugerindo uma resposta leucocitária frente ao parasitismo. Notamos diferença, estatisticamente significativa, na contagem de monócitos entre fêmeas: o grupo positivo apresentou média superior ao negativo. Os monócitos das aves desempenham um importante papel na atividade fagocitária e no processamento de antígenos. Geralmente, a monocitose se relaciona com infecções por microorganismos causadores de lesões granulomatosas (Campbell, 2006) e até o presente momento não havia sido relacionada à infecção por hemoparasitos. O papel dos monócitos na malária aviária não é bem definido, carecendo-se de mais estudos para melhor compreensão desta relação.

2- Parâmetros bioquímicos e malária aviária em cracídeos

Não observamos em *C. blumenbachii* diferenças relevantes nos níveis plasmáticos de PPT entre aves negativas e positivas de ambos os sexos. Entretanto, percebemos diferenças quando comparamos as médias de PPT entre *C. fasciolata* negativos e positivos de ambos os sexos. Notamos que os indivíduos parasitados apresentaram médias inferiores às observadas nas aves não parasitadas. Nossos resultados contrariam as observações de Williams (2005), que demonstrou a ocorrência de uma elevação dos níveis de PPT em *Gallus gallus* na fase aguda da infecção por *Plasmodium gallinaceum*. Esta elevação ocorreu principalmente devido ao grande aumento da fração γ -globulina, acarretado pela resposta dos anticorpos ao dano tecidual gerado pelo parasitismo agudo. No entanto, os valores de PPT mais elevados que observamos nas aves negativas estão relacionados, em grande parte, aos níveis de albumina que são superiores nas mesmas. Tudo indica que nossas amostras advieram de animais cronicamente infectados e este fato é o responsável pelas diferenças observadas entre nossos resultados e os de Williams (2005). De fato, a parasitemia, quando passível de determinação pela análise microscópica de esfregaços sanguíneos, foi extremamente baixa, a indicar cronicidade de infecção nas aves avaliadas. Durante o ano ocorreram variações nos níveis de PPT no grupo negativo em ambas as espécies: machos *C. blumenbachii* assim como machos e fêmeas de *C. fasciolata* apresentaram um pico nos valores de PPT em março. O teor de PPT representa o metabolismo global de proteínas e está sujeito a variações fisiológicas relacionadas ao processo de renovação das penas, à síntese de precursores da gema, assim como à condição física das aves (Sergent *et al.*, 2004; Lumeij, 2008). Acredita-se que as variações de PPT observadas em nosso trabalho podem estar ligadas às diferentes taxas metabólicas que são relacionadas aos períodos de reprodução e muda de penas.

Observamos médias de AST significativamente mais elevadas nos grupos de aves positivas de ambas as espécies de Mutuns. As aves apresentam alta atividade de AST principalmente nos hepatócitos e musculatura esquelética (Hochleithner, 1994; Lumeij, 1997; Campbell, 2006). Portanto, a elevação desta enzima no grupo de animais infectados sugere

algum grau de lesão celular hepática ou muscular, associada à infecção por *Plasmodium* spp. Assim como se observa na enzima AST, ocorreram diferenças significativas nos valores de ALT entre as aves parasitadas e as não parasitadas, de ambas as espécies de *Crax*; os grupos positivos apresentaram médias superiores às observadas nos grupos negativos. A enzima ALT, apesar de não ser específica, também é utilizada para a avaliação de distúrbios hepatocelulares nas aves (Lumeij, 1997; Campbell, 2006; Lumeij, 2008). Estudos demonstraram que a presença de esquizontes no endotélio de órgão viscerais, tais como fígado, rins e baço pode gerar danos funcionais a estes órgãos e é possível se observar sinais desses danos, quando ocorrem mudanças nos teores de certos componentes plasmáticos (Fleishman *et al.*, 1968; Graczyk, *et al.*, 1995). As evidências de alterações observadas na enzima AST e as elevações nos níveis de ALT percebidas nas aves parasitadas corroboram a hipótese de dano hepático possivelmente decorrente do parasitismo por *Plasmodium* spp. Entretanto, a relação causa-efeito não pôde ser definida em nosso trabalho, merecendo estudos posteriores.

Ocorreu variação anual nos níveis de AST e ALT em ambas as espécies de mutuns, o que demonstra a influência da sazonalidade na atividade destas enzimas. As concentrações mais altas de AST foram observadas em março e o fato pode estar relacionado com a variação da taxa metabólica entre o fim do período reprodutivo e o início da muda nestas espécies.

A mensuração do ácido úrico plasmático nas aves serve como um sensível indicador da função renal (Lewandowski, *et al.*, 1986). Ao compararmos as concentrações AU entre os mutuns parasitados e os não parasitados não observamos diferenças relevantes, o que é sugestivo de não haver relação entre o parasitismo e possíveis danos renais nestas espécies. Além disso, nossos resultados corroboram as observações feitas por Williams (2005), que também não percebeu elevação nos teores plasmáticos de AU em aves parasitadas. Foi percebida uma pequena variação na concentração plasmática de AU nos machos negativos de *C. fasciolata*, porém, esta observação isolada não é suficiente para afirmarmos que ocorre variação sazonal de AU nesta espécie.

Não foram observadas diferenças significativas nas médias de uréia e creatinina entre os mutuns parasitados e não parasitados. No entanto,

observou-se um fato isolado no grupo de fêmeas negativas de *C. fasciolata*: estas apresentaram no mês março média de creatinina significativamente superior à observada no grupo negativo. Elevações na concentração plasmática de creatinina estão relacionadas a disfunções renais nas aves, porém, a análise isolada deste metabólito é pouco específica e, portanto, de limitado valor diagnóstico (Lierz, 2003; Campbell, 2006). Além disso, a média superior de creatinina observada nas fêmeas negativas de *C. fasciolata* está dentro da faixa de valores considerados normais em aves (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006; Lumeij, 2008). Portanto, a diferença notada entre o grupo de fêmeas parece não ter relação direta com o parasitismo por *Plasmodium* spp.

Não observamos diferenças, estatisticamente significativas, na concentração plasmática de Ca quando comparamos indivíduos parasitados e não parasitados de ambas as espécies de mutuns. O que nos sugere que parasitismo por *Plasmodium* não influencia os níveis deste eletrólito no plasma das espécies analisadas. No entanto, observamos nas fêmeas negativas de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* um pico na concentração de Ca no mês de setembro e esta elevação coincide com o início do período de postura dessas espécies. O aumento dos níveis de cálcio no período ovulatório já foi observado em outras espécies de aves e advém do aumento fisiológico na demanda desse mineral, a fim de possibilitar a calcificação da casca do ovo e a contratilidade uterina durante a oviposição (Ross *et al.*, 1978; Hochleithner, 1994; Campbell, 2006; Lumeij, 2008).

As médias de P não diferiram entre as aves positivas e as negativas em ambas as espécies de *Crax*, sugerindo que a infecção por *Plasmodium* não afeta os níveis plasmáticos desse eletrólito. Não ocorreram variações significativas de nos níveis de P plasmático ao longo do período amostrado. Devido à presença de altas concentrações de fosfato nos eritrócitos (Hochleithner, 1994), as discretas variações observadas nos níveis de fósforo podem estar relacionadas à ocorrência de algum grau de hemólise em amostras específicas.

Não encontramos, nas duas espécies de Mutuns analisadas, diferenças nas médias de FA entre os grupos parasitados e os não parasitados. Aparentemente, não existe relação entre o parasitismo por *Plasmodium* spp. e a concentração plasmática de FA nas espécies estudadas. As variações

encontradas ao longo do ano nas fêmeas de *C. blumenbachii* e nos machos de *C. fasciolata* foram inespecíficas; no entanto, variações sazonais nos níveis de FA já foram relatadas em outras espécies de aves (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006).

As médias da enzima LDH não apresentaram diferenças, estatisticamente relevantes, com relação à infecção por *Plasmodium* spp. em ambas as espécies de Mutuns avaliadas. Segundo Hochleithner (1994), os eritrócitos possuem alta atividade de LDH e amostras com qualquer grau de hemólise podem gerar resultados falsamente elevados. Portanto, acreditamos que as variações observadas provavelmente estão relacionadas à ocorrência de hemólise em algumas das amostras.

Percebemos diferenças significativas nas médias de glicose entre as aves positivas e as negativas. No entanto, estas diferenças ocorreram somente no mês de junho e foram restritas ao grupo de fêmeas de ambas as espécies de Mutuns. As fêmeas parasitadas apresentaram valores de glicemia abaixo de 200 mg/dL sugestivo de hipoglicemia. Nas aves este quadro geralmente está associado a períodos prolongados de jejum, lesões hepáticas, septicemia ou distúrbios endócrinos (Roskopf & Woerpel, 1984, Lumeij, 2008). É possível que as fêmeas parasitadas utilizem maiores quantidades de glicose para a manutenção dos seus gastos energéticos durante o período reprodutivo e o início da muda, resultando em taxas de glicose inferiores no mês de junho.

Os valores de PPT, AST, ALT, UA, CREAT, Uréia, Ca, P, FA e Glicose não apresentaram diferenças, estatisticamente relevantes, relativas à infecção por *Plasmodium* spp. em *A. jacutinga* de ambos os sexos. O grupo de machos não parasitados apresentou média de LDH superior à observada no grupo não parasitado. A elevação da concentração plasmática de LDH geralmente está associada a danos hepáticos ou musculares (Hochleithner, 1994; Campbell, 2006; Lumeij, 2008). Entretanto, nossos resultados parecem ser inespecíficos, uma vez que não observamos alterações nas médias de ALT e AST; além disso, as médias de LDH de ambos os grupos (negativo e positivo) encontram-se dentro da faixa valores considerados normais em aves saudáveis (Bailey *et al.*, 1997; Campbell, 2006). Portanto, acreditamos que a alteração observada na concentração plasmática de LDH não apresenta relação direta com o

parasitismo, mas com a eventual ocorrência de hemólise em algumas amostras.

3- Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas e malária aviária em cracídeos

Observamos sete frações protéicas distintas no plasma dos cracídeos estudados: pré-albumina, albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina. A ocorrência dessas frações já foi descrita no plasma/soro de outras espécies de aves (Hasegawa, 2002; Williams, 2005; Lumeij, 2008). Ao analisarmos as influências do parasitismo por *Plasmodium* spp. no perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* notamos diferentes respostas entre sexos e espécies. Da mesma maneira, a influência da sazonalidade manifestou-se de forma diversa entre os mutuns. O parasitismo não determinou diferenças significativas entre as fêmeas de *C. blumenbachii*. No entanto, os machos positivos apresentaram valores de α_2 -globulina, β_1 -globulina e β_2 -globulina superiores aos observados no grupo negativo, sugerindo uma possível associação entre o parasitismo e a elevação dessas frações.

Os grupos negativos de machos e fêmeas de *C. fasciolata* apresentaram médias de albumina significativamente superiores aos grupos parasitados. Este fato sugere a existência de uma relação entre o parasitismo por *Plasmodium* e a redução nas médias de albumina nesta espécie. Nas aves sadias a fração albumina é a maior fração protéica, processos infecciosos podem causar elevações nas frações α , β e γ . Geralmente, nestas situações ocorre redução nos valores de albumina (Hochleithner, 1994). Nossos resultados são parcialmente corroborados pelas observações feitas por Williams (2005) e Sherman & Hull (1960), que descreveram a existência de uma influência negativa do parasitismo por *Plasmodium* na concentração de albumina; entretanto, ocorre uma discordância quanto a elevação da fração α_2 -globulina que foi observada em *C. blumenbachii*. No estudo de Williams (2005) não foram constatadas diferenças nas frações de β -globulina entre aves parasitadas e não parasitadas; entretanto, a elevação desta fração que foi percebida no grupo parasitado de *C. blumenbachii* coincide com resultados obtidos por Sherman & Hull (1960). Ao contrário do que foi observado pelos

autores citados anteriormente, não percebemos elevações da concentração plasmática de γ -globulina nos indivíduos parasitados por *Plasmodium* spp. A infecção por *Plasmodium* spp. não ocasionou alterações evidentes no perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *A. jacutinga*. As disparidades observadas em nossos resultados podem estar relacionadas aos diversos padrões de resposta imune frente ao parasitismo, que são particulares às diferentes espécies de hospedeiros.

Na análise dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*, notamos a existência de respostas distintas frente ao parasitismo por *Plasmodium* spp. e estas respostas se relacionaram especificamente a cada espécie e também ao sexo. Percebemos que os machos de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata* apresentaram influências negativas decorrentes do parasitismo mais evidentes que as fêmeas, principalmente nas variáveis hematológicas. Estudos já demonstraram que machos geralmente tendem a sofrer mais os efeitos das infecções parasitárias, além de possuírem resposta imune menos pronunciada que as fêmeas. As diferenças relativas aos sexos podem estar relacionadas à propriedade imunodepressora dos hormônios andrógenos em contraste com os efeitos imunestimulantes dos estrógenos (Zuk & Stoerh, 2002; Tschirren, 2003; Kilgas, 2007). Além disso, os hormônios esteróides sexuais parecem afetar os genes responsáveis pela resistência às doenças, assim como certas características comportamentais, que fazem com que machos sejam mais suscetíveis às infecções (Klein, 2000).

Notamos que o parasitismo pareceu determinar maior ocorrência de desvios fisiológicos (hematológicos e bioquímicos) nas aves do gênero *Crax* do que em *A. jacutinga*. Isto pode estar ligado ao fato de termos amostrado somente uma única vez as últimas, deixando de documentar possíveis alterações que poderiam ocorrer em outros períodos do ano. Entretanto, alguns autores já demonstraram a existência de diferenças marcantes entre os parâmetros fisiológicos das diversas espécies de aves (Hochleithner, 1994; Bounous & Stedman, 2000; Campbell, 2006; Lumeij, 2008), o que se refletiria em uma resposta específica frente à infecção por hemosporídeos. Além disso, tal ocorrência pode estar ligada ao fato de que cada espécie estabelece um histórico de co-evolução com o parasito: a relação parasito-hospedeiro

estabelecida por cada uma relaciona-se com suas características biológicas, comportamentais, bem como com o habitat que ocupa.

Todas as aves analisadas no presente estudo apresentavam-se clinicamente saudáveis embora alguns trabalhos anteriores já tenham demonstrado efeitos deletérios evidentes da malária aviária na saúde das aves hospedeiras (Atkinson & Van Riper, 1991; Dessler & Bennett, 1993), tais como anemia hemolítica, leucocitose e linfocitose (Campbell, 2006). Elevações nos valores de proteínas plasmáticas totais, aspartato aminotransferase, γ -glutamilttransferase, e glutamato desidrogenase, além da redução na concentração de creatinina também já foram observadas (Williams, 2005). De fato, vários estudos têm comprovado o impacto da presença dos plasmódios aviários nas taxas de sobrevivência, no sucesso reprodutivo e até no comportamento das aves hospedeiras (Lachish et al., 2011; Dunn et al., 2011; Knowles et al., 2010a; Knowles et al., 2010b; Marzal et al., 2008; Ortego et al., 2008; Moller & Nielsen, 2007). A magnitude das alterações parece estar diretamente relacionada à intensidade da infecção, que é avaliada pelo nível de parasitemia (Booth & Elliot, 2002). No entanto, a maioria das infecções por *Plasmodium* observadas em aves silvestres é de caráter subclínico e apresentam baixas intensidades. São raros os relatos de surtos associados às relações parasito-hospedeiro anormais, que eventualmente podem ocorrer em coleções de aves em cativeiro (Atkinson, 2008). As sutis alterações causadas pelo parasitismo nos parâmetros avaliados em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* neste estudo corroboram as observações realizadas por Booth & Elliott (2002), Rickfles & Sheldon (2007) e Nazifi *et al.* (2008) em outras espécies de aves. A ausência de efeitos deletérios evidentes pode ser fruto da baixa intensidade de infecção, evidenciada pela baixa parasitemia (1 a 5 parasitos por 200 campos microscópicos) observada em todas as amostras analisadas. Além disso, observamos na grande maioria dos esfregaços sanguíneos apenas trofozoítos jovens de *Plasmodium* spp., dificultando ainda mais a identificação morfológica. A escassez de formas evolutivas do parasito em animais saudáveis sugere a existência de uma resposta imune mediada controlando a infecção (van Riper *et al.*, 1994).

Não constatamos alterações drásticas induzidas pelo parasitismo por *Plasmodium* spp. nas espécies estudadas, tendo em vista o caráter crônico do

parasitismo. Geramos informações básicas acerca dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*. Da mesma maneira, validamos a metodologia para a avaliação da ocorrência de *Plasmodium* spp. nestas espécies.

Considerando-se que determinamos a possível expectativa de prevalência de *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* mantidos em cativeiro, nossos resultados podem servir de referência para o estabelecimento de programas de manejo sanitário. As coleções de cracídeos devem ser avaliadas previamente em quarentena e medidas de biossegurança devem ser adotadas. A mais importante delas, neste caso, é a instalação de telas à prova de insetos para aviários. Criatórios científicos e conservacionistas que abrigam cracídeos devem considerar a possibilidade de ocorrência de infecções severas em espécies que não possuem histórico de parasitismo por *Plasmodium* (Atkinson, 2008).

A conservação de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga* pode depender da avaliação dos impactos das doenças e de outras ameaças como a disponibilidade alimentar, predação e competição na sobrevivência dessas espécies (Kilpatrick *et al.*, 2006). Pelo fato das aves infectadas cronicamente conseguirem sobreviver e se reproduzir, elas podem ser utilizadas para criação em cativeiro, com vistas ao fomento de projetos de reintrodução.

7. CONCLUSÕES

- A utilização da análise microscópica de esfregaços sanguíneos e da amplificação dos genes estrutural 18S rRNA e mitocondrial SSU de *Plasmodium* spp., em paralelo, demonstrou ser eficaz para o diagnóstico da infecção por *Plasmodium* spp. em cracídeos.
- Geramos informações básicas acerca dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de *C. blumenbachii*, *C. fasciolata* e *A. jacutinga*.
- Nas condições estudadas, a prevalência média de infecção por *Plasmodium* spp. em *C. blumenbachii* é de 18,3% para machos e 12,5% para fêmeas; em *C. fasciolata* a média é de 18,2% em machos e 20% em fêmeas. Em aves da espécie *A. jacutinga* a prevalência em machos e fêmeas é de 52,65% e 34,8%, respectivamente.
- Não há diferença na prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. entre machos e fêmeas nas espécies de cracídeos estudados.
- Não ocorre variação sazonal na prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em aves das espécies *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*, nas áreas de estudo.
- O parasitismo por *Plasmodium* spp. relaciona-se negativamente aos valores de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina em machos de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*.
- O parasitismo por *Plasmodium* spp. relaciona-se negativamente à concentração de hemoglobina de fêmeas de *C. fasciolata*, no início do período reprodutivo.
- O parasitismo por *Plasmodium* spp. parece influenciar a elevação da contagem de monócitos em fêmeas de *A. jacutinga*.

- A infecção por *Plasmodium* spp. parece determinar a elevação dos teores plasmáticos das enzimas AST e ALT em *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*.
- Após o período reprodutivo, o parasitismo por *Plasmodium* spp. parece influenciar a redução da concentração plasmática de glicose em fêmeas de *C. blumenbachii* e *C. fasciolata*.
- Em machos de *C. blumenbachii*, a infecção por *Plasmodium* spp. parece influenciar o perfil das proteínas plasmáticas elevando os valores das frações α_1 -globulina, β_1 -globulina e β_2 -globulina.
- O parasitismo por *Plasmodium* spp. relaciona-se à redução dos valores plasmáticos de albumina nas aves da espécie *C. fasciolata*.
- Nas condições estudadas, a infecção crônica por *Plasmodium* spp. não determina alterações evidentes na bioquímica plasmática em *A. jacutinga*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, R. M., May, R. M. Population biology of infectious disease. *Nature*, v. 280, p. 361-366, 1979.
- Apanius, V., Yorinks, N., Bermingham, E., Ricklefs, R. E. Island and taxon effects in parasitism and resistance of Lesser Antillean birds. *Ecology*, v. 81, p. 1959-1969, 2000.
- Apanius, V. Stress and immune defence. *In: Moller, A. P., Millinski, M., Slater, P. J. B. Stress and behavior: advances in the study of behavior*, v. 27, p. 133-153, 1998.
- Applegate, J.E., Bealdoin, R.L. Mechanism of spring relapse in avian malaria: effect of gonadotropin and corticosterone. *Journal of wildlife diseases*, v. 6, p. 443-447, 1970.
- Arctander, P. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal of Ornithology*, v. 129, p. 205-216, 1988.
- Atkinson, C. T., van Riper III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. *In: Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour* (J. E. Loye and M. Zuk, eds.), Oxford Univ. Press, Oxford, p. 19-48, 1991.
- Atkinson, C. T., Woods, K. L., Dusek, R. J., Sileo, L.S., Iko, W. M. Wildlife diseases and conservation in Hawaii: Pathogenicity of avian malaria in experimentally infected liwi. *Parasitology*, v. 11, p. 59 – 69, 1995.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., Iko, W. M.. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 36, p.197–204, 2000.
- Atkinson, C. T. Avian Malaria. *In: Parasitic Diseases of Wild Birds* (C. T. Atkinson, N. J. Thomas, D. Bruce Hunter, Eds.). Wiley-Blackwell, Iowa. p. 35-53, 2008.
- Azeredo, R. M. *Crax blumenbachii* Spix, 1825. *In: Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais* (Machado, A.B.M., G.A.B. Fonseca, R.B. Machado, L.M.S. Aguiar, L.V. Lins Eds.). Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. p. 246-248, 1998.
- Barger, M. A., Grindem, C. B. Analyzing the results of a complete blood cell count. *Veterinary Medicine*, v. 95(7), p. 534 – 553, 2000.
- Barker, Jr. R. H., Banchongaksorn, T., Courval, J. M. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, v. 46, p. 416-426, 1992.

- Bailey, T. A., Wernery, I. U., Naldo, J., Samour, J. H. Plasma Concentration of Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase in Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) Immediately Following Capture. *Comparative Haematology International*, v. 1, p. 113-116, 1997.
- Belo, N. O., Passos, L. F., Júnior, L. M. C., Goulart, C. E., Braga, E. M. Avian Malaria in Captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Preventive Veterinary Medicine*, v.88, p. 220-224, 2009.
- Belo, N. O., Pinheiro, R. T., Reis, S. E., Ricklefs, R. O., Braga, E. M. Host species and parasite lineage diversity of haemosporidians in three different environments with distinct levels of disturbance. *Plos One*, 6:17654, 2011.
- Birdlife International 2000. *Threatened Birds of the World*. Barcelona: Lynx Editions.
- Booth, C. E., Elliot, P. F., Hematological responses to hematozoan in North American and neotropical songbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 133, p. 451 – 467, 2003.
- Braga, E. M., Silveira, P., Belo, N. O., Valkiūnas, G. Recent advances in avian malaria studies: an overview, with emphasises on distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011 (*in press*).
- Bounous, D. I., Stedman, N.L. Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed, Philadelphia, Lippincot, Williams & Wilkins, p.1147-1154, 2000.
- Campbell, T. W. Hematology of exotic animals. *Compendium on Continuing Education of Practicing Veterinarian*, v. 13, n. 6, p. 950-956, 1991.
- Campbell, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins. p. 479-492, 2004.
- Campbell, T. W. Bioquímica clínica de aves. In: THRALL, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo, Roca. p. 448-459, 2006,
- Campbell, T.W., Ellis, C. K. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. p, 3-50, 2007.
- Caziani, S.M., Mosqueira, M., Monasterio-Gonzo, G., Derlindati, E.,Merler, J. Informe sobre las especies de Argentina. In: *The Cracidae: their Biology and Conservation* (Strahl, S.D. Beaujon, S. Brooks, D.M. Begazo, A.J. Sedaghatkish, Olmos, G. F. Eds.). Washington, Hancock House Publications, p. 492-502, 1997.

- Castle, M. D., Chritensen, B. M. Hematozoa of wild turkeys from the midwestern United States. Translocation of wild turkey and its potential role in the introduction of *Plasmodium kemp*. *Journal of Wildlife Disease*, v. 26, p. 180-185, 1990.
- Clay, R.P. The status and conservation of the cracids of Paraguay. *In: Cracid Ecology and Conservation in the New Millenium* (D.M. Brooks e F. González-García, Eds.). *Miscellaneous Publications of the Houston Museum of Natural Science*, v. 2, p. 124-138, 2001.
- Clayton, B.H., Moore, J. Introduction. *In: Host-parasite evolution, general principals and avian models*. Oxford University Press: Oxford, p. 1 – 6, 1997.
- Coles, B.H. *Avian medicine and surgery*. Blackwell Science, Oxford, p.26-96, 1997.
- Coltman, D. W. , Pilkington, J.G. , Smith, J. A., Pemberton, J.M. Parasite mediator selection against inbred soay ship in free-living island population. *Evolution*, v.53, p.1259 – 1267, 1999.
- Cranfield, M. R., Graczyk, T. K., Beall, F. B., Ialeggio, D. M., Shaw, M. L., Skjoldager, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. *Journal of Wildlife Disease*, v. 30, p. 372-376, 1994.
- Dawson, R. D., Bortolotti, G. R. Are avian hematocrits indicative of condition? American Kestrels as a model. *Journal of Wildlife Management*, v. 61, n. 4, p. 1297-1306, 1997.
- Dein, F. J. Hematology *In: Clinical avian medicine and surgery*, (Coles, E. H. Ed.) Saunders, Philadelphia, p. 174-191, 1986.
- Dunn, J. C., Cole, E. F., Quinn, J. L. Personality and parasites: sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioural traits. *Behav Ecol Sociobiol* v. 65, p.1459–1471, 2011.
- Dieterlen-Lievre, F. Birds. *In: Vertebrate Blood Cells*. (Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A. Eds.) Cambridge University Press, New York, p. 257–336, 1988.
- Dunlap, K. D., Schall, J. J. Hormonal Alterations and Reproductive Inhibition in Male Fence Lizards (*Sceloporus occidentalis*) Infected with the Malarial Parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiological Zoology*, v. 68, n. 4, p. 608-621, 1995.
- Del Hoyo, J. Family Cracidae. *In: Handbook of the Birds of the World: New World vultures to guineafowl*. (Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. Eds.), Lynx Edic., Barcelona, p. 310-363, 1994.

- Fallon, S. M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in Lesser Antilles. *Evolution*, v. 57, p. 606-615, 2003.
- Fallon, S. M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the lesser Antilles. *The American Naturalist*, v. 165, n. 4, p. 466-480, 2005.
- Filipović, N., Stojević, Z., Milinković-Tur, S., Ljubić, B. B., Zdelar-Tuk., M. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. *Veterinarski Arhiv*, v. 77 (4), p. 319-326, 2007.
- Fleischman, R. W., Squire, R. A., Sladen, W. J., Melby, E. C. Jr. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). *J American Veterinary Medicine Association*, v. 153, p. 928-935, 1968.
- Fraga, R. La categorización de las aves argentinas. *In: Libro Rojo de Mamíferos y Aves Amenazados de la Argentina* (J. García Fernández, R. Ojeda, G. Díaz e R. Baigún, Eds.). FuCEMA. Buenos Aires, Argentina, 1997.
- Fowler, M. E. *Zoo and Wildlife Medicine*, ed 2. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996.
- Fox, A. J., Solomon, J. B., Chicken non-lymphoid leukocytes. *In: Avian immunology* (Rose, M.E., Payne L.N., Freeman, B.M. Eds). British Poultry Science, Edinburgh, p 135-166, 1981.
- Fudge, A. M. Avian Complete Blood Count. *In: FUDGE, A.M. Laboratory Medicine – Avian and Exotic Pets*, W.B. Saunders, p.9-18, 2000.
- Garnham, P. C., (Ed.). *Malaria parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 1114, 1966.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Mccutchan, T. F. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitology Research*, v. 80, p. 634-637, 1994.
- Grecchi, R, Saliba, A.M., Mariano, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *Journal of Pathology* 130: 23–31, 1980.
- Gregory, C.R. Urinary System. *In: Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., Prasse, K.W. Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology*, 4th ed. Blackwell Publishing, p. 231-259, 2003.
- Hamilton, W. D., And M. Zuk. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science*, v. 218, p. 384-387, 1982.

- Hasegawa, M. Y., Fontequé, J. H., Kohayagawa, A., Boretti, L. P. Serum Protein Electrophoresis Evaluation in Adult Broiler Breeders (*Gallus Gallus Domesticus*) of the Avian Farm Strain. *Brazilian Journal of Poultry Science* v. 4(3), p. 203-207, 2002.
- Herbert, R., Nanney, J., Spano, J.S., Pedersoli, W. M., Krista, L.M. Erythrocyte distribution in ducks. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, p. 958-960, 1989.
- Hedrick, P.W. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *The American Naturalist*, v. 143, p. 945 – 964, 1994.
- Henning, L., Felger, I., Beck, H. P. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Tropica*, v. 72 p. 149-155, 1999.
- Hochleithner, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W. *Avian Medicine: Principles and Application*. Florida: Wings Publishing, p. 223-245, 1994.
- Hodges, R.D. Normal avian (poultry) haematology. In: *Comparative clinical haematology*. (Archer, R.K., Efcott, L.B. Eds.). London: Blackwell Scientific Publications, p.483-517, 1977.
- Hõrak, P., Ots, I., Murumägi, A. A hematological health state indices of reproducing great tits: a response to brood size manipulation. *Oecologia*, v. 116, p. 441 – 448, 1998.
- IBAMA. *Plano de Ação para a Conservação do Mutum do Sudeste Crax blumenbachii - Série Espécies Ameaçadas*. Ministério do Meio Ambiente: Brasília, v. 1, p. 53, 2003.
- Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, A., Wiehn, J. Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia*, v.136, p. 148 – 154, 2003.
- IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <http://www.redlist.org/search/>. Acesso em 13/10/2009.
- IUCN/SSC/ Conservation Breeding Specialist Group. *Conservation assessment and management plan for neotropical guans, curassows and chachalacas*. Houston: CBSG, p. 198, 1995.
- Juráni, M., Výboh, P., Zeman, M., Lamosová, D., L`Ubor, K., Blazícek, P. Post-hatching dynamics of plasma biochemistry in free-living European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138, p. 89 – 95, 2004.
- Jain, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 349-380, 1993.
- Jarvi, S. I., Schultz, J. J., Atkinson, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of Parasitology*, v. 88, p.153-158, 2002.

- Kawai, T. Clinical aspects of the plasma proteins. Igaku Shoin Ltd, Tokio and Springer-Verlag, Berlin, pp. 464, 1973.
- Kilgas, P., Mänd, R., Mägi, M., Tilgar, V. Hematological parameters in brood-rearing great tits in relation to habitat, multiple breeding and sex. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 144, p.224–231, 2006.
- Kilgas, P., Tilgar, V., Mägi, M., Mänd R. Physiological condition of incubating and brood rearing female Great Tits *Parus major* in two contrasting habitats. *Acta Ornithologica*, v. 42, p. 129–136, 2007.
- Kilpatrick, A. M., LaPointe, D. A. Atkinson, C. T. Woodworth, B. L. Lease, J. K. Reiter, M. E., Gross, K. Effects of chronic avian malaria (*plasmodium relictum*) infection on reproductive success of Hawaii Amakihi (*hemignathus virens*). *Auk*, v.123(3), p. 764-774, 2006.
- Klein, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24(6), p.627-638, 2000.
- Knowles, S.C., Palinauskas, V., Sheldon B. C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *J Evol Biol*, v. 23, p. 557-569, 2010a.
- Knowles, S. C. L., Wood, M. J., Sheldon, B. C. Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia*, v. 164, p. 87-97, 2010b.
- Lachish, S., Knowles, S. C. L., Alves, R., Wood, M. J., Sheldon, B. C. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *Journal of Animal Ecology*, p.1-11, 2011.
- Lam, K.M., Kabbur, M.B., Eiserich, J.P. Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 53, p. 313–327, 1996.
- Lewandowski, A.H., T.W. Campbell, T. W., Harrison, G. J. Clinical Chemistries. *In: Clinical Avian Medicine*, (Harrison, G.J., Harrison, L. R. Eds.). Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 717, 1986.
- Lierz, M. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*, v. 6, p. 29-55, 2003.
- Lumeij, J. T., Meidam, M., Wolfswinkel, J., Van der Hage, M. H., Dorrestein, G. M. Changes in plasma chemistry after drug-induced liver disease or muscle necrosis in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology*, v. 17(4), p. 865-874, 1988.

- Lumeij , J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: Kaneko, J.J., Harvey , J.W., Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals 5th edition*. San Diego, Academic Press, pp. 932, 1997.
- Lumeij , J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: Kaneko, J.J., Harvey , J.W., Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals 5th edition*. San Diego, Academic Press, p. 839-872, 2008.
- Madsen, T., Ujvari, B., Olsson, M. Old Pythons stay fit, effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia*, v. 142, n. 3, p. 407-412, 2005.
- Marvin, H. N., Rigdon, R. H. Terminal hypoglycemia in ducks with malaria *Am. J. Epidemiol.* v. 42: p. 174 -178, 1945.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J., De Lope, F. Effects of malaria double infection in birds: One plus is not two. *J Evol Biol*, v. 21, p. 979- 987, 2008.
- Massey, J. G., Graczyk, T. K., Cranfield, M.R. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in naïve Hawaiians crows in Hawaii. *Journal of Parasitology*, v. 82, p. 182 – 185, 1996.
- Maxwell, M. H. 1987. The avian eosinophil-a review. *World's Poultry Science Journal*, v. 43:190-207, 1987.
- Mitchell, E. B., Johns, J. Avian hematology and related disorders. *Veterinary Clinics Exotic Animal Prattice*, v. 11, p. 501 – 522, 2008.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 1ª ed. - Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte/MG: Fundação Biodiversitas, 2008.
- Moller, A. P. Parasitism and the evolution of host life history. *In Host-parasite evolution, general principals and avian models*. Oxford University Press: Oxford, p. 105 – 127, 1993.
- Moller, A.P., Nielsen, J.T. Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. *Ecology*, v. 88, p. 871-881, 2007.
- Montali, R.L. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds, and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, v.99, p.1-26,1988.
- Moreno, J., Merino, S., Sanz, J. J., Arriero, E. An indicator of maternal stress is correlated with nestling growth in pied flycatchers. *Avian science*. v. 2, p. 175 – 182, 2002.
- Munson, L., Cook, R.A. Monitoring investigation and surveillance of diseases in captive wildlife. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.24, p.281-289, 1993.

- Natt, M. P., Herrick, C. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chicken. *Poultry Sci.*, v. 31, p. 735-738, 1952.
- Nazifi, S., Razavi, S. M., Yavari, F., Rajaifar, M., Bazyar, E., Esmailnejad, Z. Evaluation of hematological values in indigenous chickens infected with *Plasmodium gallinaceum* and *Aegyptianella pullorum*. *Comparative Clinical Pathology*, v. 17, p. 145–148, 2008.
- Novaes, F.C. e M.F.C. Lima. *Aves de Grande Belém: Município de Belém e Ananindeua*, Pará. Museu Paraense Emílio Goeldi. Brasil, 1998.
- Oppliger, A., Célérier, M. L., Clobert, J. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by Haemogregarines. *Parasitology*, v. 113, p. 433-438, 1996.
- Ortego, J., Cordero, P. J., Aparicio, J. M., Calabuig, G. Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *Journal of Ornithology*, v. 149, p. 337–343, 2008.
- Ots, I., Hůrak, P. Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proc. R. Soc. Lond.*, v.263, p. 1443 – 1447, 1996.
- Pampoule, C., Morand, S., Lambert, A., Rosecchi, E., Bouchereau, L., Crivelli, A. J., Influence of the trematode *Aphalloides coelomica* Dollfus, Chabud and Golvan, 1957 on the fecundity and survival of *Pomatoschitus microps* (Krøyer, 1838) (Teleostei: Gobiidae). *Parasitology*, v. 119, p. 61–67, 1999.
- Paraense, W. L. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. *Medicina Cirúrgica Farmácia*, v. 108, p.1-26, 1945.
- Peres, C.A. Effects of subsistence hunting on vertebrate community structure in Amazonian forests. *Conservation Biology*, v. 14, p. 240-253, 2000.
- Polo, F.J., Peinado, V. I., Viscor, G., Palomeque, J. Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. *Avian disease*, v.42, p.523-535, 1998.
- Post, J., Rebel, J. M. J., Huurne, A. A. H. M. Automated blood cell count: A sensitive and reliable method to study corticosterona-related stress in broilers. *Poultry Science*, v. 82, p. 591-595, 2003.
- Richard, F. A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I. , Smith, T. B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology*, v. 88, p. 19-822, 2002.
- Ricklefs, R. E., Fallon, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. Lond.*, v. 269, p.885–892, 2002.

- Ricklefs, R. E., Sheldon, K. S. Malaria prevalence and white-blood-cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. *Auk*, v.124(4), p. 1254-1266, 2007.
- Ribeiro, S. F., Sebaio, F., Branquinho, F.C.S., Marine, M. Â., Vago, A. R., Braga, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology*, v. 130, p. 261-267, 2005.
- Rocha, S. B. Monte Pascoal National Park: indigenous inhabitants versus conservation units. *In: National Parks without People?: the South American Experience*. IUCN, Gland, Switzerland, p. 147-156, 1995.
- Ross, J.G., Christie, W.G., Halliday, W.G., Morley Jones, R. Haematological and blood chemistry "comparison values" for clinical pathology in poultry. *Veterinary Record*, v. 102, p. 29-31, 1978.
- Roskopf, W. R. Pacheco's disease and aspergillosis in a parrot. *Modern Veterinary Practice*, v. 63, p. 300-301, 1982.
- Roskopf, W. R., Woerpel, R. W. Clinical experience with avian laboratory diagnostics. *Vet Clin No Am*, v. 14, p. 2, 1984.
- Sanguinetti, C. J., Neto, E. D., Simpson, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 17, p. 915-919, 1994.
- Schrader, M. S., Walters, E. L., James, F. C., Greiner, E. C. Seasonal prevalence of a haematozoan parasite of Red-bellied Woodpeckers (*Melanerpes carolinus*) and its association with host condition and overwinter survival. *Auk*, 120:130–137, 2003.
- Schmidt, E.M.S., Paulillo, A.C., Alfaro, D. M., Oliveira, E.G., Ribas, J.M., Santin, E. Parâmetros hematológicos de faisões (*Phasianus colchicus*) em estação reprodutiva. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 8, p. 206, 2006.
- Schmidt, E. M. S., Locatelli - Ditrich, R., Santin, E., Paulillo, A.C. Clinical pathology in poultry – A tool to improve poultry health – a review. *Archives of Veterinary Science*, v 12, n.3. p.9-20, 2007
- Scopel, K. K. G, Fontes, C. J. F., Nunes, A. C, Horta, M. F., Braga, E. M. Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitism in a Brazilian Amazon endemic area. *Malaria Journal*, v.3, n.1, p.8, 2004.
- Sherman, I.W., Hull, R.W. Serum alterations in avian malaria. *Journal of Protozoology*, v. 7, p. 171-176, 1960.
- Sick, H. Notes on Brazilian cracids. *Condor*, v. 72, p. 106-108, 1970.

- Sick, H. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 827, 1985.
- Sick, H. *Birds in Brazil*. Princeton University Press. New Jersey, 1993.
- Silva, J. L., Strahl, S. Human impact on populations of chachalacas, guans and Curassows (Galliformes: Cracidae) in Venezuela. *In: Neotropical Wildlife Use and Conservation* (J.G. Robinson e K.H. Redford, Eds.). Univ. Chicago Press, p. 37-52, 1991.
- Sergent, N., Rogers, T., Cunningham, M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild Little Pinguins, *Eudyptula minor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 138, p. 333-339, 2004.
- Sorci, G. Repeated measurements of blood parasite levels reveal limited ability for host recovery in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *J. Parasitol.*, v. 81, n. 5, p. 825-827, 1995.
- Sturkie, P.D.; Griminger, P. Body fluids: blood. *In: Avian physiology*. (Sturkie, P.D. Ed.). New York: Springer Verlag, p.102-129, 1986.
- Teixeira, D. M., H. Sick. Notes on Brazilian Cracidae: the Red-billed Curassow, *Crax blumenbachii* Spix, 1825, and the Wattled Curassow, *Crax globulosa* Spix, 1825. *Boletim do Museu Nacional*, v. 299, p.1-25, 1981.
- Teixeira, D. M., H. Sick. Plumage variation and plumage aberration in Cracidae. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 46 (4), p. 777-779, 1986.
- Thrall, M. A. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. *In: Veterinary hematology and chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams, p. 401-412, 2004.
- Tschirren, B., Fitze, P. S., Richner, H. Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology*, v. 72, p. 839-845, 2003.
- Valkiūnas, G. Bird Haemosporida. *Acta Zoologica Lituanica*. v.3, p.1-607, 1997.
- Valkiūnas, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.946, 2005.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Krizanauskiene, A., Palinauskas, V., Sehgal, R., Bensch, R. A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, v. 94(6), p. 1395-1401, 2008.
- Van Riper III, C. S., VAN RIPER, G., GAFF, M. L., LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaii land birds. *Ecological Monographs*. v. 56, p. 327-344, 1986.

- Van Riper III, C., Atkinson, C.T., Seed, T. M. Plasmodia of birds. *in: Parasitic Protozoa* (J. P. Kreier, Ed.). Academic Press, San Diego. p. 73-140, 1994.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, v.11, p. 1545-1554, 2002.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö. A new nested PCR method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology*, v. 90, p. 191-194, 2004.
- Wallace, R.B., Painter, R.L.E., Rumiz, D.I., Sainz, L., Taber, A.B. Comparative ecology of cracids in northern Santa Cruz, Bolivia In: *Cracid Ecology and Conservation in the New Millenium* (Brooks, D.M., Gonzalez-Garcia, F. Eds.). *Miscellaneous Publications of the Houston Museum of Natural Science*. p. 68-86, 2001.
- Werner, L. L., Reavill, D. R. The diagnostic utility of serum protein electrophoresis. *Veterinary Clinics Exotic Animal Praticce*, v. 2, p. 651-662, 1999.
- White, E.E. Estancia Guaycolec como un área importante para la conservación de *Crax f. fasciolata* y *Penelope o. obscura* en el Chaco húmedo de Formosa, Argentina. *Boletín del CSG*, 13, p. 14-18, 2001.
- Williams, R. B. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Avian Pathology* v. 34(1), p. 29-47, 2005.
- Zuk, M., Stoehr, A. M. Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, v. 160(4), p.S9-S22, 2002.