

Patrícia Silveira

*Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae) Versiani & Gomes 1941 e Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) Yuasa 1979: modelo de estudo da interação parasito-hospedeiro.

Instituto de ciências Biológicas-UFMG  
Belo Horizonte  
2013

Patrícia Silveira

*Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae) Versiani & Gomes 1941 e Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) Yuasa 1979: modelo de estudo da interação parasito-hospedeiro

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Érika Martins Braga  
Colaborador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva  
Martins

Instituto de ciências Biológicas-UFMG  
Belo Horizonte  
2013

043

Silveira, Patrícia.

*Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: plasmodiidae) Versiani & Gomes 1941 e vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) Yuasa 1979: modelo de estudo da interação parasito-hospedeiro [manuscrito] / Patrícia Silveira. – 2013.

127 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Érika Martins Braga. Colaborador: Nelson Rodrigo da Silva Martins.

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

1. *Plasmodium juxtannucleare* – Teses. 2. Malária aviária – Teses. 3. Co-infecção. 4. Parasitologia - Teses. I. Braga, Érika Martins. II. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas e no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária 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/2009-2013.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA). Protocolo N° 166/2010.

*A meu querido Marcos, por  
todo estímulo, paciência e  
amor!*

*O grande biólogo e meu altamente reputado mestre Jacob Von Uexküll, disse certa vez, um tanto quanto pessimista, que “A verdade de hoje nada mais era do que o erro de amanhã”. Ao que outro grande biólogo, também um de meus mais admirados professores, Otto Koehler, respondeu: “Não, a verdade de hoje é o caso particular de amanhã”! Certamente, a segunda afirmação contém uma verdade muito mais profunda que a primeira.....*

*Konrad Lorenz*

Trecho extraído do livro “A expressão das Emoções no Homem e nos Animais”. Charles Darwin. Ed. Companhia da Letras, São Paulo, 2000.

Agradeço, em especial, a minha orientadora Érika Martins Braga pela conclusão desta tese. Uma orientadora brilhante e exemplar que me deu muitas oportunidades, contribuindo sempre para ampliar a minha visão do trabalho e da vida também. Sempre em busca de experiência e aprendizado foi companheira de “aventuras geladas” e testemunha da realização de sonhos. A tese aqui apresentada foi um grande desafio, mas certamente a vivência e a maturidade adquiridas ao longo destes quatro anos sob a orientação da Érika, se somadas dariam, talvez outras duas ou três teses com conteúdos um pouco diferentes. Muito obrigada pelo apoio e pelo estímulo!

## Agradecimentos

A conclusão desta tese não seria possível sem os conselhos, a paciência e todo o suporte oferecidos pelo Prof. Nelson R. Martins, Escola de Veterinária (UFMG). Sou muito grata pela confiança e pelo apoio em todas as etapas deste estudo. Foram muitos desafios e conquistas também.

À Prof. Tatiane Alvez Paixão, departamento de Patologia (ICB), pela contribuição importante e pelos dias de trabalhos intensos, cansativos, mas prazerosos.

Ao Prof. Ricardo Fujiwara, departamento de Parasitologia, pelas contribuições e por abrir as portas do seu laboratório.

Às pós-doutoras Lílian Lacerda Bueno e Nayara Oliveira Belo, departamento de Parasitologia, pela enorme contribuição e apoio, sem o qual não seria possível ter realizado uma parte do estudo. Além de pesquisadoras, duas amigas maravilhosas que levarei no meu coração para sempre, junto com a Cristiane Morais. Outra amiga e companheira que conheci no Laboratório de Malária. Com vocês três tive oportunidade de viver momentos especiais que o tempo nunca apagará.

À Ana Luísa Silva e ao Francisco Carlos Ferreira Júnior, departamento de Parasitologia, pela amizade, ótimos momentos de descontração e apoio durante os experimentos.

Aos colegas do laboratório de malária, Rafael Motta, Gustavo Lacorte, Patrícia Moreira, Fernanda L. Roos, Gabriel Félix, Zélia Barbosa, Luíza Mourão e Ingrid de Oliveira pelas contribuições.

Aos colegas da Escola de Veterinária, em especial à Sandra Y. Marín Gomes, grande companheira e amiga, ao Rodrigo S. Horta e ao Daniel Vilela pela contribuição e apoio. Aos professores do Laboratório de Doenças das aves, Maurício e José Sérgio pelas discussões relevantes e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Sumara e à Sibebe pelo empenho em resolver tudo da melhor forma e pela paciência.

Aos professores e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, UFMG, pelos ensinamentos ao longo do curso e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte e ao Laboratório Biovet, São Paulo pelo apoio.



Agradeço aos meus pais e a Deus por ter reconhecido todas as oportunidades que me conduziram até aqui.

## SUMARIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 MALÁRIA AVIÁRIA.....	15
1.2 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DE <i>PLASMODIUM</i> SP. EM AVES.....	18
1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	18
1.2.2 CICLO BIOLÓGICO NO VERTEBRADO.....	21
1.2.3 CICLO BIOLÓGICO NO VETOR.....	24
1.3 MALÁRIA AVIÁRIA POR <i>PLASMODIUM JUXTANUCLEARE</i> .....	24
1.4. VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS (“CHICKEN ANEMIA VIRUS” - CAV) .....	29
2. JUSTIFICATIVA .....	31
3. OBJETIVO GERAL .....	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1. IDENTIFICAÇÃO DE <i>PLASMODIUM JUXTANUCLEARE</i> EM GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS .....	33
4.2. PARASITEMIA.....	34
4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. JUXTANUCLEARE</i> : EXTRAÇÃO DE DNA E PCR, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	35
4.4. DIAGNÓSTICO PARA O VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS (CAV): PCR E ELISA .....	38
4.5. MODELO EXPERIMENTAL: COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS E INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>P. JUXTANUCLEARE</i> EM PINTINHOS SPF IMUNOSSUPRIMIDOS POR CAV .....	39
4.6 REALIZAÇÃO DOS EXAMES HEMATOLÓGICOS, DETERMINAÇÃO DO PESO E DA TEMPERATURA CORPORAL.....	43
4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	46
4.8 LEUCOGRAMA.....	47
4.9 FENOTIPAGEM CELULAR.....	47
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO ISOLADO DE <i>PLASMODIUM JXTANUCLEARE</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS .....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA NOS PINTINHOS CO-INFECTADOS E NO GRUPO <i>P. JXTANUCLEARE</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM PINTINHOS IMUNOSSUPRIMIDOS PELO CAV E INFECTADOS POR <i>P. JXTANUCLEARE</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>5.5 CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE ANEMIA:.....</b>	<b>59</b>
<b>5.6 PROTEÍNAS TOTAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>5.7 CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE .....</b>	<b>61</b>
<b>5.8 PARÂMETROS CLÍNICOS: PESO E TEMPERATURA CORPORAL .....</b>	<b>62</b>
<b>5.9 MORTALIDADE, ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.10 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR.....</b>	<b>70</b>
<b>5.11 PARASITEMIA .....</b>	<b>70</b>
<b>5.12 LEUCÓCITOS TOTAIS:.....</b>	<b>72</b>
<b>5.12 AVALIAÇÕES DAS CÉLULAS T: CITOTÓXICA (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), AUXILIADORA (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) E SUBPOPULAÇÕES: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>.....</b>	<b>77</b>
<b>5.13 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS B (BU 1<sup>+</sup>).....</b>	<b>89</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CEPA DE <i>P. JXTANUCLEARE</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>6.2 AVALIAÇÕES PARASITOLÓGICA, HEMATOLÓGICA, BIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA E DA INTERAÇÃO <i>P. JXTANUCLEARE</i>-CAV.....</b>	<b>92</b>
<b>6.2 RESPOSTA CELULAR NA INTERAÇÃO <i>P. JXTANUCLEARE</i>-CAV.....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....</b>	<b>104</b>
<b>9. ANEXO1: ATIVIDADES REALIZADAS A PARTIR DO INGRESSO NO DOUTORADO: .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação taxonômica dos subgêneros de <i>Plasmodium</i> , que infectam aves, definidos de acordo com os critérios morfológicos (Adaptado de Valkiūnas 2005).....	20
<b>Tabela 2.</b> Especificidade de anticorpos monoclonais conjugados utilizados neste estudo para a marcação celular.....	48
<b>Tabela 3.</b> Parasitemia (média±desvio padrão; valor máximo e mínimo) obtida em pintinhos SPF, no grupo infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e co-infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e Vírus da anemia infecciosa (CAV) ao longo das coletas, de acordo com os dias pós-inoculação. ....	54
<b>Tabela 4.</b> Valores médios da concentração de proteína plasmática (g/dL) (média±desvio padrão) obtidos em pintinhos SPF, nos grupos: co-infectado, infectado exclusivamente por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> ou pelo Vírus da anemia infecciosa (CAV) e controle.....	60
<b>Tabela 5.</b> Concentração de glicose mg/dL (média±desvio padrão) obtida em pintinhos SPF, nos grupos: infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> , co-infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e pelo Vírus da anemia infecciosa, infectado pelo Vírus da anemia infecciosa (CAV) e controle.....	61
<b>Tabela 6.</b> Alterações macroscópicas observadas em diferentes órgãos durante a necropsia de aves pertencentes aos grupos: exclusivamente infectado por <i>P. juxtannucleare</i> ou por CAV e co-infectado, observadas em comparação ao exame do grupo controle.....	67

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema adaptado de Valkiūnas 2005 representando o ciclo biológico de *Plasmodium* sp. em aves. I, II- Merogonia exoeritrocítica primária; III- merogonia eritrocítica; IV- merogonia exoeritrocítica secundária; 1- esporozoíto na célula reticuloendotelial; 2,3- criptozoítos; 4- merozoítos no macrófago; 5, 6- metacriptozoítos; 7- merozoítos no eritrócitos; 8- gametócitos; 9- merozoítos nos eritrócitos; 10, 11- merontes eritrocíticos; 12- merozoítos nas células endoteliais dos capilares; 13, 14- fanerozoítos; 15- merozoítos nos eritrócitos; 16- gametócitos; 17- macrogametócito; 18- exflagelação de microgametas; 19- fertilização de macrogametas; 20- oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21- oocisto jovem; 22, 23- esporogonia; 24- esporozoíto na glândula salivar do vetor..... 23

**Figura 2.** Fluxograma demonstrando o esquema utilizado para infecção experimental por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF imunossuprimidos por Vírus da Anemia infecciosa das galinhas (CAV). A coleta de sangue foi realizada de acordo com os dias após a inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos (N=6): Controle (pintinhos não infectados), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV), *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado pelo *P. juxtannucleare*) and Co-infectado (infecção mista). ..... 42

**Figura 3.** Fluxograma demonstrando a separação dos grupos em salas laboratoriais diferentes, assim como o número de indivíduos que compõem cada grupo e a frequência de realização dos exames nos quatro grupos experimentais..... 43

**Figura 4.** Esquema demonstrando o material coletado e os exames realizados nos pintinhos SPF da linhagem Leghorn branca, após a inoculação pelo vírus atenuado da anemia infecciosa (CAV) e por *Plasmodium juxtannucleare*. ..... 45

**Figura 5.** Cladograma representando as relações filogenéticas entre as espécies de *Plasmodium* utilizando sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo b por meio de inferência Bayesiana. A linhagem de *P. juxtannucleare* sequenciada neste estudo está destacada com uma seta. Números de acesso do GenBank estão entre parêntesis. Os valores próximos aos nós correspondem aos valores percentuais de probabilidade posterior. .... 51

**Figura 6.** Valor médio de parasitemia (N=6) por *Plasmodium juxtannucleare* presente em esfregaços sanguíneos de pintinhos SPF dos grupos *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*) e co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa-CAV), avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi). \* diferenças significativas (p<0,05). ..... 53

**Figura 7.** Valores médios da concentração de hemoglobina g/dL (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa-CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). ..... 56

**Figura 8.** Valores médios de hematócrito (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). ..... 57

**Figura 9.** Valores médios da contagem de eritrócitos (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). ..... 58

**Figura 10.** Valores médios do peso corporal/g de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). ..... 62

**Figura 11.** Valores médios de temperatura corporal °C de pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). ..... 63

**Figura 12.** Mortalidade observada nos pintinhos dos grupos *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas (p<0,05). \* indica diferença significativa entre Co-infectado e os outros grupos de acordo com o Log-Rank test (N=20). ..... 64

**Figura 13.** Lesões macroscópicas em pintinhos infectados observadas comparativamente ao grupo controle durante a necropsia de indivíduos dos grupos: *P. juxtenucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtenucleare*), co-infectado (*P. juxtenucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtenucleare* (dpi) ao longo de 30 dias. As cabeças das setas indicam o grupo controle e as setas os grupos infectados. A. aumento de fígado em pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtenucleare*; B. pigmentos pretos no baço de pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtenucleare*; C: aumento do baço de pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtenucleare*; D: aumento do coração e presença de hidropericárdio em pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtenucleare*; E: diminuição grave da bursa de Fabricius em pintinho infectado exclusivamente pelo CAV; F: diminuição grave do timo em pintinho infectado exclusivamente pelo CAV; G: sufusões e petéquias no coração de pintinho co-

infectado; H: palidez acentuada no encéfalo de pintinho co-infectado; I: hemorragia muscular em pintinho co-infectado. .... 66

**Figura 14.** Alterações de celularidade no baço observadas em indivíduos co-infectados. A. Baço normal, grupo controle; B. aumento de celularidade da polpa vermelha com a deposição de pigmento amarronzado no grupo infectado por *P. juxtannucleare*. C. diminuição da celularidade da polpa branca com acentuada depleção linfóide no grupo infectado somente pelo CAV; D. leve aumento de celularidade da polpa vermelha e moderada depleção linfóide no grupo co-infectado; HE, 200x..... 68

**Figura 15.** Alterações histopatológicas em diferentes tecidos observadas em pintinhos co-infectados. A. atrofia da bursa de Fabricius; redução moderada de folículos com depleção de linfócitos (asteriscos); HE, 400x. B. Hepatite multifocal moderada; infiltrado mononuclear (seta branca) portal moderado associado com áreas de necrose (seta preta). HE, 400x. C. pericardite multifocal linfoplasmocítica moderada (seta estreita). HE, 200x..... 69

**Figura 16.** Valor médio de parasitemia (N=6) por *Plasmodium juxtannucleare* presente em esfregaços sanguíneos de pintinhos SPF infectados dos grupos: *P. juxtannucleare* (aves exclusivamente infectadas por *P. juxtannucleare*) co-infectado (aves co-infectadas por *P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa das galinhas-CAV). As aves foram avaliadas de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi). A infecção experimental por CAV foi realizada sete dias antes da infecção por *P. juxtannucleare*;\* diferenças significativas (p<0,05). .... 70

**Figura 17.** Mortalidade observada nos pintinhos dos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV) e CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias. \* indica diferença significativa (p<0,05) entre co-infectado e os demais grupos de acordo com o Log-Rank test (N=12). .... 71

**Figura 19.** Número absoluto de linfócitos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infectado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare* e CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente com *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção com o CAV. \*<sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 74

**Figura 20.** Número absoluto de heterófilos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos:..... 75

**Figura 21.** Número absoluto de eosinófilos e de monócitos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infectado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare*-CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente com *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção por CAV. .... 76

**Figura 22.** Imunofenotipagem de células T obtida a partir do sangue periférico de pintinhos SPF controle (não infectados) e inoculados (Grupos: *P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado). A- amostra representativa da distribuição das células por tamanho vs granulidade (FSC X SSC); B- Estratégia da janela de leitura para localização dos linfócitos definidos pela granulidade vs a marcação por CD3 (SSC x CD3); C- amostra representativa da análise de um dos marcadores (CD4) dentro da janela de leitura CD3. .... 78

**Figura 23.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 79

**Figura 24.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare* e por CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 81

**Figura 25.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 83

**Figura 26.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 84

**Figura 27.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). .... 86

**Figura 28.** Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas



(CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV: infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculado por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). ..... 88

**Figura 29:** Número de células B. Histograma representativo demonstrando o número de células Bu 1<sup>+</sup> dentro da janela de leitura de linfócitos. O primeiro pico do histograma indica as células negativas para a marcação, enquanto o segundo pico, delimitado pela barra, indica as células marcadas positivamente. .... 89

**Figura 30.** Número absoluto de linfócitos Bu 1<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV: infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculado por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05). ..... 91

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina

CAV: vírus da anemia infecciosa das galinhas

CD: “*Cluster of differentiation*”/grupamento de diferenciação

Cit *b*: Citocromo *b*

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

DPI: dias após a inoculação

EDTA: Ácido Etilenodiaminatetracético

ELISA: “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” teste imunoenzimático

FITC: Conjugado Isotianato de fluoresceína

GIEMSA: Eosina-azul de metileno

HE: Hematoxilina/eosina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IL: Interleucina

IBDV: Vírus da doença infecciosa da bursa

MDV: Vírus da doença de Marek

MHCI: Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHCII: Complexo principal de histocompatibilidade classe II

PBS: Salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PE: Conjugado Ficoeritrina

REV: Vírus da Reticuloendoteliose

SPRD: Conjugado “*Spectral Red*”

## RESUMO

*Plasmodium juxtancleare*, uma de duas espécies causadoras de malária em galinhas, pode ser encontrada em diferentes países do mundo, incluindo o Brasil. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a infecção por *P. juxtancleare* em pintinhos livres de patógenos (SPF) e previamente imunossuprimidos pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV). Para o estabelecimento deste modelo foram abordadas duas estratégias experimentais: (i) avaliação de alterações hematológicas, biológicas e patológicas, (ii) avaliação da resposta celular das aves infectadas. Para isso, definiram-se quatro grupos experimentais: Grupo *P. juxtancleare*: aves infectadas exclusivamente por *P. juxtancleare*, Grupo CAV: aves infectadas exclusivamente por CAV, Grupo co-infectado: aves co-infectadas por *P. juxtancleare* e por CAV e Grupo controle: aves não infectadas. A parasitemia por *P. juxtancleare* apresentou-se baixa em ambos os grupos infectados por *P. juxtancleare* (grupos *P. juxtancleare* e co-infectado); entretanto, valores significativamente maiores foram detectados nas aves co-infectadas. Anemia foi observada nos três grupos infectados. No entanto, aves co-infectadas apresentaram anemia mais severa, observada pela redução significativa do hematócrito quando comparadas aos outros grupos infectados. A mortalidade foi maior e detectada precocemente no grupo co-infectado, entretanto as lesões patológicas foram moderadas quando comparadas às lesões acentuadas observadas nas aves dos grupos *P. juxtancleare* e CAV. Esses resultados indicam que os microrganismos apresentam efeito patogênico potencializado durante ambas às infecções. O número total de leucócitos e de linfócitos apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos CAV e co-infectado. O grupo *P. juxtancleare* apresentou aumento de leucócitos e de linfócitos e diminuição de heterófilos. Além disto, demonstrou-se o aumento de células T auxiliares e citotóxicas co-estimuladas e ativadas neste grupo. Já as aves dos grupos CAV e co-infectado apresentaram diminuição significativa de células citotóxicas co-estimuladas e ativadas e auxiliares co-estimuladas. As aves do grupo CAV, diferentemente do observado no grupo co-infectado, apresentaram redução de células T auxiliares e auxiliares ativadas, além de alterações no número células B. Esses dados apontam para um efeito imunomodulatório dependente de células T e B na co-infecção *P. juxtancleare*-CAV diferente quando comparadas as infecções exclusivas por CAV ou *P. juxtancleare*.

## ABSTRACT

*Plasmodium juxtanucleare*, one of the two species that cause malaria in chickens, can be found in different countries around the world including Brazil. The aim of this study was to evaluate the effect of infection caused by *P. juxtanucleare* in specific pathogen free (SPF) chicks previously immunosuppressed with chicken anemia virus (CAV). To establish this model two distinct experimental strategies were addressed: (i) assessment of hematological, pathological and biological parameters; (ii) immunological evaluation of cellular response of infected birds. For this, we defined four groups: *P. juxtanucleare* Group: chicks exclusively infected by *P. juxtanucleare*; CAV Group: chicks exclusively infected with CAV; co-infected Group: co-infected chicks with *P. juxtanucleare* and CAV; control Group: uninfected chicks. The parasitemia caused by *P. juxtanucleare* was low for all infected avian (*P. juxtanucleare* and co-infected groups), although significantly higher values were detected in co-infected chicks. Anemia was observed in all infected groups. However, co-infected chicks showed lowest values of hematocrit. Mortality was more pronounced in co-infected group, however the pathologic lesions were mild when compared to serious injury observed in *P. juxtanucleare* and CAV groups. The results indicate that pathogenic effects can be boosted during the infection caused for these two microorganisms. Significant reduction in the number of leukocytes and lymphocytes ( $p < 0.05$ ) was observed in CAV and co-infected groups. *P. juxtanucleare* group showed an increase in total leukocytes and lymphocytes and a decrease in heterophils. Furthermore, it was demonstrated increased in co-stimulated and activated T cells in this group. The chicks of CAV and co-infected groups showed a significant decrease of co-stimulated T cell cytotoxic and decrease of T helper cell co-activated and co-stimulated. The CAV group, differently from of co-infected group showed reduction of T helper cells and reduction of activated T helper cell; and differences in B cell number. These data indicate an immunomodulatory effect dependent on T and B cells in co-infection *P. juxtanucleare*-CAV and this effect is different of exclusive CAV or *P. juxtanucleare* infections.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os parasitos do gênero *Plasmodium* (Haemosporida: Plasmodiidae) formam um grupo cosmopolita de protistas heteroxenos que parasitam répteis, aves e mamíferos, e que são transmitidos aos seus hospedeiros por dípteros hematófagos pertencentes exclusivamente à família Culicidae (Valkiūnas 2005, Njabo et al. 2011). Os vetores dos plasmódios aviários pertencem aos gêneros: *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* e *Anopheles* (Garnham 1966). Recentemente mosquitos do gênero *Coquillettidia* também foram identificados como vetores de algumas espécies de *Plasmodium* spp. (Njabo et al. 2009).

Os taxonomistas tradicionalmente classificam os parasitos de aves do gênero *Plasmodium* utilizando os critérios morfológicos e as características biológicas relacionadas ao ciclo de vida e à especificidade de hospedeiros (Garnham 1966; Laird 1998, Valkiūnas 2005, Braga et al. 2011). Os estudos mais recentes, além da utilização de bases morfológicas para a identificação das diferentes espécies de *Plasmodium*, empregam também as técnicas moleculares, tais como a Reação em Cadeia da polimerase - PCR e o sequenciamento do DNA. A associação das técnicas morfológicas e moleculares como ferramenta de identificação dos parasitos da malária aviária proporcionou o desenvolvimento de novas perspectivas sobre o entendimento da diversidade e da história evolutiva do gênero *Plasmodium* (Bensch et al. 2000, Bensch & Åkesson 2003, Ricklefs & Fallon 2002, Richard et al. 2002, Martinsen et al. 2006, Sehgal et al. 2011, Belo et al. 2011, Belo et al. 2012).

A malária aviária causada por diferentes espécies de *Plasmodium* pode apresentar características distintas relacionadas à patogenicidade dos hospedeiros, e atualmente o conhecimento sobre a distribuição das espécies de plasmódios aviários no mundo e a especificidade de hospedeiros ainda é escasso (Braga et al. 2011). A infecção experimental de aves por plasmódios, constitui uma ferramenta fundamental para abordar as características do parasito, sobretudo associadas à especificidade de hospedeiros e à patogenicidade da infecção, bem como para analisar a co-infecção de aves por diferentes espécies de *Plasmodium* ou entre *Plasmodium* spp. e outros patógenos (Huff 1930, Bennett et al. 1966, Krettli 1972A, Galbadón & Ulloa 1977, Atkinson et al. 2000, Iezhova et al. 2005, Frevert et al. 2008, Marzal et al. 2008, Palinauskas et al. 2008, Palinauskas et al. 2011).

## 1.1 Malária aviária

As pesquisas sobre o gênero *Plasmodium* desenvolvidas em modelos aviários contribuíram significativamente para o conhecimento das características principais da malária em vertebrados, sobretudo associadas à malária em humanos (Lucena 1939, Garnham 1966). No final do século XIX, Celli e Sanfelice (1891) ampliaram o conhecimento sobre a malária utilizando o modelo aviário. Estes pesquisadores utilizaram, pela primeira vez, o método de subinoculação de sangue em infecções experimentais. Esta técnica de infecção experimental permitiu abordar diferentes aspectos da malária, tais como a transmissão e as características da fase aguda da infecção (Lucena 1939, Garnham 1966, Valkiūnas 2005). Em 1902, pouco tempo após as inovações de Celli e Sanfelice, Ronald Ross, obteve o reconhecimento da comunidade científica por suas pesquisas sobre a transmissão da malária. Ross foi premiado com o Nobel de Medicina ao descrever em detalhes que a transmissão da malária ocorria através de picadas de mosquitos infectados pelo parasito (Garnham 1966).

O interesse na malária aviária como modelo de estudo da malária humana foi diminuindo à medida que novas espécies de *Plasmodium* foram descritas em outros vertebrados, tais como roedores e símios. A infecção por *Plasmodium* spp. em mamíferos proporcionou modelos de estudo mais relacionados à malária humana em contrapartida ao modelo aviário. O desenvolvimento de técnicas que permitiram o cultivo “*in vitro*” de *P. falciparum*, considerado a espécie mais patogênica aos humanos, incrementou ainda mais o conhecimento sobre a malária humana, diminuindo ainda mais a utilização da malária em modelo aviário (Coggeshall & Eaton 1938, Garnham 1966, Van Dyke et al. 1970, Coatney et al. 1971, Wedderburn et al. 1978, Sinden & Smalley 1979, Kaushal et al. 1980, Krettli 1994, Waknine-Grinberg et al. 2010). Embora, o enfoque científico na malária aviária como modelo de estudo da malária humana tenha diminuído, o vasto conhecimento proporcionado pelas pesquisas pioneiras, tornou os plasmódios aviários parasitos muito interessantes para diferentes estudos sobre a relação parasito-hospedeiro.

Atualmente, a avaliação e o monitoramento do impacto da malária em aves presentes em diferentes ambientes tem despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo (Valkiūnas 2005, Chasar et al. 2009, Braga et al. 2011,

Sehgal et al. 2011, Belo et al. 2012). O possível envolvimento dos parasitos da malária na conservação e manejo de aves tem enriquecido o conhecimento acerca de diferentes áreas, tais como a ecologia, a evolução, a epidemiologia e a parasitologia (van Riper III et al. 1994, Ribeiro et al. 2005, Møller & Nielsen 2007, Marzal et al. 2008, Bensch et al. 2009, Bonneaud et al. 2009, Levin et al. 2009, Loiseau et al. 2010, Ricklefs & Outlaw 2010, Belo et al. 2011, Fecchio et al. 2011, Sehgal et al. 2011, Belo et al. 2012).

A metodologia empregada nos estudos que avaliam aves naturalmente infectadas é relativamente simples e pouco prejudicial aos hospedeiros. Consiste na utilização de redes de neblina para captura de aves silvestres, ou de coleta manual no caso de aves domésticas e permite obter informações sobre a prevalência e a parasitemia de *Plasmodium* spp. no momento da captura. O diagnóstico de *Plasmodium* spp. em aves pode ser realizado por meio da análise morfológica dos esfregaços sanguíneos observados em microscopia de luz, associado ao exame molecular, realizado pela técnica da PCR e seguido da reação de sequenciamento (Perkins & Schall 2002, Ribeiro et al. 2005, Križanauskienė et al. 2006, 2010, Hellgren et al. 2007, Palinauskas et al. 2007, Valkiūnas et al. 2008A, Belo et al. 2011).

Atualmente, o efeito das alterações ambientais e do aquecimento global em populações de aves tem sido muito discutido. Neste contexto, avaliar o impacto da malária em aves naturalmente infectadas por diferentes espécies de plasmódios é de extrema importância, uma vez que os parasitos da malária aviária sabidamente podem conduzir as populações de aves a perda de diversidade ou a extinção de espécies (Atkinson et al. 2000, Beadell et al. 2006, Bonneaud et al. 2009, Sehgal 2010, Sehgal et al. 2011, Belo et al. 2011). Os estudos que abordam a malária aviária, realizados em condições naturais, apresentam limitações associadas ao real impacto da infecção ao hospedeiro, pois, geralmente as aves naturalmente infectadas por *Plasmodium* spp. encontram-se na fase crônica da infecção (Valkiūnas 2005). O período da fase crônica da infecção é caracterizado pela presença de poucos parasitos intraeritrocíticos e pela baixa patogenicidade. Esta circunstância permite avaliar a prevalência de indivíduos infectados, no entanto não favorece a identificação morfológica da espécie de *Plasmodium* e nem a avaliação da patogenicidade. Por esta razão, diferentes estudos relataram que os parasitos da malária aviária são pouco

patogênicos, e que em geral não levam as aves à morte (Garnham 1966, Bishop & Bennet 1992, Valkiūnas 2005).

A malária aviária frequentemente apresenta maior potencial patogênico na fase aguda da infecção, período que pode ser caracterizado pela elevação da parasitemia e pela visualização de todas as formas intraeritrocíticas nos esfregaços sanguíneos (Valkiūnas 2005). A fase aguda é considerada mais favorável para acompanhar as características relacionadas ao ciclo de vida do parasito nos hospedeiros, assim como para avaliar a patogenicidade, a resposta inflamatória e a transmissão.

Os plasmódios aviários são considerados bons modelos para avaliar a relação parasito-hospedeiro, pois permitem comparar as características da infecção aguda e crônica causada pelas diferentes espécies do parasito. Entretanto, em função das inúmeras dificuldades, principalmente relacionadas à obtenção de aves doadoras e de aves receptoras suscetíveis, assim como a manutenção destas, estes estudos ainda são escassos e realizados principalmente com plasmódios que infectam aves domésticas, tais como, *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium durae*, *Plasmodium lophurae*, *Plasmodium hermani* e menos frequentemente com *Plasmodium juxtannucleare* (Al-Dabagh 1961, Bennett et al. 1966, Garnham 1966, Krettli 1972, Huchzermeyer 1993, Permim & Juhl 2002, Paulman & McAllister 2005, Williams 2005, Silveira et al. 2009a, Vashist et al. 2008, 2011, Macchi et al. 2011).

*P. juxtannucleare*, encontrado em galinhas naturalmente infectadas, tem sido uma espécie negligenciada em estudos experimentais, em função do tamanho diminuto das formas sanguíneas, desenvolvimento de baixa parasitemia periférica e devido à patogenicidade irregular observada nos hospedeiros. Contudo, as informações sobre *P. juxtannucleare* são imprescindíveis, considerando-se que a prevalência de galinhas naturalmente infectadas por este parasito pode alcançar 100% em determinadas regiões no Brasil (Santos-Prezoto et al. 2004).

A variação observada na patogenicidade desencadeada pelas diferentes espécies de *Plasmodium* pode ocorrer de acordo com a espécie de parasito, com a maior ou menor virulência entre as cepas ou em função da suscetibilidade dos hospedeiros (Valkiūnas 2005). Um aspecto ainda pouco explorado nos estudos refere-se à patogenicidade influenciada pela co-infecção do hospedeiro com espécies distintas de *Plasmodium* ou entre *Plasmodium* sp. e outros patógenos



comuns de aves, tais como os vírus (Marzal et al. 2008, Palinauskas et al. 2011, Asghar et al. 2012, Neto JM et al. 2012, Zehtindjiev et al. 2012). Recentemente, um estudo abordou a caracterização morfológica de uma nova espécie de *Plasmodium* que infecta aves, *Plasmodium polymorphum* (Zehtindjiev et al. 2012). Esta nova espécie foi observada co-infectando uma ave passeriforme juntamente com *P. relictum*. As reações de PCR e de sequenciamento do DNA falharam inicialmente ao diagnosticar *P. polymorphum*, pois identificaram apenas *P. relictum*, embora a parasitemia por *P. polymorphum* estivesse mais elevada (Zehtindjiev et al. 2012). Assim cabe ressaltar a importância do diagnóstico morfológico das lâminas, da necessidade do treinamento de pessoas capacitadas para a análise dos esfregaços sanguíneos e de estudos que abordem os diferentes aspectos da co-infecção na malária.

## **1.2 Morfologia e ciclo biológico de *Plasmodium* sp. em aves**

### **1.2.1 Características Gerais**

A descrição completa e as diferenças observadas no ciclo de vida entre as espécies de *Plasmodium* que infectam aves ainda estão fragmentadas em função das inúmeras dificuldades em se estudar e classificar os hemoparasitos em aves (Valkiūnas, 2005). Uma destas dificuldades diz respeito à baixa especificidade de *Plasmodium* em relação aos seus hospedeiros. A mesma espécie de *Plasmodium* pode infectar aves de diferentes famílias (Iezhova et al. 2005, Valkiūnas et al. 2006, Zehtindjiev et al. 2008, Palinauskas et al. 2011). Neste caso, a falta de especificidade e as diferenças de susceptibilidade apresentada pelos hospedeiros podem levar o parasito a desenvolver adaptações morfofisiológicas ao seu hospedeiro ou a modificações relacionadas à intensidade de parasitemia. Nos casos de alta parasitemia, já foi observado que os parasitos podem alterar sua preferência por infectar hemácias maduras ou imaturas, favorecer o poliparasitismo, provocar intensas modificações morfológicas na célula infectada e, além disso, causar maior patogenicidade ao seu hospedeiro (Garnham 1966, Laird 1998, Valkiūnas 2005).

Atualmente, os parasitos de aves do gênero *Plasmodium*, encontram-se distribuídos em cinco subgêneros: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia*, conforme descrição na tabela 1 (Valkiūnas 2005). As características utilizadas para agrupar as espécies em subgêneros são baseadas na morfologia dos parasitos durante a fase eritrocítica do ciclo. O subgênero *Haemamoeba* é o mais estudado e as informações gerais sobre o ciclo biológico do gênero em aves são baseadas em espécies deste subgênero, tais como *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium relictum* e *Plasmodium cathemerium* (Garnham 1966, Valkiūnas 2005). O ciclo de vida do gênero *Plasmodium* é heteroxeno, com a presença de estádios morfológicos distintos no vetor e no hospedeiro vertebrado. A fase sexuada do ciclo biológico ocorre no vetor e todas as formas observadas nas aves são assexuadas e constituem adaptações morfofisiológicas ao hospedeiro intermediário. No hospedeiro vertebrado ocorrem duas fases do ciclo de desenvolvimento; fase exoeritrocítica, caracterizada pela presença de formas do parasito em células reticuloendoteliais, e fase eritrocítica, quando as formas do parasito são observadas dentro dos eritrócitos.

**Tabela 1. Classificação taxonômica dos subgêneros de *Plasmodium*, que infectam aves, definidos de acordo com os critérios morfológicos (Adaptado de Valkiūnas 2005).**

Subgênero	Merontes	Gametócitos	Espécies
<i>Haemamoeba</i> (Grassi & Feletti, 1890)	Grande e arredondado, desloca o núcleo da célula do hospedeiro.	Arredondado, oval ou forma irregular, o tamanho marcadamente excede o tamanho do núcleo do eritrócito infectado.	<i>P. relictum</i> , <i>P. cathemerium</i> , <i>P. matutinum</i> , <i>P. gallinaceum</i> <i>P. giovannolai</i> , <i>P. lutzi</i> , <i>P. subpraecox</i> , <i>P. griffithsi</i> , <i>P. tejerai</i> , <i>P. coturnixi</i>
<i>Huffia</i> (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Tamanho e forma variável, com dez ou menos merozoítos	Alongados	<i>P. elongatum</i> <i>P. hermani</i> <i>P. huffi</i>
<i>Giovannolaia</i> (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Tamanho moderado a grande. Geralmente encontrado em eritrócitos imaturos.	Alongados	<i>P. lophurae</i> , <i>P. circumflexum</i> , <i>P. polare</i> <i>P. gundersi</i> , <i>P. octamerium</i> , <i>P. pinottii</i> , <i>P. pedioecetae</i> , <i>P. formosanum</i> , <i>P. durae</i> , <i>P. hegneri</i> , <i>P. anasum</i> , <i>P. leanucleus</i> , <i>P. fallax</i> <i>P. garnhami</i>
<i>Novyella</i> (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Pequeno com pouco citoplasma, com o máximo de oito merozoítos	Alongados	<i>P. vaughni</i> , <i>P. rouxi</i> , <i>P. hexamerium</i> , <i>P. nucleophilum</i> <i>P. dissanaikiei</i> , <i>P. bertii</i> , <i>P. columbae</i> , <i>P. paranucleophilum</i> , <i>P. kempii</i> ,
<i>Bennettinia</i> (Valkiūnas, 1997)	Pequeno, arredondado com pouco citoplasma, dois a seis	Variável, geralmente arredondado ou alongado	<i>P. juxtannucleare</i>

## 1.2.2 Ciclo biológico no vertebrado

A infecção das aves tem início após a inoculação de esporozoítos de *Plasmodium* durante o repasto sanguíneo dos vetores. Os esporozoítos, inicialmente, podem penetrar nas células reticuloendoteliais, nos macrófagos e nos linfócitos, iniciando a fase exoeritrocítica do ciclo. Após a invasão destas células, os esporozoítos se desenvolvem em merontes teciduais; estes passam pela primeira divisão assexuada, denominada merogonia exoeritrocítica primária, originando vários indivíduos uninucleados chamados de merozoítos teciduais (Valkiūnas 2005) (Figura 1).

A merogonia exoeritrocítica primária consiste na formação de duas gerações de merozoítos distintos em número e na capacidade de invasão celular: a primeira geração é denominada de criptozoítos e a segunda de metacriptozoítos. Na primeira reprodução assexuada são formados aproximadamente 100 criptozoítos, que se desenvolvem predominantemente nas células reticulares de diferentes tecidos e órgãos, inclusive na pele, entretanto, são mais frequentemente encontrados no tecido esplênico. Os criptozoítos recém-liberados penetram novamente nas células reticulares e passam pela segunda merogonia exoeritrocítica, originando os metacriptozoítos. Estes se assemelham morfológicamente aos criptozoítos, porém são mais numerosos e capazes de infectar as células da linhagem eritrocítica. Uma parte dos metacriptozoítos recém-liberados penetra novamente nas células reticulares, e a outra parte penetra nas células da linhagem eritrocítica. Dentro das células reticulares os metacriptozoítos se desenvolvem e por merogonia se dividem novamente, originando milhares de fanerozoítos. Os fanerozoítos penetram preferencialmente os eritrócitos da circulação sanguínea. Uma pequena parte dos fanerozoítos, recém-liberados, também pode penetrar nas células reticulares e dar origem a longas gerações de fanerozoítos (Valkiūnas 2005).

No interior de eritrócitos jovens ou maduros (de acordo com a espécie de *Plasmodium*) as formas do parasito recebem o nome de merozoítos, se desenvolvem e tornam-se arredondadas ou ameboides, recebendo o nome de trofozoítos. A morfologia e o tamanho dos trofozoítos podem variar de acordo com a espécie ou subgênero de *Plasmodium*. Contudo, o vacúolo, o núcleo e o pigmento malárico (pigmento insolúvel formado pelo processo de digestão da hemoglobina) são

características morfológicas importantes e frequentemente podem ser observadas ao exame microscópico (Yamada & Sherman 1979). Os trofozoítos passam por processo de crescimento e de maturação diferenciando-se em merontes. Os merontes são formas assexuadas que após o processo de divisão (merogonia eritrocítica) liberam vários merozoítos. O número de merozoítos presentes no interior das hemácias pode ser observado ao exame dos esfregaços sanguíneos e é utilizado como uma das características taxonômicas mais importantes, sem a qual se torna impossível à identificação morfológica e a diferenciação entre as espécies. A hemozoína presente nos merontes eritrocíticos maduros também é utilizada na classificação, pois os pigmentos tendem a se agrupar resultando na visualização de aglomerados dourados, amarronzados ou pretos e de pequenos tamanho (Noland et al. 2003, Valkiūnas et al. 2005).

Após a ruptura das hemácias, uma parte dos merozoítos liberados na corrente sanguínea, pode penetrar em novas hemácias e dar origem aos gametócitos; a outra parte dos merozoítos pode penetrar nas células endoteliais dos capilares de diferentes órgãos e iniciar novas merogonias exoeritrocíticas secundárias.

A fase exoeritrocítica no ciclo precede a fase eritrocítica somente no primeiro contato de uma determinada espécie de *Plasmodium* com o seu hospedeiro. Pois, em função da malária aviária apresentar caráter crônico de infecção, a fase exoeritrocítica é acompanhada de múltiplas merogonias secundárias, e estas podem ocorrer simultaneamente com a fase eritrocítica.

Os gametócitos das diferentes espécies de *Plasmodium* apresentam morfologia variada, geralmente arredondada, alongada ou oval que em conjunto com as alterações na morfologia das células infectadas são consideradas como importantes características taxonômicas no agrupamento das espécies em subgêneros. A periodicidade e a sincronicidade dos parasitos também são características interessantes e utilizadas na classificação de *Plasmodium* spp.

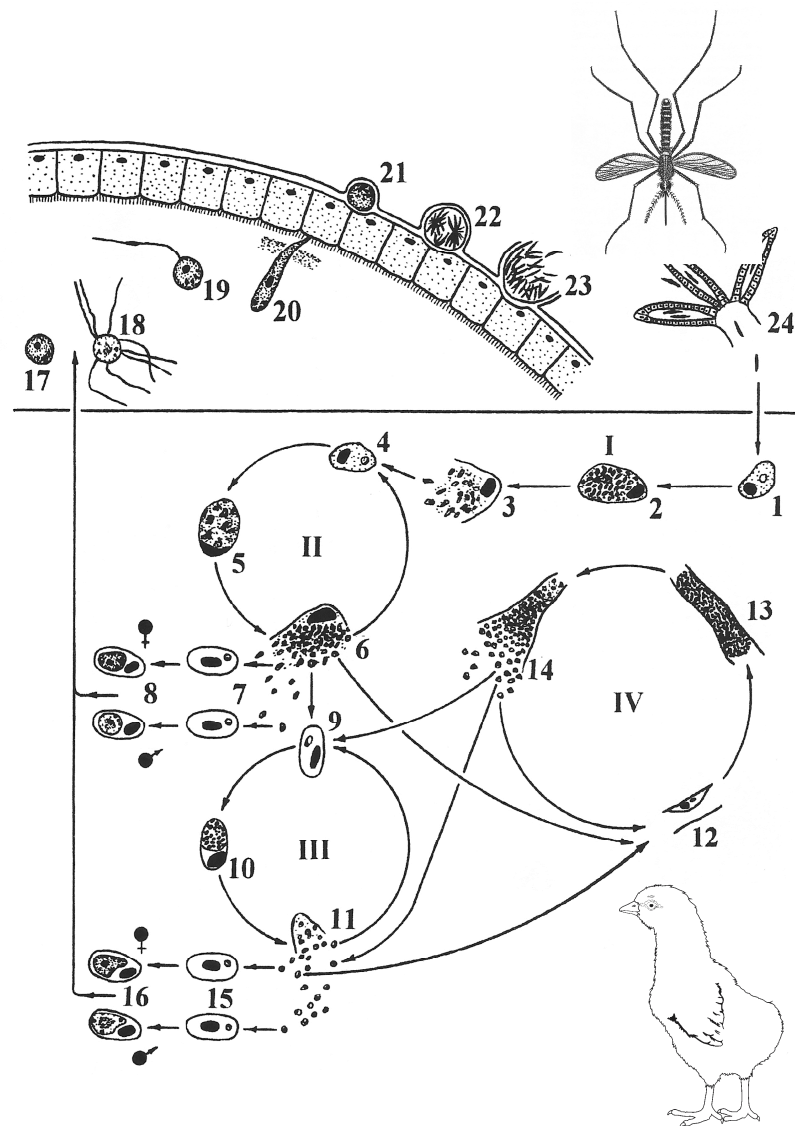


Figura 1. Esquema adaptado de Valkiūnas 2005 representando o ciclo biológico de *Plasmodium* sp. em aves. I, II- Merogonia exoeritrocítica primária; III- merogonia eritrocítica; IV- merogonia exoeritrocítica secundária; 1- esporozoíto na célula reticuloendotelial; 2,3- criptozoítos; 4- merozoítos no macrófago; 5, 6- metacriptozoítos; 7- merozoítos no eritrócitos; 8- gametócitos; 9- merozoítos nos eritrócitos; 10, 11- merontes eritrocíticos; 12- merozoítos nas células endoteliais dos capilares; 13, 14- fanerozoítos; 15- merozoítos nos eritrócitos; 16- gametócitos; 17- macrogametócito; 18- exflagelação de microgametas; 19- fertilização de macrogametas; 20- oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21- oocisto jovem; 22, 23- esporogonia; 24- esporozoíto na glândula salivar do vetor.

### 1.2.3 Ciclo biológico no vetor

A infecção nos vetores tem início durante o repasto sanguíneo em aves infectadas. No intestino do vetor os trofozoítos, os merontes e os gametócitos jovens se degeneram. Os gametócitos maduros, por meio de movimentos de contração e expansão rompem a membrana da hemácia e escapam, liberando em seguida os gametas (Garnham 1966). O macrogametócito libera o gameta feminino ou macrogameta, enquanto o microgametócito, por exflagelação, libera o gameta masculino, ou microgameta, que apresenta flagelos para locomoção. Após a fertilização ocorre a formação de um zigoto móvel e alongado, denominado oocineto (Valkiūnas 2005).

O oocineto move-se em direção as células epiteliais do intestino médio, alcança a lâmina basal, torna-se arredondado e adquire a forma arredondada, denominada de oocisto (Ghosh & Jacobs-Lorena 2009). Dentro do oocisto são formados centros germinativos que por esporogonia formam vários esporozoítos. Após o processo de maturação o oocisto se rompe liberando os esporozoítos. O número de esporozoítos formados pode variar de acordo com a espécie de *Plasmodium* ou com a espécie de vetor (Valkiūnas 2005). Os esporozoítos são ágeis, pequenos e fusiformes e ao caírem na hemolinfa circulante migram em direção a glândula salivar e os ductos, invadindo-os e permanecendo por algumas semanas até a inoculação de novos hospedeiros susceptíveis (Valkiūnas 2005, Ghosh & Jacobs-Lorena 2009).

### 1.3 Malária aviária por *Plasmodium juxtannucleare*

O diagnóstico diferencial entre *P. juxtannucleare* e *P. gallinaceum* não apresenta dificuldades, uma vez que existem grandes diferenças morfológicas entre estas duas espécies (Versiani & Gomes 1941, Garnham 1966, Krettli 1972A, Massard & Massard 1981, Valkiūnas 2005). *Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* possui merontes eritrocíticos grandes, contendo de 8 a 36 merozoítos, e gametócitos arredondados que deslocam o núcleo da hemácia; enquanto, *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* se caracteriza por apresentar pequenas formas parasitárias de localização justaposta ao núcleo das hemácias, esquizontes

com citoplasma escasso contendo dois a seis merozoítos e gametócitos que raramente deslocam o núcleo do eritrócito (Versiani & Gomes 1941, Bennett et al. 1966, Garnham 1966). *P. juxtannucleare* infecta naturalmente galinhas no Brasil, enquanto a infecção por *P. gallinaceum* se encontra restrita a alguns países no continente asiático.

*P. juxtannucleare* foi observado e descrito por Versiani e Gomes (1941) em hemácias de galinhas sem raça definida, adquiridas no mercado central, em Belo Horizonte, Minas Gerais. O parasito despertou a curiosidade dos referidos pesquisadores devido ao tamanho diminuto, sempre observado próximo ao núcleo dos eritrócitos. Na ocasião, o estudo foi conduzido com a finalidade de investigar a presença de espiroquetídeos em esfregaços sanguíneos de aves.

Em 1957, no Japão, Ishiguro descreveu outra espécie de hemoparasito também observado em esfregaços sanguíneos de galinhas, a qual denominou de *Plasmodium japonicum*. Contudo, em 1959, Akiba observou que *P. japonicum* apresentava as mesmas características de *P. juxtannucleare* e após realizar criteriosa comparação da biologia e da morfologia apresentada pelas duas espécies, concluiu que de fato *P. japonicum* e *P. juxtannucleare* eram a mesma espécie. De acordo com as normas de classificação prevaleceu o nome mais antigo e utilizado na primeira descrição.

*P. juxtannucleare*, inicialmente, foi classificado como pertencente ao subgênero *Novyella* em função dos pequenos estádios morfológicos que não deformam e não excedem o tamanho do núcleo da célula hospedeira e da presença de gametócitos alongados. Entretanto, Valkiūnas em 2005 realizou uma revisão taxonômica das espécies de *Plasmodium* descritas até então, e por meio da utilização de critérios morfológicos reconheceu características exclusivas de *P. juxtannucleare*, capazes de distinguir este parasito das demais espécies do subgênero *Novyella*. *P. juxtannucleare* foi incluída como a única representante do novo subgênero *Bennettinia* devido à presença de oocisto pedunculado e de gametócitos com morfologia arredondada, oval, irregular ou mais raramente alongada (Krettli 1972A, B).

A presença de *P. juxtannucleare* já foi assinalada em vários países da América do Sul, África e Ásia (Poulsen et al. 2000, Valkiūnas 2005, Murata et al. 2008). No Brasil, além do estado de Minas Gerais (Versiani & Gomes 1943, Paraense 1949, Krettli 1972A, Santos-Prezoto et al. 2004, Silveira et al. 2009A) a presença deste parasito também foi assinalada no estados do Pará (Serra-Freire & Massard 1976), do



Mato Grosso do Sul (Serra-Freire & Massard 1979), do Espírito Santo (Massard & Massard 1981), do Pernambuco (Mota 1997, Mota et al. 1998) e do Rio de Janeiro (Massard 1982, Souza 1998, Oliveira 2001, Elisei et al. 2007, Vashist et al. 2011).

Além de galinhas domésticas *P. juxtannucleare* pode infectar outras aves, tais como os faisões (Bennett et al. 1966, Murata et al. 2008) perdizes (Mohan & Manwell 1966) e perus (Serra-Freire & Massard 1979, Poulsen et al. 2000). A infecção por este plasmódio também foi relatada em aves da família Corvidae (Bennett et al. 1993) e em pingüins (Grim et al. 2003). Isto demonstra o alto potencial de transmissão desta espécie de *Plasmodium*, razão pela qual poderia ser explicada a ampla distribuição do parasito em diferentes países de vários continentes (Ishiguro 1957, Bennett et al. 1966, Poulsen et al. 2000, Grim et al. 2003, Mota 1997, Souza 1998, Santos-Prezoto et al. 2004, Murata et al. 2008).

Poucos estudos experimentais avaliaram os aspectos do ciclo de vida, da transmissão e do grau de patogenicidade de *P. juxtannucleare* aos seus hospedeiros vertebrados (Al-Dabagh 1961, Bennett et al. 1966, Krettli 1972, Lourenço-de-Oliveira & Castro 1991, Elisei et al. 2001, Paraense 2004, Elisei et al. 2007, Silveira et al. 2009A; Vashist 2011, Vashist et al. 2011). Dois destes estudos realizados no Brasil, em condições experimentais, demonstraram haver baixa parasitemia e poucas alterações clínicas nas galinhas infectadas por *P. juxtannucleare* durante a fase aguda da infecção (Krettli 1972, Silveira et al. 2009B).

A avaliação de três isolados de *P. juxtannucleare* procedentes de regiões distintas (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) demonstrou haver homogeneidade na dinâmica da parasitemia, nas características morfológicas do parasito e no desenvolvimento dos sinais clínicos dos hospedeiros. Em concordância com outros estudos, às aves infectadas com os diferentes isolados apresentaram parasitemia baixa e ausência de sinais clínicos típicos da malária aviária provocada por outras espécies de plasmódios (Elisei et al. 2001; 2007). No entanto, a infecção de outras espécies de aves susceptíveis ao *P. juxtannucleare*, tais como pinguins e codornas, demonstrou que o impacto real da infecção em outros hospedeiros susceptíveis, talvez, ainda não seja conhecido. Esta mesma espécie de parasito causou transtornos clínicos tão graves que provocou a morte de vários pingüins em um centro de reabilitação na África do Sul (Grim et al. 2003). *P. juxtannucleare* também foi diagnosticado em faisões brancos (*Crossoptilon crossoptilon*) após o aparecimento de sinais clínicos severos, tais como letargia e edema pulmonar em um

zoológico no Japão (Murata et al. 2008). A patogenidade de *P. juxtannucleare*, assim como das demais espécies de *Plasmodium*, pode ser influenciada pela virulência apresentada entre cepas distintas do parasito e pela resposta imune, relacionada à susceptibilidade do hospedeiro (Paraense 1950, Al-Dabagh 1961, Bennett et al. 1966, Krettli 1971, 1972A, Soares et al. 1999B, Grim et al. 2003, Murata et al. 2008).

Em ambientes naturais, atribui-se a transmissão natural deste parasito ao *Culex saltanensis* (Lourenço-de-Oliveira & Castro 1991); entretanto, há necessidade de estudos que avaliem a transmissão deste parasito por vetores em outros estados do Brasil, uma vez que, os vetores infectados naturalmente foram observados única vez, no estado do Rio de Janeiro.

A patogenicidade de *P. juxtannucleare* pode variar de acordo com a cepa do parasito e com a fase aguda ou crônica da doença. Os sinais clínicos associados à infecção crônica em galinhas são geralmente discretos e considerados como pouco prejudiciais aos hospedeiros, assim como a maioria das infecções causadas por hemossporídeos (Fernando & Dissanaiké 1975, Mota et al. 1998, Valkiūnas 2005). A parasitemia observada na fase crônica geralmente é baixa, característica que pode predispor os hospedeiros a tornarem-se reservatórios do parasito.

A fase aguda da malária por *P. juxtannucleare* foi caracterizada como patogênica em diferentes estudos que relataram haver parasitemia elevada e alta taxa de mortalidade em pintinhos infectados experimentalmente (Al Dabagh 1961, Itagaki 1970). As aves infectadas durante a fase aguda podem apresentar perda de apetite, queda da produção de ovos, alterações hematológicas como elevação do número de leucócitos, trombocitopenia, anemia, hepatoesplenomegalia e sintomas neurológicos, tais como incoordenação motora e paresia (Al Dabagh 1961, Serra-Freire & Massard 1979, Souza 1998, Grim et al. 2003, Silveira et al. 2009B).

O ciclo biológico de *P. juxtannucleare* não está suficientemente conhecido, principalmente os aspectos que se referem à fase exoeritrocítica. Na maioria dos estudos, as formas exoeritrocíticas foram observadas de forma escassa e aleatória no hospedeiro, e em alguns destes experimentos as formas exoeritrocíticas não foram visualizadas (Beltrán 1943, Barreto 1943, Versiani & Gomes 1943, Paraense 1947, Dhanapala 1962, Krettli 1971, Soares et al. 1999A). Paraense (1947) com a finalidade de avaliar a patogenicidade, durante a fase exoeritrocítica, administrou doses elevadas de quinina em galinhas e induziu o desenvolvimento de formas exoeritrocíticas. Por meio desta metodologia foi possível observar numerosos

parasitos no baço, uma vez que a quinina exerce efeito negativo para o parasito somente durante a fase eritrocítica. Alguns anos mais tarde, este mesmo pesquisador, ao estudar comparativamente quatro cepas de *P. juxtannucleare* observou o aparecimento irregular dos estádios exoeritrocíticos nas células do baço, do fígado, da medula óssea e do cérebro (Paraense 1950). Neste estudo experimental, o aumento da patogenicidade de *P. juxtannucleare* em galinhas foi relacionado ao maior encontro de formas exoeritrocíticas do parasito e não com a parasitemia eritrocítica, pois as aves utilizadas no ensaio experimental morreram apresentando os sinais de malária aviária, entretanto exibiam baixa parasitemia.

Os estudos anteriormente realizados contribuíram para o conhecimento de características biológicas de *P. juxtannucleare*, sobretudo associadas ao ciclo eritrocítico. Porém, pouco ainda é conhecido sobre a patogenicidade ao hospedeiro nos casos de co-infecção de aves por este plasmódio e por outros patógenos frequentemente encontrados em aves (Vashist 2011).

A avaliação da co-infecção de aves por *P. juxtannucleare* e um patógeno potencialmente imunossupressor em aves sabidamente isentas de patógenos específicos, como as galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*), infectadas experimentalmente poderia fornecer informações interessantes sobre a resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que estas aves são originadas de lotes controlados e não apresentam anticorpos contra os seguintes patógenos: Adenovirus aviário grupo I, Adenovirus aviário grupo II (HEV), Adenovirus aviário grupo III (EDS), Vírus da encefalomielite aviária, Influenza aviária (Tipo A), Vírus da nefrite aviária, Paramyxovirus aviário Tipo 2, Reovirus aviário S 1133, Vírus da Rinotraqueíte aviária; Rotavirus aviário; *Mycobacterium avium* ; Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV); Antígenos endógenos GS; Pox vírus; *Hemophilus paragallinarum* variantes A,B,C; Vírus da bronquite infecciosa- Ark; Vírus da bronquite infecciosa- Conn; Vírus da bronquite infecciosa- JMK; Vírus da bronquite infecciosa- Mass; Vírus da doença infecciosa bursal Tipo 1; Vírus da doença infecciosa bursal Tipo 2; Vírus da Laringotraqueíte infecciosa; Vírus da leucose aviária A, B; Vírus da leucose aviária linfoide A,B,C,D,E,J; Vírus da doença de Marek (Sorotipos 1,2,3); *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; Doença de Newcastle; Vírus da Reticuloendoteliose; *Salmonella pullorum*; *Salmonella* sp.

As aves domésticas, principalmente as galinhas são constantemente desafiadas por inúmeros patógenos presentes no ambiente, principalmente pelos vírus (McNeilly et al. 1995, Haridy et al. 2009, Toro et al. 2009). A co-infecção de galinhas por *P. juxtannucleare* e agentes virais imunossupressores que podem ser encontrados abundantemente no ambiente nunca foi avaliada. Alguns vírus como o “*Chicken Anemia Virus*” (CAV-Vírus da Anemia Infecciosa das galinhas) são naturalmente adquiridos pelos hospedeiros ainda jovens por meio das fezes contaminadas ou pela via de transmissão vertical. O CAV, devido á alta capacidade de transmissão e de resistência em meio ambiente, encontra-se amplamente distribuído em diferentes países, inclusive no Brasil (Brentano et al. 1991, Brentano et al. 2000, Tan & Tannock 2005, Peters et al. 2007). Este vírus é capaz de causar severa patogenicidade aos indivíduos jovens, entretanto apresenta baixa patogenicidade para os hospedeiros adultos e por isto é negligenciado em programas de vacinação obrigatória na maioria dos países (McNulty 1991).

#### **1.4. Vírus da Anemia infecciosa das galinhas (“Chicken Anemia Virus” -CAV)**

O vírus da anemia infecciosa das galinhas pertence ao gênero *Gyrovirus*, família *Circoviridae*. Este vírus, isolado primeiramente no Japão por Yuasa e colaboradores (1979), apresenta pequeno tamanho (diâmetro: 20 a 25nm), ausência de envelope e é formado por uma fita simples de DNA.

Após o primeiro registro no Japão, a infecção de galinhas pelo vírus CAV já foi registrada em vários países no mundo, tais como Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Suíça, Inglaterra, Nigéria, Austrália e Brasil (Bulow et al. 1983, Chettle et al. 1989, Hoop et al. 1992, Brentano et al. 2000, Oluwayelu & Todd 2008). A galinha doméstica é o único hospedeiro natural conhecido, no entanto há evidencias sorológicas de que este vírus possa infectar outras aves domésticas e silvestres (Farkas et al. 1998).

A transmissão do vírus aos hospedeiros pode ocorrer pela via vertical aos embriões ou pela rota fecal-oral às aves jovens e adultas (Mc Nulty 1991, Hoop 1992). As galinhas adultas geralmente não desenvolvem os sinais da doença, entretanto, quando a infecção é adquirida durante a fase de postura o vírus pode ser

transmitido aos embriões, que desenvolvem a doença clínica durante as primeiras semanas após o nascimento (Lamichhane et al. 1991). Após o desenvolvimento da resposta imunológica contra o vírus, as galinhas são capazes de transmitir os anticorpos maternos contra o vírus aos embriões, garantindo que os pintinhos não desenvolvam a doença clínica durante as primeiras semanas de vida (Otaki et al. 1992).

Os sinais clínicos manifestados durante a fase aguda da infecção, geralmente, ocorrem a partir da terceira semana de vida nas aves susceptíveis, como resultado da exposição ao vírus logo após o nascimento. A patogenidade pode variar de acordo com a susceptibilidade dos hospedeiros, com o inóculo da carga viral e com a co-infecção por outros patógenos (Tan & Tannok 2005). As aves infectadas podem apresentar sintomas tais como, diminuição do crescimento, anorexia, depressão, palidez acentuada, anemia intensa e morte (Tan & Tannok 2005). As lesões patológicas observadas são palidez generalizada de órgãos como baço, fígado e medula óssea (Adair 2000). Além disso, a presença de focos hemorrágicos musculares, atrofia do timo e da bolsa cloacal são considerados sinais muito característicos da anemia infecciosa viral em galinhas (Rosenberger & Cloud 1998). Microscopicamente, a medula óssea das aves infectadas pode apresentar depleção de células e substituição por tecido adiposo, enquanto no timo, no baço e na bolsa é comum ocorrer a depleção linfocítica (Schat & Van Santen 2008).

O vírus infecta as células da medula óssea, particularmente os hemocitoblastos que são precursores de eritrócitos, trombócitos e leucócitos; além destas células, o CAV infecta também os precursores de linfócitos T e os linfócitos T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no timo e os precursores de linfócitos B e linfócitos B na bolsa cloacal (Adair 2000; Todd 2004; Tan & Tannock 2005). As aves que se recuperam da infecção pelo CAV apresentam melhora do quadro clínico, geralmente, quatro semanas após a infecção (Lamichhane et al. 1991).

A infecção pelo CAV tem caráter imunodepressor e pode retardar o desenvolvimento da resposta inflamatória, aumentando assim a susceptibilidade dos hospedeiros a outros patógenos (Rosenberger & Cloud 1989, McNeilly et al. 1995). Estudos experimentais observaram que a co-infecção em galinhas pelo vírus CAV e pelo vírus responsável pela doença de Marek (herpesvirus) eleva a mortalidade. A co-infecção de galinhas pelo CAV e pelo vírus da artrite infecciosa (reovirus)

reduziu o ganho de peso e diminuiu o valor do hematócrito de forma significativamente mais acentuada nas aves concomitantemente infectadas (McNeilly et al. 1995). As aves previamente infectadas pelo birnavírus, responsável pela doença infecciosa da bolsa (DIB), quando inoculadas com o CAV apresentaram anemia e imunodepressão potencializadas, além disto, o número de macrófagos e de linfócitos T do baço e timo encontraram-se significativamente mais reduzidos nas aves co-infectadas, quando comparadas às galinhas infectadas unicamente pelo CAV (Toro et al. 2009).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os parasitos da malária aviária (*Plasmodium* sp.) estão distribuídos em todos os continentes do mundo, exceto na Antártica. Entre as várias características observadas, a facilidade de transmissão pelos vetores (Diptera, Culicidae) e a baixa especificidade em relação aos hospedeiros, torna a relação destes parasitos e seus hospedeiros um dos modelos de estudo mais interessantes na parasitologia (Atkinson & Van Riper 1991, Valkiūnas 2005). A utilização da infecção experimental no estudo dos parasitos da malária aviária é de extrema importância para o conhecimento da relação parasito-hospedeiro. Além disso, também é possível excluir experimentalmente a ação de patógenos desconhecidos, previamente adquiridos pelo hospedeiro, bem como analisar a resposta do hospedeiro na infecção primária e na co-infecção com agentes previamente definidos.

Atualmente no Brasil, *P. juxtannucleare* é a única espécie descrita como responsável pela malária em galinhas naturalmente infectadas. Embora, este parasito esteja distribuído em várias regiões do Brasil e a prevalência de galinhas infectadas possa alcançar 100% (Santos-Prezoto et al. 2004), a infecção causada por esta espécie recebe pouca atenção. Número reduzido de estudos abordaram as características associadas aos aspectos biológicos de *P. juxtannucleare* (Versiani & Gomes 1943, Al Dabagh 1961, Bennet 1966A,B,C, Krettli 1972A, B, Massard & Massard 1981, Massard 1982, Mota 1998, Souza 1998, Oliveira 2001, Elisei et al. 2007, Vashist et al. 2008, Silveira et al. 2009B, Vashist 2011).

A utilização de galinhas SPF em modelos experimentais envolvendo a malária aviária ainda não foi realizada até o presente momento e poderá contribuir

com informações adicionais sobre a suscetibilidade do hospedeiro. Outro aspecto relevante a ser abordado diz respeito à co-infecção e a imunossupressão de galinhas por *P. juxtannucleare* e por CAV. Pois, ainda que as galinhas sejam constantemente desafiadas por diferentes patógenos, à infecção por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF previamente imunossuprimidos por CAV, dois agentes encontrados naturalmente infectando galinhas, ainda não foi avaliada em condições experimentais. A hipótese avaliada neste estudo é a de que pintinhos SPF previamente imunossuprimidos por CAV e infectados por *P. juxtannucleare* apresentam sinais mais graves da infecção.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Neste estudo foi desenvolvido um modelo para investigar o efeito da malária aviária causada por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF previamente imunossuprimidos pelo vírus da anemia infecciosa (CAV).

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar e caracterizar molecularmente uma cepa de *P. juxtannucleare* obtida a partir de galinhas domésticas naturalmente infectadas no Estado de Minas Gerais;
- Infectar experimentalmente pintinhos SPF (*Specific pathogen free*) com a cepa isolada e comparar a parasitemia presente no grupo exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare* e co-infectado por *P. juxtannucleare*-CAV;
- Avaliar as alterações no hematócrito, no número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina, assim como na concentração de proteínas plasmáticas totais e de glicose em pintinhos SPF infectados exclusivamente por *P. juxtannucleare* e co-infectados por *P. juxtannucleare*-CAV.

- Avaliar o processo patológico macroscópico e microscópico nos indivíduos exclusivamente infectados por *P. juxtannucleare* e nos indivíduos co-infectados por *P. juxtannucleare*-CAV comparativamente ao grupo controle não infectado.

- Avaliar o número de leucócitos totais e diferenciais e a resposta imune celular por linfócitos B, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico; além de avaliar comparativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias e de ativação em pintinhos SPF infectados exclusivamente por *P. juxtannucleare* e co-infectados por *P. juxtannucleare*-CAV.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi previamente apresentado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Cetea) e realizado após a aprovação de acordo com o protocolo N° 166/2010.

##### **4.1 Identificação de *Plasmodium juxtannucleare* em galinhas naturalmente infectadas**

A coleta de sangue para a pesquisa de *P. juxtannucleare* foi realizada em galinhas de criação rústica, presentes em fundo de quintal, selecionadas aleatoriamente em pequeno criatório na cidade de Itabirito (Fazenda Mourão Vermelho, coordenadas geográficas: 20°16'03.17"S; 43°49'19.06"O), localizado próximo à cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Para a realização do diagnóstico foram coletadas amostras de sangue para a preparação de esfregaços sanguíneos e para a extração de DNA. O parasito foi identificado morfológicamente de acordo com a descrição de Versini e Gomes (1941) e Krettli (1971) e molecularmente através da amplificação do DNA por PCR e do sequenciamento (Hellgren et al. 2004). O diagnóstico de *P. juxtannucleare* foi confirmado associando-se as técnicas morfológica e molecular, conforme recomendado por Braga e colaboradores (2011).

Após o diagnóstico de *P. juxtannucleare* uma galinha da área avaliada foi adquirida para a realização de inoculações experimentais. Esta galinha doadora foi



mantida no laboratório do setor de Doenças das Aves, Escola de Veterinária (UFMG), em gaiola telada, contendo água e ração “*ad libitum*”. Com a finalidade de aumentar a parasitemia foram administrados 26 mg/kg de acetato de metilprednisolona (corticosteróide) no músculo peitoral (Krettli 1971). A parasitemia inicial apresentada pela galinha doadora foi de 0,05%, visualizada em 100 campos microscópicos. Foram observados ao exame dos esfregaços sanguíneos trofozoítos, esquizontes e um gametócito. Quinze dias após a administração da medicação a parasitemia observada foi de 1%. Uma alíquota do sangue desta galinha doadora foi utilizada nas inoculações experimentais e para a criopreservação.

Para a realização de experimentos futuros uma alíquota de sangue desta mesma galinha doadora de parasitos foi acondicionada em tubos de 0,5mL para criopreservação, contendo 20% de glicerol. Os tubos contendo as amostras foram congelados gradualmente. Inicialmente, os tubos permaneceram por 10 min a 4°C, em seguida foram acomodados por 6 horas na temperatura de -20°C e após este período os tubos contendo as amostras foram congeladas a -196°C utilizando-se nitrogênio líquido (Souza et al. 2000).

## 4.2. Parasitemia

As amostras de sangue para a preparação de esfregaços sanguíneos e contagem da parasitemia foram coletadas pela punção da veia braquial, utilizando-se agulhas de 25x10 descartáveis. Após a preparação, os esfregaços sanguíneos foram secados ao ar, fixados em metanol absoluto (álcool metílico P.A.) e corados pela solução de GIEMSA (eosina-azul de metileno) diluída em água tamponada (pH 6,8 – 7,1) na proporção de 1:10, por 45 minutos. Os esfregaços sanguíneos corados foram analisados utilizando-se microscópio de luz (microscópio: Olympus CX 31, Olympus®, Tokio, Japão). A parasitemia por *P. juxtannucleare* nas aves infectadas foi avaliada em todo o experimento por meio dos esfregaços sanguíneos e calculada de acordo com Godfrey et al. (1987), observando-se 100 campos microscópicos homogêneos em microscopia de luz, sob lente de imersão (1000x)

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de hemácias parasitadas}}{10,000} \times 100 =$$

### **4.3. Identificação molecular de *P. juxtenucleare*: extração de DNA e PCR, sequenciamento e análise filogenética**

Para a extração do DNA foram coletados 20 µL de sangue periférico de cada galinha e adicionado a um tubo tipo de microcentrifuga contendo 300 µL de solução de lise celular (Kit Promega<sup>®</sup>, Wiscosin, EUA). A amostra de sangue misturada à solução de lise foi mantida na geladeira (4°C), por período de até 15 dias, para a extração do DNA seguindo as instruções do fabricante (kit Wizard Promega<sup>®</sup>, Genomic DNA purification, Wiscosin, EUA).

Após o processo de extração de DNA, as amostras foram acondicionadas em tubos de microcentrifuga e mantidas no congelador (temperatura média -20 °C) até a realização dos testes de PCR. As amostras que apresentavam entre 100-200 nanogramas de DNA foram utilizadas na PCR e as amostras que apresentavam acima desta faixa determinada foram diluídas em água miliQ para 100 nanogramas de DNA.

Para todas as reações de PCR foram utilizadas como controles positivos das reações, amostras de DNA extraídas do sangue de galinhas infectadas experimentalmente por *P. gallinaceum* e apresentando alta parasitemia. As amostras de sangue contendo *P. gallinaceum* foram gentilmente cedidas Dr Paulo F. Pimenta, Centro de Pesquisa René Rachou- CPqRR/Fiocruz/MG, Brasil, Belo Horizonte, MG.

Os controles negativos utilizados para monitorar as reações foram obtidos a partir da extração de DNA do sangue de pintinhos SPF. O sangue foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins, Laboratório de Doenças das Aves, Escola de Veterinária, UFMG.

As amostras de DNA foram processadas por uma *nested*PCR, cuja finalidade foi amplificar o DNA das amostras sabidamente positivas pelo diagnóstico morfológico e em seguida realizar o sequenciamento do DNA do parasito (Hellgren et al. 2004).

Na primeira reação de amplificação, foram utilizados os iniciadores HaemNFI e HaemNR3 que amplificam o fragmento de 671 pb do gene mitocondrial. Na segunda reação foram utilizados os primers HaemF e HaemR2 que amplificam o

fragmento interno do gene citocromo *b* contendo 480-bp. As seqüências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

- HaemNFI: 5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3' (I = base universal, inosina)
- HaemNR3: 5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'
- HaemF: 5'- ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'
- HaemR2: 5'- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'

Na primeira etapa desta reação de amplificação, cada tubo recebeu, aproximadamente, 100 nanogramas do DNA e 20 µL de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl (pH 8,5); 50 mM KCl (Phoneutria<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,25 mM de cada dNTP; 0,5 U Taq DNA polimerase (Phoneutria<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil); 0,6 mM de cada iniciador e água ultra pura (miliQ).

O programa de amplificação na primeira etapa de reação na termocicladora consistiu em desnaturação inicial: 3 minutos, seguida pela etapa de desnaturação total: 20 ciclos de 94°C por 30 segundos; anelamento: 50°C por 30 segundos; extensão: 72°C por 45 segundos; extensão final de 72°C por 10 minutos; finalização: 4°C.

Na segunda etapa da reação de amplificação, cada tubo recebeu 2µL do produto da primeira etapa da reação *Nested* e a mesma composição dos reagentes descrita anteriormente modificando-se apenas o número de ciclos: desnaturação inicial: 3 minutos, seguida pela etapa de desnaturação total: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; anelamento: 50°C por 30 segundos; extensão: 72°C por 45 segundos; extensão final de 72°C por 10 minutos; finalização: 4°C.

O produto da segunda etapa da reação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6%. Após a finalização das etapas de fixação, coloração e revelação do gel a banda presente no controle positivo e nas amostras positivas foram comparadas ao padrão de peso molecular na faixa de 480 pb.

As amostras amplificadas durante a reação de PCR foram selecionadas para o seqüenciamento da região do gene citocromo *b* (*Cit b*). Previamente a reação de

sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit de purificação de produto de PCR (PCR Purification Kit QIAquick, Qiagen®).

Uma alíquota de cada amostra purificada para a reação de sequenciamento foi acondicionada em tubos de microcentrífuga contendo: 0,5mM do iniciador HaemF direto (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 reverso (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), 1µL kit para sequenciamento "Big Dye" e água ultra pura suficiente para completar o volume final de 10µL. O programa de amplificação na termocicladora consistiu nas etapas: desnaturação inicial: 96°C por 2 minutos, seguida pela desnaturação total: 35 ciclos de 96°C por 45 segundos; anelamento: 50°C por 30 segundos; extensão: 60°C por 4 minutos; finalização: 4°C.

Após a reação, o produto foi precipitado pela adição de 40 µL de isopropanol (65%), encubado por 15 min. na temperatura de 25°C, seguido de centrifugação a 14000g por 25 minutos na temperatura 25°C. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de etanol 60% foram adicionados às amostras. Novamente a amostra foi centrifugada a 14000 g por 5 min na temperatura de 25°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento re-suspendido em 10 µL de tampão para re-suspensão contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA 0,5mM.

As amostras foram sequenciadas utilizando o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) do Laboratório de Genética, da UFMG. As sequencias obtidas foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al. 1994) e então, editadas por meio do programa BIOEDIT (Hall, 1999).

As seqüências de DNA editadas e alinhadas foram submetidas à busca de homologia de bases com as seqüências já publicadas e depositadas no *GenBank* (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e no banco de dados *MalAvi* (Bensch et al. 2009).

O filograma foi construído pela análise de inferência Bayesiana utilizando-se o programa MrBayes v3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). A inferência Bayesiana foi realizada com duas cadeias de Markov que funcionam simultaneamente para 3.000.000 gerações, com 100 árvores amostradas em cada geração, para um total de 30.000 árvores. As primeiras 7.500 árvores foram descartadas como passo "burn-in" e as árvores restantes utilizadas para calcular as probabilidades posteriores.

#### **4.4. Diagnóstico para o Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV): PCR e ELISA**

As amostras de DNA das aves para o diagnóstico do CAV foram processadas por reação específica de PCR, seguindo a metodologia proposta por Marín e colaboradores (2012) para amplificação de fragmento de 693 pb. da proteína VP1 do CAV.

Na PCR específica para CAV foram utilizados os iniciadores (Primers):

- UFMGF: CCTGTTCCGACACATTGA
- UFMGR: TATGGCCTCTGCCTGTTA

Nesta reação de amplificação cada tubo recebeu 200 nanogramas de DNA extraído do hospedeiro, 5 µL de tampão, contendo: 100mM Tris HCL (pH 8,4), 50mM KCL (Phoneutria<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil); 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 1 UI de Taq DNA polimerase (Phoneutria<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil); 1 µl mM (10 pmol) de cada iniciador e água ultra pura (miliQ) suficiente para completar o volume final de 50 microlitros.

Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos, seguida pela etapa de desnaturação 94°C durante 60s; anelamento: 52 °C por 60 segundos; extensão: 72°C por 60 segundos; extensão final de 72°C por 10 minutos; finalização: 4°C. Total de ciclos 35.

O produto da reação da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, em tampão 1x. Após a finalização da eletroforese o gel foi corado com a solução de brometo de etídeo, na concentração de 10mg/ml, e as bandas resultantes contendo 693 pb. foram observadas com o auxílio de um transiluminador UV e comparadas à banda referente ao controle positivo.

Em cada reação foi utilizada como controle positivo uma amostra de DNA extraída de vacina comercial cepa Cuxhaven-1<sup>®</sup> (Thymovac, AviPro, Lohmann Animal Health, Germany). Um controle negativo, contendo todos os reagentes sem a inclusão de uma amostra de DNA, foi utilizado para comparação entre as amostras.

A detecção sorológica de anticorpos contra o CAV foi realizada através de ELISA. As ELISAS foram realizadas a partir do soro sanguíneo das aves diluído 1:100 utilizando o kit comercial para a detecção de anticorpos anti-CAV- ELISA (Chicken Anemia Virus antibody test FlockCheck, IDDEX<sup>®</sup>, Maine, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Este kit comercial utiliza o princípio do teste imunoenzimático de competição, em que os níveis de anticorpos são inversamente proporcionais às densidades óticas obtidas no teste. A densidade ótica (leitura 650nm) obtida a partir de cada amostra foi relacionada à densidade ótica dos controles negativos da placa, originando uma razão S/N.

$$\text{Cálculo da razão S/N} = \frac{\text{OD da amostra}}{\text{OD do controle negativo}}$$

A razão S/N determina o ponto de corte, ou seja, o valor de densidade ótica no teste que determina os soros positivos e negativos. As amostras com razão S/N maiores que 0,60 foram consideradas negativas e as amostras com S/N menores ou iguais a 0,60 foram consideradas positivas.

#### **4.5. Modelo experimental: composição dos grupos e infecção experimental por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF imunossuprimidos por CAV**

Para desenvolver o modelo de estudo foram obtidos 100 ovos embrionados, originados de matrizes livres de patógenos (SPF- *Specific pathogen free*) da linhagem Leghorn branca, gentilmente cedidos pelo laboratório Biovet<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Os ovos foram acomodados em chocadeira portátil (IP 130, Premium Ecológica<sup>®</sup>, Belo Horizonte, Brasil) e mantidos em condições controladas de temperatura (37,5°C) e de umidade (80%) por 21 dias. Após o período de incubação dos ovos, 86 pintinhos eclodiram. As aves foram transferidas aleatoriamente para gaiolas teladas e aquecidas, contendo água “*ad libitum*” e ração livre de

coccidiostáticos. A limpeza das gaiolas e a troca da “cama” foram realizadas diariamente.

No primeiro dia após o nascimento, seis aves foram eutanaziadas para a coleta de sangue e realização de exames prévios com a finalidade de avaliar as condições hematológicas e descartar a presença de CAV e de *Plasmodium juxtannucleare* nos indivíduos previamente às inoculações. Os pintinhos e o sangue da galinha doadora foram avaliados quanto à presença de anticorpos contra o CAV. A presença de DNA do CAV em amostras do sangue foi investigada na galinha doadora e nas aves receptoras. A presença de DNA do CAV, também foi investigada a partir de fragmentos extraídos de tecidos obtidos a partir do fígado, baço, pâncreas, gônadas, bursa de Fabricius e timo das aves receptoras (Marín et al. 2012). Além disto, a pesquisa morfológica por *P. juxtannucleare* foi realizada em esfregaços sanguíneos das aves previamente a inoculação por meio da observação de 200 campos microscópicos sob lente de imersão (aumento: 1000x).

As aves foram divididas, aleatoriamente, no segundo dia após-nascimento, em quatro grupos contendo 20 indivíduos em cada: Grupo CAV: formado por pintinhos a serem exclusivamente infectados pelo CAV; Grupo co-infectado: indivíduos a serem infectados por CAV e por *P. juxtannucleare*; Grupo *P. juxtannucleare*: indivíduos a serem infectados exclusivamente por *P. juxtannucleare*; Grupo controle: indivíduos não infectados. Os grupos CAV e co-infectado permaneceram em um laboratório A e os grupos *P. juxtannucleare* e controle foram conduzidos ao laboratório B, afastado do primeiro. Os laboratórios A e B, além de apresentarem as janelas teladas e sistema de exaustão de ar, ofereciam as mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade. As aves foram marcadas individualmente com a utilização de anilhas contendo letras. Os pintinhos, assim como a galinha doadora não apresentaram DNA ou anticorpos contra o CAV previamente às inoculações experimentais.

No laboratório A, os grupos CAV e co-infectado receberam o inóculo composto por vacina viva contendo vírus atenuado da anemia infecciosa (CAV). As aves destes grupos foram infectadas pelo vírus via i.p, com a dosagem única de 0,3 µL de vacina contendo o inóculo  $10^{5.5}$  doses infectantes para 50 % dos cultivos

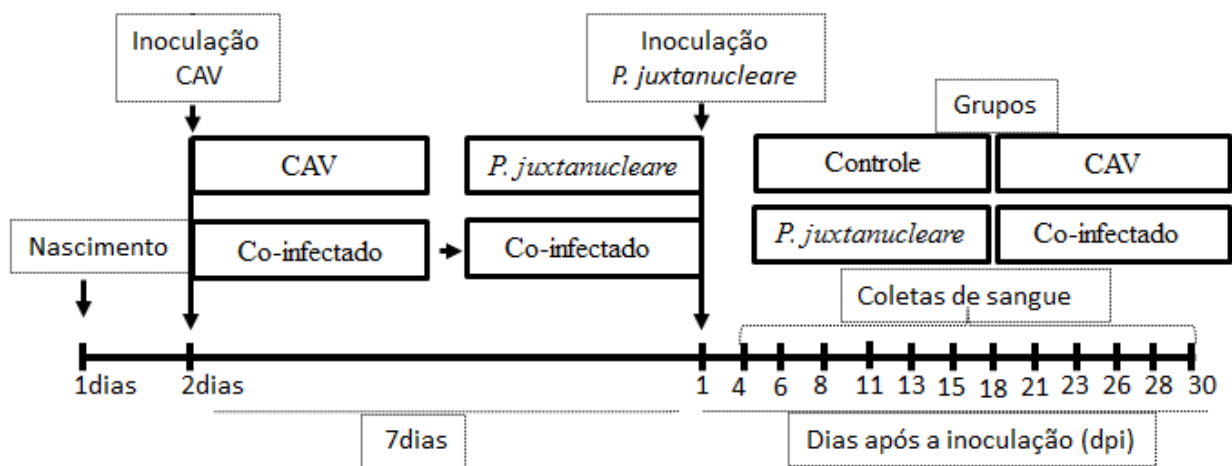
celulares (DICC<sub>50</sub>), cepa Cuxhaven-1 (Thymovac, AvilPro®), metodologia adaptada de Hoop (1992).

Sete dias após a inoculação por CAV, o grupo co-infectado e o grupo *P. juxtannucleare*, foram inoculados, via i.p, com 0,3 mL de sangue heparinizado da galinha doadora de *P. juxtannucleare*. A galinha doadora apresentou 1% de parasitemia no momento da inoculação. O desenho experimental pode ser observado na figura 2. O grupo controle recebeu 0,3 mL de solução fisiológica 0,8%, via i.p.

A coleta de sangue para a realização dos exames nos quatro grupos foi realizada três vezes na semana com a duração de 30 dias após a inoculação de *P. juxtannucleare* (4°,6°,8°,11°,13°,15°,18°,21°,23°,26°,28°,30°dpi). Enquanto, a glicose, o peso e a temperatura corporal foram avaliados duas vezes na semana (4°,6°,11°,13°,21°,23°,26°,28°dpi).

Seis aves foram avaliadas durante as coletas, utilizando o sistema de rodízio, que consistiu na coleta de sangue alternando os indivíduos (N=6). Este sistema se fez necessário para evitar a possibilidade de erro de análise mediante coletas sanguíneas sucessivas nos mesmos indivíduos e desta forma minimizar a possibilidade de alterações hematológicas decorrentes da retirada excessiva de sangue.





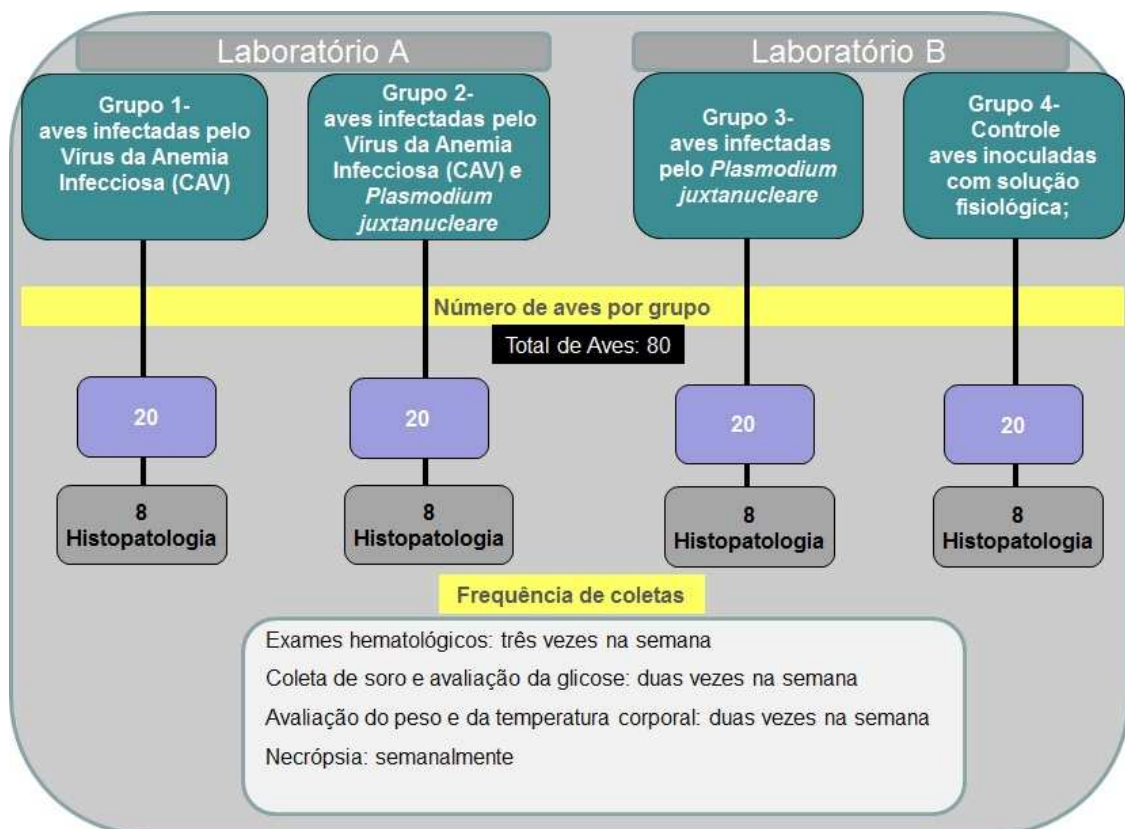
**Figura 2.** Fluxograma demonstrando o esquema utilizado para infecção experimental por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF imunossuprimidos utilizando Vírus da Anemia infecciosa das galinhas (CAV). A coleta de sangue foi realizada de acordo com os dias após a inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos (N=6): Controle (pintinhos não infectados), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV), *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado pelo *P. juxtannucleare*) e Co-infectado (infecção mista).

A disposição dos quatro grupos mantidos nos laboratórios A e B e a esquematização da coleta de sangue para as provas hematológicas e sorológicas podem ser visualizadas na figura 3.

Ao longo do estudo, duas aves de cada grupo foram eutanaziadas semanalmente (7°,15°,21°,28°dpi) para a avaliação das alterações macroscópicas e microscópicas. O exame macroscópico foi realizado durante as necropsias.

A avaliação microscópica foi realizada a partir da coleta de fragmentos obtidos do fígado, do baço, do pulmão, do cérebro, do cerebelo, do timo, da bolsa cloacal, do coração, do pâncreas e do rim. Os fragmentos dos órgãos foram colocados em formol 10% tamponado e enviados para preparação histológica no Laboratório de Histopatologia, ICB. Todos os indivíduos que morreram no decorrer do experimento também foram necropsiados e os fragmentos dos órgãos foram

avaliados quanto às características histopatológicas. Os pintinhos dos grupos CAV e co-infectado foram avaliados quanto à presença de DNA viral no sangue 14 dias após a inoculação por CAV. A fim de avaliar uma possível contaminação por CAV nos grupos *P. juxtannucleare* e controle e constatar a presença de anticorpos contra o vírus nos grupos CAV e co-infectado os pintinhos dos quatro grupos foram avaliados no 28º dpi por *P. juxtannucleare*.



**Figura 3. Fluxograma demonstrando a separação dos grupos em salas laboratoriais diferentes, assim como o número de indivíduos que compõem cada grupo e a frequência de realização dos exames nos quatro grupos experimentais.**

#### **4.6 Realização dos exames hematológicos, determinação do peso e da temperatura corporal**

Os exames hematológicos foram realizados a partir de amostras de sangue obtidas por punção da veia braquial, localizada na asa. Para a realização das análises coletou-se aproximadamente 1 mL de sangue, de cada ave, em tubo para microcoleta contendo anticoagulante EDTA K2 (MiniCollect, Vacuette<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Os tubos contendo as amostras de sangue foram mantidos refrigerados no decorrer da realização dos exames.

Na avaliação hematológica determinou-se o hematócrito, o número de eritrócitos e a hemoglobina. Os exames foram realizados tanto no Laboratório de Malária, ICB, quanto no Laboratório de Doenças das Aves, Escola de Veterinária, ambos na UFMG.

O hematócrito foi analisado pelo método do microhematócrito que consistiu na coleta de sangue em tubo de microcapilar. A amostra foi centrifugada por cinco minutos e o percentual de células vermelhas existente na amostra foi determinado pela comparação entre o resultado da amostra e a tabela de leitura para microhematócrito (Campbell 1995).

Para a determinação do número de eritrócitos foram utilizados 20µL de sangue, homogeneizado em 2mL de solução Natt-Herrick's (proporção de diluição 1:100). A mistura sangue/Natt-Herrick's, em seguida, foi levada ao agitador, permanecendo em leve agitação por cinco minutos para coloração das células, quando foi então, depositada na câmara de Neubauer espelhada para a realização da contagem do número de eritrócitos (Natt & Herrick 1952).

A determinação da hemoglobina foi realizada utilizando-se o método de reação da cianometahemoglobina. Uma amostra contendo 10 µL de sangue foi adicionada em 2,5 mL de reagente cianometahemoglobina (proporção de diluição 1:250). Esta mistura sangue/cianometahemoglobina permaneceu em temperatura ambiente por 10 minutos, protegida contra a luz; após este período a solução foi centrifugada a 3000 rpm, por cinco minutos, para remoção dos núcleos das hemácias, a fim de se evitar a concentração superestimada de hemoglobina (Thrall 2007). Após este procedimento as amostras foram levadas para leitura ao espectrofotômetro de luz (540nm).

Por meio de fórmulas padronizadas foram calculados os índices de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM), de acordo com Wintrobe (1934).

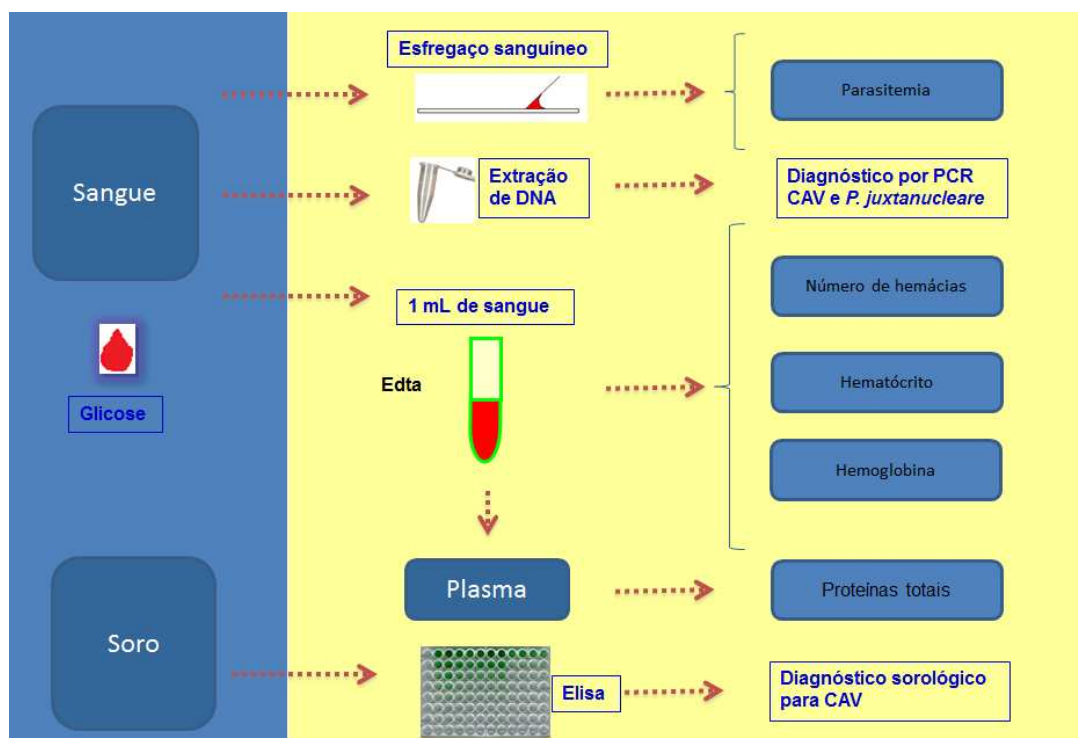
A concentração de glicose foi determinada pelo método do teste rápido, que consiste na aplicação de uma gota de sangue, sem anticoagulante, em uma tira-teste acomodada diretamente no aparelho digital, seguindo a recomendação dos fabricantes (Accu-Chek Advantage, Roche<sup>®</sup>, Mannheim, Alemanha).

Após a realização dos exames, o sangue foi centrifugado e o plasma obtido foi utilizado para a avaliação das proteínas totais utilizando-se o método de refratometria.

As ELISAS para a detecção de anticorpos contra o CAV foram realizadas utilizando-se o soro obtido por meio da coleta de sangue sem anticoagulante.

O peso corporal foi obtido utilizando-se uma balança portátil digital. A temperatura foi mensurada a partir da região cloacal das aves utilizando-se um termômetro digital.

A figura demonstrando os exames realizados pode ser observada na figura 4.



**Figura 4. Esquema demonstrando o material coletado e os exames realizados nos pintinhos SPF da linhagem Leghorn branca, após a inoculação por vírus atenuado da anemia infecciosa (CAV) e por *Plasmodium juxtanucleare*.**

## 4.7 Avaliação da resposta imunológica

Para a realização desta etapa do estudo foi conduzido outro experimento seguindo metodologia de diagnóstico, modelo experimental e formação dos grupos descrita anteriormente. As inoculações ocorreram no período de abril a maio de 2012, conforme o desenho experimental realizado no primeiro estudo,

Nesta etapa do estudo, realizada a fim de complementar as informações obtidas no primeiro experimento, foram adquiridos 50 ovos certificadamente SPF oriundos da Sadia Brasil<sup>®</sup>, Uberlândia, MG. No primeiro dia após o nascimento os pintinhos foram avaliados quanto à presença de DNA e/ou de anticorpos contra o CAV previamente as inoculações.

Os pintinhos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos compostos por 12 indivíduos a formarem os grupos: CAV- pintinhos exclusivamente infectados por CAV; *P. juxtannucleare*- indivíduos exclusivamente infectados por *P. juxtannucleare*; Grupo co-infectado- indivíduos infectados pelos dois patógenos; Grupo controle- não infectados. A infecção por CAV foi realizada sete dias antes da infecção por *P. juxtannucleare*. As coletas de sangue foram realizadas nos 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dpi por *P. juxtannucleare* e sempre nos mesmos indivíduos (sem sistema de rodízio), com exceção daqueles que morreram durante as avaliações. A parasitemia e a curva mortalidade foram determinadas utilizando-se a mesma metodologia proposta na primeira estratégia do estudo.

O perfil imunológico celular dos pintinhos dos grupos CAV, *P. juxtannucleare* e co-infectado foi avaliado por meio da análise do número de leucócitos totais, número absoluto de linfócitos, de heterófilos, de eosinófilos e de monócitos de forma comparativa aos valores observados no grupo controle, de acordo com item 4.8. Os números de linfócitos T, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> e as subpopulações destes tipos celulares associadas a moléculas co-estimulatórias e de ativação, além da população de linfócitos B, foram avaliadas nos mesmos grupos de pintinhos de forma comparativa a análise do número de células no grupo controle conforme descrito no item 4.9.

## 4.8 Leucograma

Para a avaliação do perfil imunológico coletou-se, em tubos contendo anticoagulante EDTA K2, aproximadamente 1mL de sangue da veia braquial das aves (N=6). O número total de leucócitos foi determinado em hemocítômetro de Neubauer a partir da alíquota de 20 $\mu$ L de sangue, homogeneizado em 2mL de solução Natt -Herrick's (diluição 1:100). A solução, em seguida, foi levada ao agitador, permanecendo em leve agitação por cinco minutos para coloração das células e a realização da contagem em microscopia de luz (Natt & Herrick 1952).

A contagem diferencial dos linfócitos, heterófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos foi realizada em esfregaços sanguíneos, observando-se o total de 100 células. Os esfregaços sanguíneos, preparados a partir de sangue sem anticoagulante, foram secados ao ar, fixados em metanol absoluto (álcool metílico P.A.) e corados pela solução de GIEMSA (eosina-azul de metileno) diluída em água tamponada (pH 6,8 – 7,1) na proporção de 1:10, por 45 minutos. O número absoluto de cada tipo de leucócito foi calculado considerando-se a porcentagem de cada célula sobre o total de leucócitos (Campbell 1995). Os tipos celulares foram determinados de acordo com Lucas & Jamroz (1961).

## 4.9 Fenotipagem celular

A marcação celular com o objetivo de determinar o número de células T e subpopulações (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) e de células B (Bu-1<sup>+</sup>) foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais específicos para os marcadores celulares de galinhas foram adquiridos comercialmente a partir da Southern Biotechnology Associates, Inc., Estados Unidos. Os anticorpos conjugados aos marcadores para a detecção de antígenos da superfície de linfócitos foram os seguintes (Tabela 2): Mouse Anti-Chicken Bu-1- conjugado com FITC, Mouse Anti-Chicken CD4- conjugado com FITC, Mouse Anti-Chicken CD8 $\alpha$ -conjugado com FITC, Mouse Anti-Chicken CD3- conjugado com “Spectral red” (SPRD), Mouse Anti-Chicken CD28- conjugado com PE-, Mouse Anti-Chicken MHC

Classe I- conjugado com PE, Mouse Anti-Chicken MHC Classe II- conjugado com PE (Tabela 2).

Para a marcação celular quatro microlitros de cada anticorpo monoclonal e 20 microlitros de sangue foram adicionados aos tubos específicos para leitura em citometria de fluxo. A marcação celular foi realizada imediatamente após a coleta do sangue. O tubo contendo a amostra de sangue e o anticorpo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 40 minutos. As hemácias das amostras foram lisadas com 2 mL de solução de lise (FACSLysing®-BD, USA) por 10 minutos, após a marcação celular com os anticorpos já descritos. A reação de lise foi bloqueada pela adição de 2mL de solução bloqueadora contendo PBS e BSA 0,5 %. Após o bloqueio, as amostras foram lavadas com PBS e centrifugadas a  $400 \times g$  durante 10 minutos, por duas vezes. As células marcadas foram ressuspendidas em 200 microlitros de PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA). Cem mil eventos foram adquiridos e analisados pelo Software FlowJo versão 8.7.3 (TreeStar, Inc., Ashland, EUA).

O número absoluto de cada tipo celular foi calculado considerando-se a porcentagem de cada célula sobre o número absoluto de linfócitos.

**Tabela 2. Especificidade de anticorpos monoclonais conjugados utilizados neste estudo para a marcação celular.**

<b>Antígeno de superfície celular</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marcação realizada</b>
<b>CD4<sup>+</sup></b>	linfócitos T auxiliares	FITC	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
<b>CD8<sup>+</sup><math>\alpha</math></b>	linfócitos T citotóxicos	FITC	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<b>CD3<sup>+</sup></b>	Linfócitos T	SPRD	
<b>CD28<sup>+</sup></b>	linfócitos Tnaïve e células de memória	PE	CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<b>MHCI<sup>+</sup></b>	Presente em quase todas as células nucleadas	PE	CD3 <sup>+</sup> MHCI <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<b>MHCII<sup>+</sup></b>	linfócitos e células apresentadoras	PE	CD3 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
<b>Bu-1<sup>+</sup></b>	linfócitos B	FITC	Bu1 <sup>+</sup>

## 4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas BioEstat 4.0 e GrafPad Prism 5.0. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando como diferença significativa p-valor inferior a 0,05.

Os dados, inicialmente submetidos ao teste de D'Agostino-Pearson para verificar a normalidade, foram processados utilizando-se o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn ou de Student-Newman-Keus. As análises de sobrevivência foram realizadas pelo teste Log-Rank.

A comparação estatística entre os quatro experimentais foi efetuada utilizando-se os valores médios obtidos durante cada observação, fundamentados em seis repetições (N=6). Nos grupos inoculados, somente os valores que se apresentaram abaixo do valor mínimo ou acima do máximo observados no grupo controle e acompanhados de diferença estatística foram considerados como significativamente diferentes.

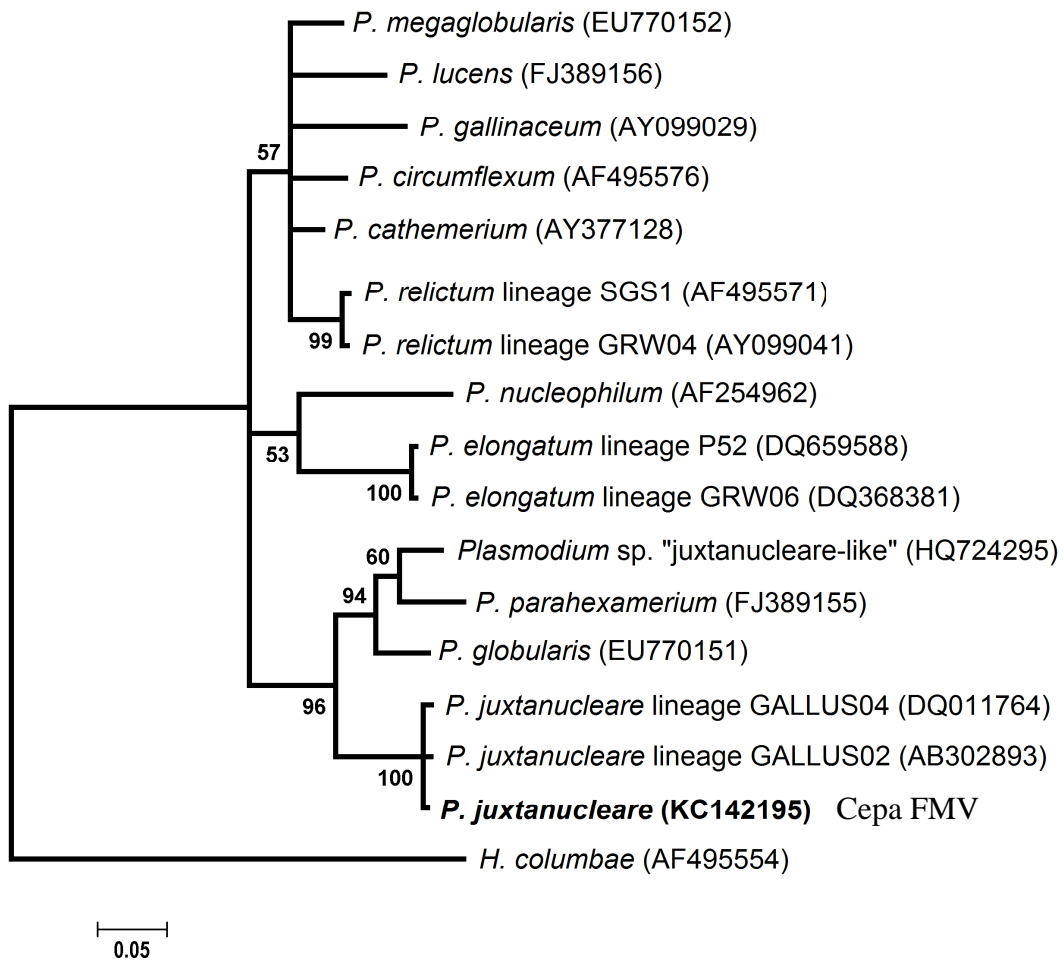
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Sequenciamento e análise filogenética do isolado de *Plasmodium juxtannucleare*

Entre 20 galinhas analisadas na fazenda Mourão Vermelho, cinco apresentaram formas intraeritrocíticas compatíveis com *P. juxtannucleare* ao exame microscópico. Foram observados trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos, embora a parasitemia tenha se apresentado baixa (menos de 1%). O resultado da PCR foi positivo para *Plasmodium* sp. A análise de sequenciamento do *cit b* das sequencias recuperadas a partir destas cinco galinhas revelou que as sequencias eram idênticas e compatíveis com as linhagens de *P. juxtannucleare* depositadas anteriormente no GenBank. A cepa foi denominada de FMV. Após estes resultados, uma destas cinco galinhas foi adquirida junto à fazenda para a realização dos experimentos laboratoriais. As amostras deste isolado encontram-se criopreservadas no Laboratório de Malária, UFMG.



A árvore filogenética obtida por inferência Bayesiana revelou que duas sequências de *P. juxtannucleare* (*cit-b*) previamente depositadas no GenBank e no MalAvi apresentavam-se relacionadas e constituíam um clado bem suportado com a linhagem de *P. juxtannucleare* encontrada neste estudo (Figura 5). A linhagem GALLUS01 de *P. gallinaceum* presente no GenBank apresentou-se em um clado distinto de *P. juxtannucleare* refletindo a classificação destas duas espécies de *Plasmodium* em dois subgrupos diferentes. A linhagem de *P. juxtannucleare* encontrada neste estudo é diferente em um único nucleotídeo das linhagens de *P. juxtannucleare* previamente depositadas no GenBank: GALLUS02 (recuperada em faisão-branco, *Crossoptilum crossoptilum*, no Japão) e GALLUS04 (recuperada em galinhas, no Brasil). A linhagem identificada como "P. juxtannucleare-like" (números de acessos: HQ724295 e HQ724297), recuperada por Pacheco et al. (2011) a partir de duas codornas (*Colinus virginianus*) e de um corvo (*Corvus corax*) nos Estados Unidos, apareceram em um clado distinto das sequências de *P. juxtannucleare* depositadas previamente no GenBank e mostraram divergência de 5,6% a partir da sequência de *P. juxtannucleare* descrita neste estudo.

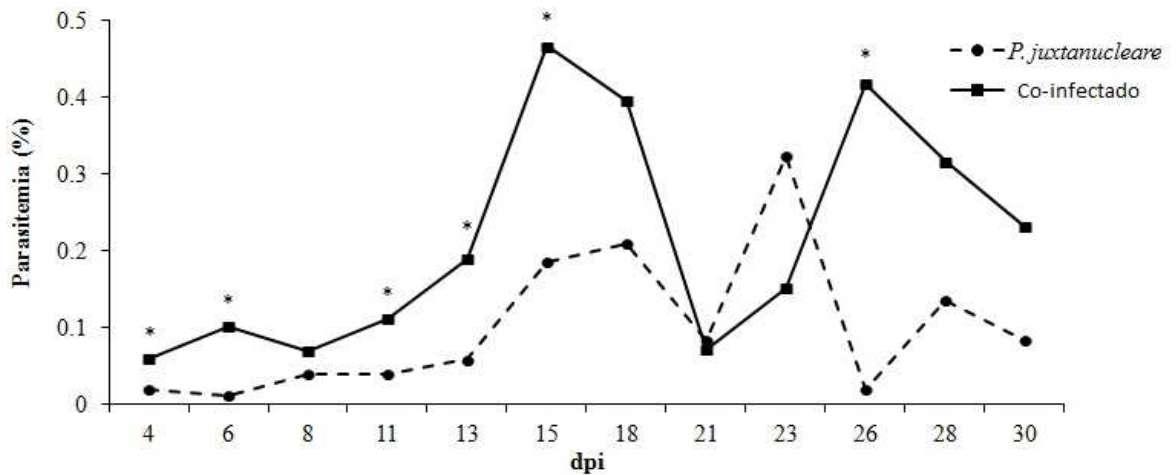


**Figura 5. Cladograma representando as relações filogenéticas entre as espécies de *Plasmodium* utilizando sequencias parciais do gene mitocondrial Citocromo b por meio de inferência Bayesiana. A linhagem de *P. juxtannucleare* sequenciada neste estudo está destacada com uma seta. Números de acesso do GenBank estão entre parêntesis. Os valores próximos aos nós correspondem aos valores percentuais de probabilidade posterior.**

## **5.2 Determinação da parasitemia nos pintinhos co-infectados e no grupo *P. juxtannucleare***

No 4ºdpi por *P. juxtannucleare*, primeira coleta realizada após a infecção experimental, foram observados trofozoítos do parasito nas hemácias das aves dos grupos co-infectado e *P. juxtannucleare*. Em ambos os grupos as formas intraeritrocíticas do tipo trofozoíto foram as mais frequentemente observadas (85%) no exame microscópico dos esfregaços sanguíneos ao longo do experimento. Enquanto, as hemácias contendo merontes (10%) e gametócitos (5%) foram observadas de forma escassa. O parasito foi observado no interior de eritrócitos maduros nos dois grupos, entretanto, no grupo co-infectado observou-se também o parasitismo de hemácias jovens e poliparasitismo.

A infecção por *P. juxtannucleare* nos dois grupos infectados caracterizou-se por apresentar baixa parasitemia ao longo do período de observação (Figura 6). No grupo co-infectado a média de parasitemia foi significativamente maior quando comparada ao grupo *P. juxtannucleare* ( $P < 0,05$ ). No grupo co-infectado foram observados dois picos de parasitemia. O primeiro pico foi observado próximo ao 15ºdpi e o valor médio de parasitemia registrado neste período foi de 0,47%. Um segundo pico de parasitemia neste grupo ocorreu no 26ºdpi, observando-se o valor médio de parasitemia de 0,42%. No grupo *P. juxtannucleare* ocorreram dois períodos em que foi observada elevação da parasitemia, entretanto o pico de parasitemia não foi evidente. A média de parasitemia mais alta detectada neste grupo ocorreu no 23º dpi (0,33%).



**Figura 6.** Valor médio de parasitemia (N=6) por *Plasmodium juxtannucleare* presente em esfregaços sanguíneos de pintinhos SPF dos grupos *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*) e co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa-CAV), avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi). \* diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 3, além dos valores médios é possível observar os valores mínimo e máximo detectados em indivíduos de cada grupo.

**Tabela 3. Parasitemia (média±desvio padrão; valor máximo e mínimo) obtida em pintinhos SPF, no grupo infectado por *Plasmodium juxtancleare* e co-infectado por *Plasmodium juxtancleare* e Vírus da anemia infecciosa (CAV) ao longo das coletas, de acordo com os dias pós-inoculação.**

DPI	Parasitemia (%)						<i>p</i> -valor
	<i>P. juxtancleare</i>	Máximo	Mínimo	Co-infectado	Máximo	Mínimo	
4	0,02±0,01**	0,02	0	0,06±0,03	0,12	0,04	0,03*
6	0,01±0,07	0,06	0	0,12±0,05	0,2	0,02	0,01*
8	0,04±0,01	0,05	0,02	0,07±0,03	0,13	0,04	0,03*
11	0,04±0,03	0,1	0	0,12±0,04	0,17	0,05	0,01*
13	0,06±0,02	0,08	0,03	0,19±0,04	0,24	0,14	0,01*
15	0,18±0,1	0,8	0,04	0,47±0,3	2	0,12	0,03*
18	0,21±0,3	1	0,02	0,4±0,7	2	0,01	0,87
21	0,08±0,02	0,1	0,05	0,07±0,06	0,2	0,03	0,10
23	0,33±0,6	1,6	0,01	0,16±0,1	0,4	0,02	0,63
26	0,02±0,01	0,04	0	0,42±0,7	2	0,02	0,01*
28	0,13±0,1	0,3	0	0,32±0,5	1,52	0,04	0,63
30	0,08±0,01	0,1	0,06	0,24±0,37	1	0,02	0,57

DPI: Dias pós-inoculação

\*diferença significativa detectada pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

\*\*média para 6 replicações±desvio padrão

### 5.3 Diagnóstico molecular e sorológico do Vírus da anemia infecciosa das galinhas

As amostras de DNA das aves que receberam o inóculo viral (CAV e co-infectado), analisadas 14 dias após a inoculação do CAV, apresentaram PCR positiva, enquanto as aves do grupo controle e *P. juxtancleare* apresentaram PCR negativas.

As aves dos grupos co-infectado e CAV apresentaram anticorpos contra o vírus da anemia infecciosa das galinhas 28 dias após a inoculação de CAV. Enquanto as aves do grupo controle e do grupo *P. juxtannucleare* encontraram-se não reagentes para o teste.

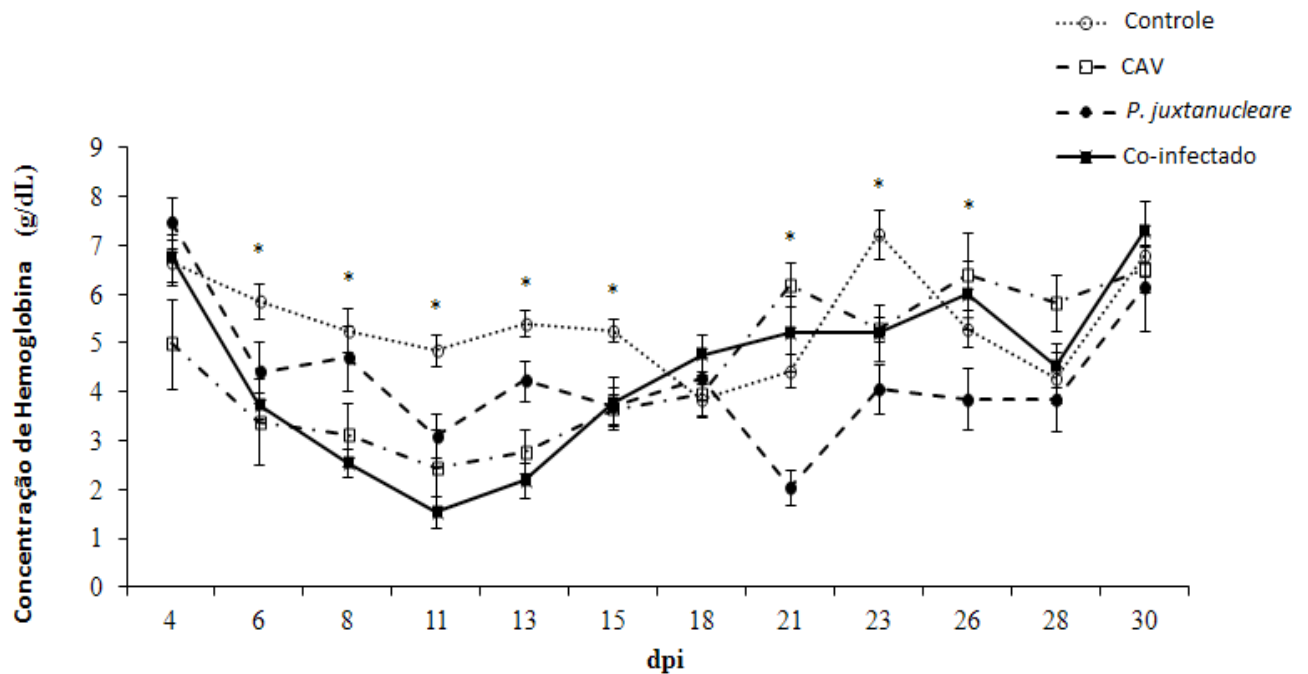
#### **5.4 Variáveis hematológicas em pintinhos imunossuprimidos pelo CAV e infectados por *P. juxtannucleare***

Os valores de concentração de hemoglobina, hematócrito e a contagem do número de eritrócitos obtidos nas aves do grupo controle foram considerados como os valores de referencia normal. Uma vez que a determinação destas variáveis em aves pode ser influenciada pela idade, tipo de linhagem, sexo, hormônios, hipóxia, fatores ambientais e doenças (Campbell 1995; Thrall 2007).

Os valores médios de hemoglobina obtidos em cada grupo foram comparados de acordo com os dias após-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) e podem ser observados na figura 7. Os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle ao longo do experimento, considerados como referencia normal para a concentração de hemoglobina, foram de 3,8 e 7,2 g/dL. O grupo co-infectado apresentou os valores médios de hemoglobina significativamente mais baixos quando comparado às médias obtidas nos grupos controle e *P. juxtannucleare*. As menores médias foram registradas no 11° e 13° dpi, ( $p < 0,02$ , respectivamente). Não foram detectadas diferenças significativas entre as médias de hemoglobina observadas nos grupos co-infectado e grupo CAV ( $p > 0,05$ ). Embora, seja importante mencionar que o valor de hemoglobina detectado no grupo co-infectado, no 11°dpi, tenha se mostrado abaixo dos valores registrados para o grupo CAV e grupo controle. O grupo co-infectado apresentou valores médios de hemoglobina significativamente menores quando comparados ao grupo controle nos seguintes dpi: 6°, 8°, 11°, 13° e 15° ( $p = 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p = 0,02$ , respectivamente).

O grupo *P. juxtannucleare* apresentou nos 11°, 15° e 21°dpi a hemoglobina significativamente menor quando comparada as médias observadas no grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p = 0,02$ , respectivamente). Sendo que no 21°dpi, o grupo *P.*

*juxtannucleare* apresentou o valor médio de hemoglobina mais baixo quando comparado aos grupos co-infectado e CAV ( $p<0,01$ ;  $p<0,02$ ).

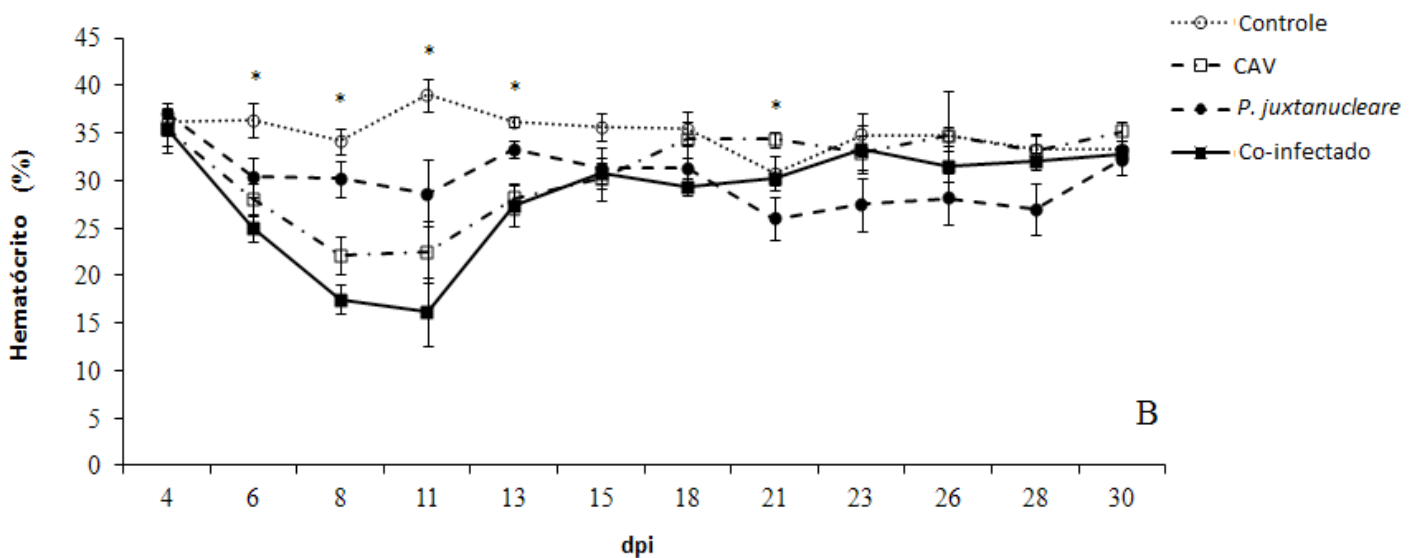


**Figura 7. Valores médios da concentração de hemoglobina g/dL (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p<0,05$ ).**

Os valores médios de hematócrito apresentados em cada grupo ao longo das observações podem ser analisados na figura 8. O valor mínimo e máximo obtido no grupo controle e considerado como valor de referencia normal para o hematócrito neste estudo foi de 31-39%. No grupo co-infectado, a diminuição nos valores do hematócrito foi evidenciada a partir do 6ºdpi, atingindo valores ainda mais baixos no 8º e 11ºdpi. Quando comparado ao grupo controle, o grupo co-infectado apresentou

hematócrito significativamente menor nos seguintes dpi: 6°, 8, 11° e 13° ( $p \leq 0,01$ ). No período de 8° e 11°dpi, o hematócrito do grupo co-infectado foi significativamente menor quando comparados aos valores obtidos no *P. juxtannucleare* ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). Sendo que no 11°dpi o hematócrito observado no grupo co-infectado também foi significativamente menor quando comparado ao observado no grupo CAV ( $p = 0,02$ ).

No 21°dpi o grupo *P. juxtannucleare* apresentou hematócrito significativamente menor quando comparado aos valores detectados no grupo controle e grupos co-infectado e CAV ( $p \leq 0,01$ ).

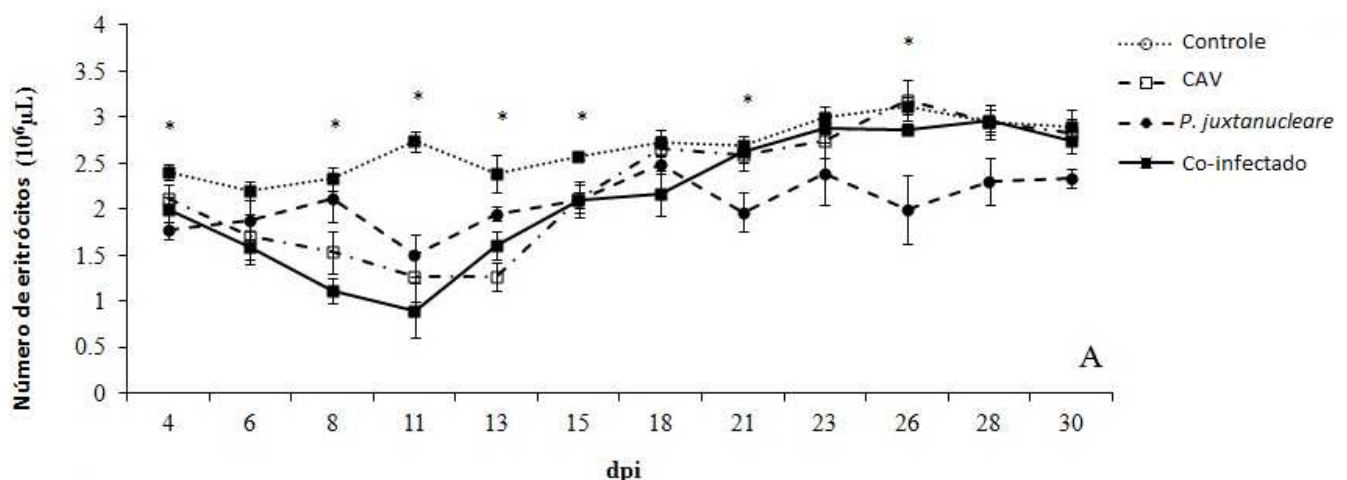


**Figura 8.** Valores médios de hematócrito (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



A contagem de eritrócitos obtida em cada um dos grupos foi comparada de acordo com o dpi, conforme pode ser observado na figura 9. O valor mínimo e máximo considerado como valor de referencia normal para a contagem de eritrócitos no grupo controle foi de 2,2 e 3,1 ( $10^6/\mu\text{L}$ ). O grupo co-infectado apresentou os menores valores associados ao total de eritrócitos durante o período de observação. A contagem de eritrócitos no grupo co-infectado foi significativamente menor quando comparado aos valores observados no grupo controle nos seguintes dpi: 4°, 8°, 11°, 13° e 15° ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p = 0,03$ ). A contagem de eritrócitos no grupo co-infectado também foi menor no 8° e 11° dpi quando comparada a contagem obtida no grupo *P. juxtannucleare* ( $p < 0,01$ ).

No grupo *P. juxtannucleare*, a contagem de eritrócitos foi significativamente menor quando comparada aos valores observados no grupo controle nos seguintes dias após-inoculação: 4°, 11°, 15°, 21° e 26° ( $p < 0,01$ ;  $p = 0,02$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente). Além da diminuição do número de eritrócitos quando comparado



ao controle, no 21° dpi o grupo *P. juxtannucleare* também apresentou número de eritrócitos significativamente menor quando comparado à contagem observada nos grupos co-infectado e CAV ( $p < 0,01$ ).

**Figura 9.** Valores médios da contagem de eritrócitos (média±erro padrão) em pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da

**anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).**

## **5.5 Caracterização do tipo de Anemia:**

A anemia foi detectada nos grupos CAV, *P. juxtannucleare* e co-infectado. O critério para a determinação foi à presença do hematócrito ou da concentração de hemoglobina (ou ambos) abaixo dos valores observados no grupo controle, utilizados como referência. Para classificar o tipo de anemia foram utilizados os índices hematimétricos referentes ao volume corpuscular médio (VCM) e à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os valores de VCM observados no grupo controle e utilizados como referência foram 123-148 fL. Os valores de referência observados no grupo controle (11-20%).

O grupo co-infectado apresentou anemia severa, detectada principalmente nos 8° e 11°dpi. Os índices de VCM determinados neste período, apresentaram valores acima da referência, indicando anemia macrocítica (193 e 171fL), enquanto os índices de CHCM determinados neste período indicaram normocromia (14,8 e 11,7%).

O grupo *P. juxtannucleare* apresentou no 21°dpi, período em que a anemia foi detectada, valor de VCM normal indicando anemia normocítica (134fL). O índice de CHCM, neste período, foi observado abaixo do valor mínimo de referência, indicando hipocromia (7,8%).

No período de 15 e 18 dias após-inoculação do CAV, o grupo CAV apresentou VCM acima do valor de referência, caracterizando a anemia macrocítica (151 e 194fL) enquanto, os índices de CHCM neste período indicaram tendência a hipocromia (13,4 e 9,6%).

## **5.6 Proteínas Totais**

Os valores referentes à concentração de proteínas plasmáticas totais nos grupos foram avaliados comparativamente e podem ser observados na tabela 4. Os

valores médios (mínimo e máximo) observados no grupo controle e utilizados como referencia foram 2,9-4,1(g/dL), respectivamente.

A concentração de proteínas plasmáticas nos grupos *P. juxtancleare*, CAV e co-infectado manteve-se dentro dos valores de referencia mínimo e máximo observados no grupo controle. A comparação estatística entre os grupos detectou diferenças significativas entre as avaliações ao longo do experimento, entretanto estes valores foram biologicamente aceitáveis e compatíveis com os valores de referencia.

**Tabela 4. Valores médios da concentração de proteína plasmática (g/dL) (média±desvio padrão) obtidos em pintinhos SPF, nos grupos: co-infectado, infectado exclusivamente por *Plasmodium juxtancleare* ou pelo Vírus da anemia infecciosa (CAV) e controle.**

Proteínas Totais (g/dL)					
Grupos					
DPI	<i>P. juxtancleare</i>	Co-infectado	CAV	Controle	<i>p-valor</i>
4	4,1±0,2	3,3±0,3	3,4±0,2	3,8±0,4	0,01*
6	3,3±0,3	3,1±0,2	3,6±0,4	4,1±0,9	0,02*
8	3,9±0,3	3,2±0,5	3,9±0,3	3,8±0,2	0,04*
11	3,7±0,4	3,7±0,7	3,7±0,4	4,1±11	0,95
13	4,1±0,5	3,4±0,4	4,1±0,4	3,8±0,2	0,11
15	3,9±0,3	3,7±0,4	4,1±0,4	3,5±0,3	0,01*
18	3,6±0,3	3,5±0,4	3,5±0,4	3,4±0,3	0,68
21	3,4±0,3	3,6±0,5	3,8±0,4	3,1±0,4	0,07
23	3,5±0,1	3,6±0,3	3,3±0,3	3,8±0,2	0,01*
26	3,6±0,7	3,8±0,3	3,4±0,3	2,9±0,1	0,01*
28	3,5±0	3,7±0,2	3,5±0,5	3,1±0,3	0,11
30	3,5±0,1	3,5±0,3	3,1±0,2	3,6±0,1	0,01*

\* diferença significativa observada ao comparar os quatro grupos experimentais (Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keus,  $p < 0,05$ );

DPI: dias pós-inoculação por *Plasmodium juxtancleare*.

## 5.7 Concentração de glicose

Os valores médios referentes à concentração de glicose podem se observados comparativamente na tabela 5. Os valores mínimo e máximo observados no grupo controle foram utilizados como referencia: 247-300 (g/dL).

O grupo co-infectado apresentou alterações nos valores médios de concentração de glicose quando comparado à determinação da glicose no grupo controle. As alterações detectadas foram pouco expressivas e sem significância estatística ( $p>0,05$ ), com exceção do 4ºdpi. No 4ºdpi a determinação da glicose no grupo co-infectado indicou que a concentração estava acima do valor de referencia e significativamente maior quando comparada com ao grupo controle ( $p<0,04$ ). O grupo *P. juxtannucleare* apresentou a concentração de glicose abaixo do valor mínimo de referencia somente no 6ºdpi ( $p>0,05$ ). Nas demais observações não foram detectadas alterações na concentração de glicose quando comparados aos demais grupos.

**Tabela 5. Concentração de glicose mg/dL (média±desvio padrão) obtida em pintinhos SPF, nos grupos: infectado por *Plasmodium juxtannucleare*, co-infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e pelo Vírus da anemia infecciosa, infectado pelo Vírus da anemia infecciosa (CAV) e controle.**

DPI	Glicose mg/dL				<i>p</i> -valor
	<i>P. juxtannucleare</i>	Co-infectado	CAV	Controle	
4	265,3±35	392,2±90	286±44	273,6±58	0,04*
6	237,2±45	225,1±86	313±90	297,6±78	0,24
11	277,5±40	318±76	301,8±62	300,7±71	0,92
13	291±64	277,7±54	256,7±15	254,5±23	0,81
21	304,8±27	266,5±4	288,1±59	252±23	0,19
23	286,8±52	269,7±56	248,7±10	288,7±63	0,29
26	235±20	244,3±23	243,1±9	247,8±16	0,71
28	270,2±27	270,5±34	266±39	278±31	0,87

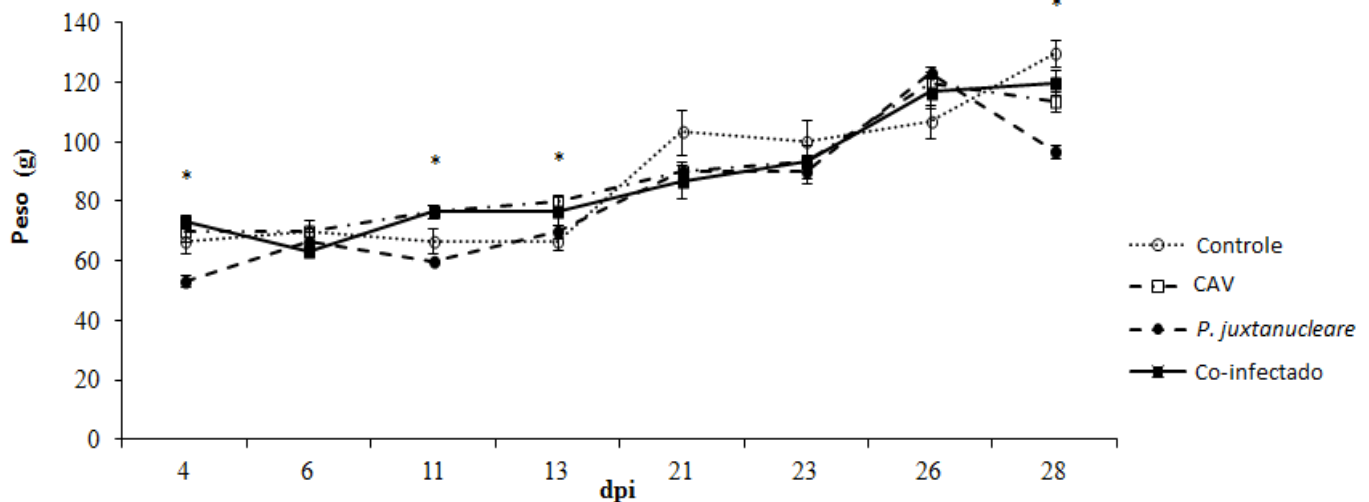
\* diferença significativa observada ao comparar os quatro grupos experimentais (Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keus,  $p<0,05$ ); DPI: dias pós-inoculação por *Plasmodium juxtannucleare*.

## 5.8 Parâmetros clínicos: peso e temperatura corporal

Os valores médios de peso dos indivíduos dos grupos *P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado foram avaliados comparativamente aos valores encontrados no grupo controle (Figura10).

Os grupos co-infectado e CAV apresentaram valores médios de peso semelhantes aos valores observados no grupo controle ( $p>0,05$ ).

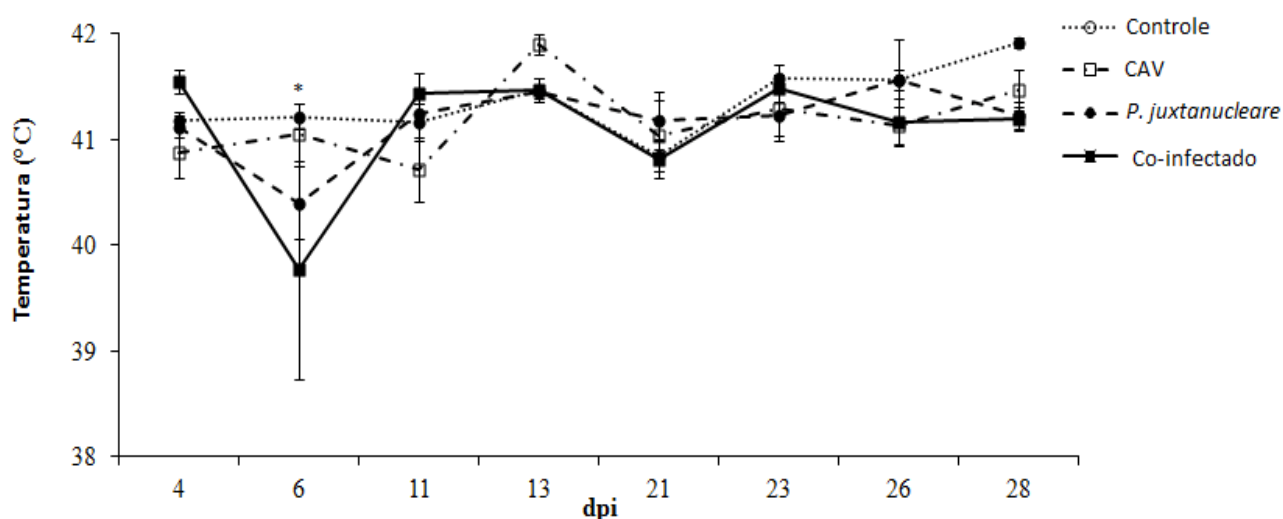
O grupo *P. juxtannucleare* apresentou média de peso inferior ao registrado para o grupo controle nos 4°, 11°, 13° e 28°dpi ( $p<0,05$ ).



**Figura 10.** Valores médios do peso corporal/g de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p<0,05$ ).

Os valores médios de temperatura corporal nos grupos *P. juxtannucleare* ou CAV e co-infectado podem ser observados comparativamente ao grupo controle na figura 11. A temperatura obtida no grupo controle foi utilizada como parâmetro de referência mínimo e máximo: 40,8 e 41,9°C.

O grupo co-infectado, no 6ºdpi apresentou valor médio de temperatura abaixo da referência e significativamente menor quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Os grupos *P. juxtannucleare* e CAV apresentaram valor médio de temperatura dentro dos valores admitidos como referência.



**Figura 11.** Valores médios de temperatura corporal °C de pintinhos SPF, nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

## 5.9 Mortalidade, alterações macroscópicas e microscópicas

No grupo co-infectado, a mortalidade foi mais elevada e detectada precocemente (11ºdpi) a mortalidade observada nos grupos CAV e *P. juxtannucleare* (Figura 12,  $p=0,03$ ). No grupo controle não foi observada mortalidade.

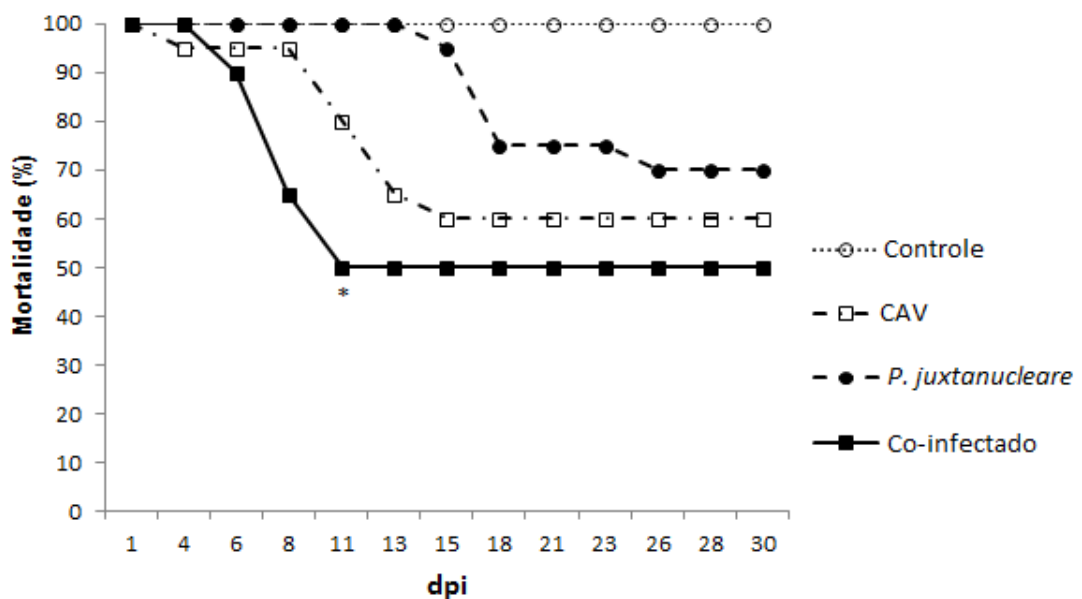


Figura 12. Mortalidade observada nos pintinhos dos grupos *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado por CAV) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias.\* diferenças significativas ( $p<0,05$ ). \* indica diferença significativa entre Co-infectado e os outros grupos de acordo com o Log-Rank test (N=20).

Os sinais clínicos foram observados com maior intensidade no grupo co-infectado quando comparado aos demais grupos. No 7ºdpi (15ºdpi pelo CAV) o grupo co-infectado apresentou sinais de apatia, palidez, penas arrepiadas e diarreia

esverdeada. No grupo *P. juxtannucleare* as aves apresentaram penas arrepiadas e diarreia ao 14ºdpi. O grupo CAV apresentou palidez e penas arrepiadas; estes sinais foram menos intensos quando comparados ao grupo co-infectado e evidenciados principalmente 15º após a infecção pelo CAV.

Por meio do exame macroscópico dos indivíduos que morreram e daqueles eutanaziados, foi possível observar de forma comparativa ao exame do grupo controle, alterações macroscópicas nos grupos co-infectado, infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare* ou pelo CAV (Figura 13).

No grupo co-infectado as lesões foram observadas previamente ao surgimento das lesões nos outros grupos. As alterações em cada órgão relacionadas a alterações de tamanho podem ser observadas na tabela 6. Os três grupos inoculados apresentaram quadro de palidez de órgãos quando comparados ao grupo controle. No grupo co-infectado, foram observadas alterações moderadas associadas ao tamanho do baço e do fígado. Além disto, os indivíduos deste grupo apresentaram sufusões e petéquias no coração, observadas a partir do 7º e prosseguindo até o 21ºdpi (Figura 13). No 21º e 28ºdpi as lesões apresentaram-se mais intensas, observando-se hemorragias na serosa do fígado, aumento dos rins e a diminuição moderada do timo e da bolsa cloacal.

No grupo *P. juxtannucleare* foram observadas principalmente alterações cardíacas, no fígado e no baço. No 7ºdpi, observou-se o aumento moderado do baço e do timo, sendo que no 14ºdpi a hepatomegalia tornou-se mais evidente. Neste período, o timo e a bolsa cloacal apresentaram leve diminuição. No 21ºdpi foi observado o aumento intenso do baço e do fígado e aumento moderado dos rins; além disto, a diminuição moderada da bolsa cloacal e do timo foi observada. No dia 28ºdpi o baço, o fígado e os rins permaneceram aumentados e no coração foi observada a presença de hidropericárdio.

No grupo CAV as alterações observadas durante a necropsia ocorreram principalmente 15 dias após a inoculação do CAV. Houve intensa diminuição no tamanho dos órgãos linfoides: bolsa cloacal, timo e baço; a presença de sufusões e petéquias no coração foi observada com menor frequência quando comparadas aos indivíduos co-infectados. Além disto, detectaram-se focos hemorrágicos em diferentes órgãos e na musculatura esquelética.



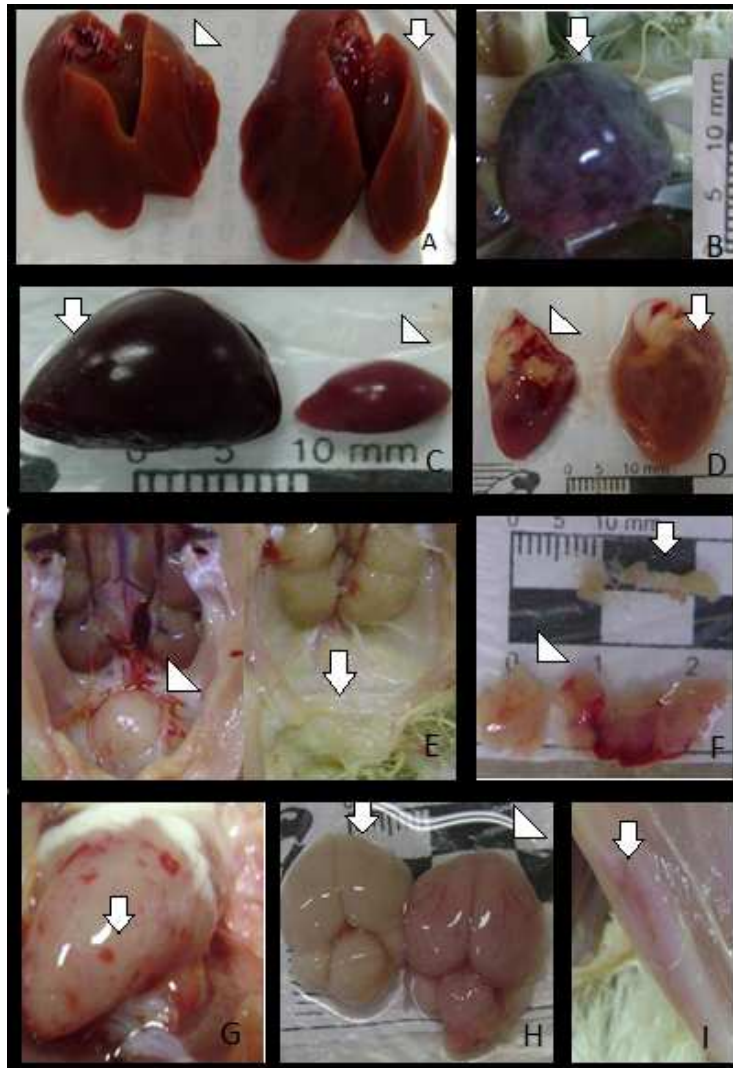


Figura 13. Lesões macroscópicas em pintinhos infectados observadas comparativamente ao grupo controle durante a necropsia de indivíduos dos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV), CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) e controle (não infectados) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias. As cabeças das setas indicam o grupo controle e as setas os grupos infectados. A. aumento de fígado em pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*; B. pigmentos pretos no baço de pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*; C: aumento do baço de pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*; D: aumento do coração e presença de

hidropericárdio em pintinho infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*; E: diminuição acentuada da bursa de Fabricius em pintinho infectado exclusivamente por CAV; F: diminuição acentuada do timo em pintinho infectado exclusivamente por CAV; G: sufusões e petéquias no coração de pintinho co-infectado; H: palidez acentuada no encéfalo de pintinho co-infectado; I: hemorragia muscular em pintinho co-infectado.

**Tabela 6. Alterações macroscópicas observadas em diferentes órgãos durante a necropsia de aves pertencentes aos grupos: exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare* ou por CAV e co-infectado, observadas em comparação ao exame do grupo controle.**

Grupos	DPI	Coração	Fígado	Baço	Timo	Bursa de Fabricius
Co-infectado*	7	0	0	+1	-1	0
	14	0	+2	0	0	-2
	21	0	+2	+2	-1	-2
	28	0	0	+2	0	0
<i>P. juxtannucleare</i>	7	0	0	+1	-1	0
	14	0	+2	+2	-1	-1
	21	+2	+3	+3	0	-2
	28	+2	+3	+2	-2	-2
CAV	7	0	0	-3	-3	-3
	14	+2	+2	-3	-3	-3
	21	+1	+1	-2	-3	-1
	28	0	0	-2	-1	0

DPI: dias após a inoculação com *P. juxtannucleare*

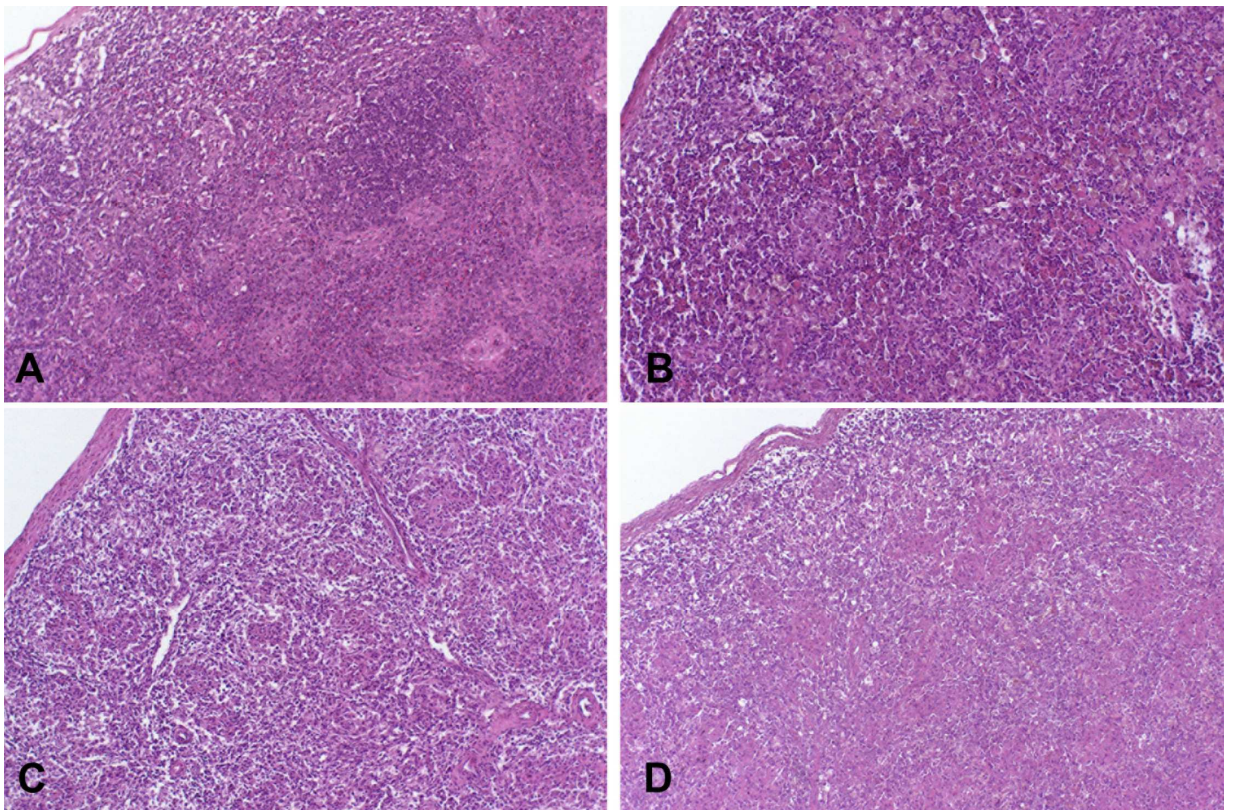
Similar com o grupo controle: normal 0

Aumento de tamanho comparado com o grupo controle: leve +1; moderado +2; grave +3;

Diminuição de tamanho comparado com o grupo controle: leve -1; moderado -2; grave -3.

\*Análise realizada de forma comparativa ao exame do grupo controle.

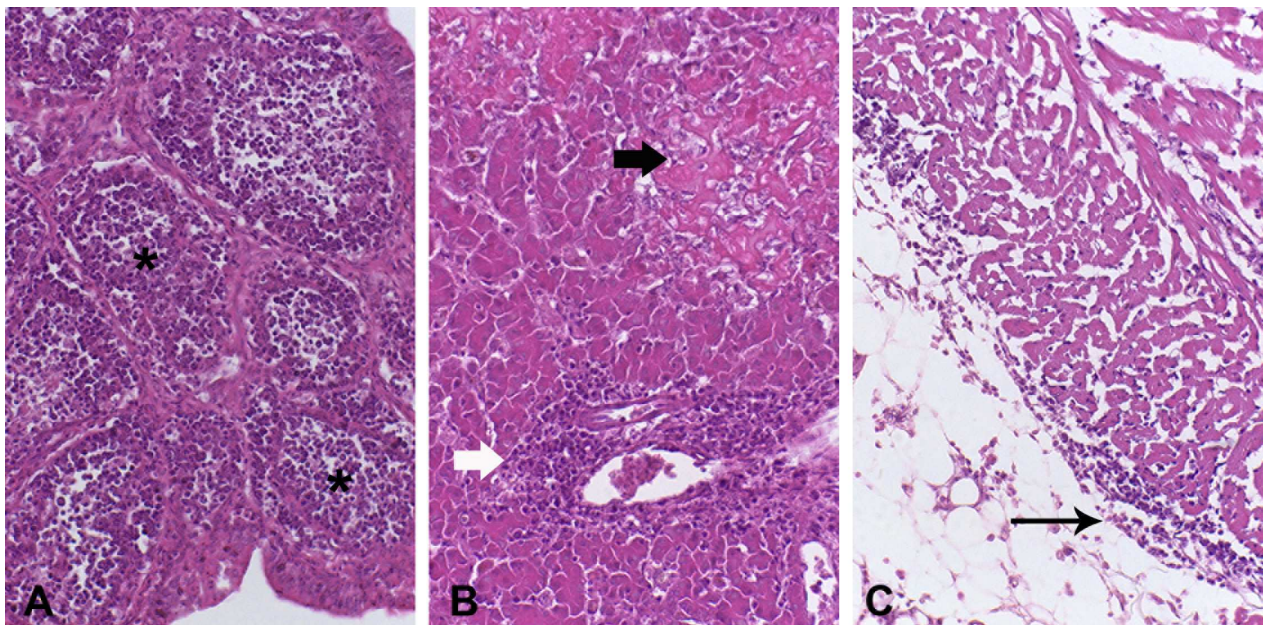
A avaliação histológica confirmou as alterações macroscópicas observadas de forma comparativa ao exame do grupo controle (Figura 14). Nos indivíduos dos grupos *P. juxtannucleare* e co-infectado observou-se no baço a hiperplasia da polpa vermelha com pigmentos amarronzados refrigentes (Figuras 14b e 14d). Nos indivíduos do grupo CAV e co-infectado observou-se depleção linfóide no baço (Figuras 14c e 14d).



**Figura 14. Alterações de celularidade no baço observadas em indivíduos infectados. A. Baço normal, grupo controle; B. aumento de celularidade da polpa vermelha com a deposição de pigmento amarronzado refrigente no grupo infectado por *P. juxtannucleare*. C. diminuição da celularidade da polpa branca com acentuada depleção linfóide no grupo infectado somente pelo CAV; D. leve aumento de celularidade da polpa vermelha e moderada depleção linfóide no grupo co-infectado; HE, 200x.**



Os indivíduos dos grupos CAV e co-infectado apresentaram depleção linfóide da bursa de Fabricius e do timo, no entanto a depleção foi mais acentuada nos indivíduos do grupo CAV. No grupo co-infectado detectou-se moderada redução dos folículos da bursa de Fabricius com depleção de linfócitos (Figura 15a). Nos três grupos infectados observaram-se leve hepatite e pericardite linfocítica multifocal, entretanto nos grupos co-infectado e *P. juxtannucleare* as lesões foram classificadas como moderadas e mais evidentes (Figuras, 15b e 15c).



**Figura 15. Alterações histopatológicas em diferentes tecidos observadas em pintinhos co-infectados. A. atrofia da bursa de Fabricius; redução moderada de folículos com depleção de linfócitos (asteriscos); HE, 400x. B. Hepatite multifocal moderada; infiltrado mononuclear (seta branca) portal moderado associado com áreas de necrose (seta preta). HE, 400x. C. pericardite multifocal linfoplasmocítica moderada (seta estreita). HE, 200x.**

## 5.10 Resposta imunológica celular

## 5.11 Parasitemia

No 2ºdpi por *Plasmodium juxtannucleare*, primeira coleta realizada após a infecção experimental, foram observados trofozoítos do parasito nas hemácias das aves do grupo co-infectado. A infecção tanto no grupo co-infectado quanto no grupo *P. juxtannucleare* caracterizou-se por apresentar baixa parasitemia ao longo do período de observação (Figura 16). No grupo co-infectado a média de parasitemia foi significativamente maior nos 2º e 7ºdpi quando comparada ao grupo infectado *P. juxtannucleare* ( $p < 0,05$ ).

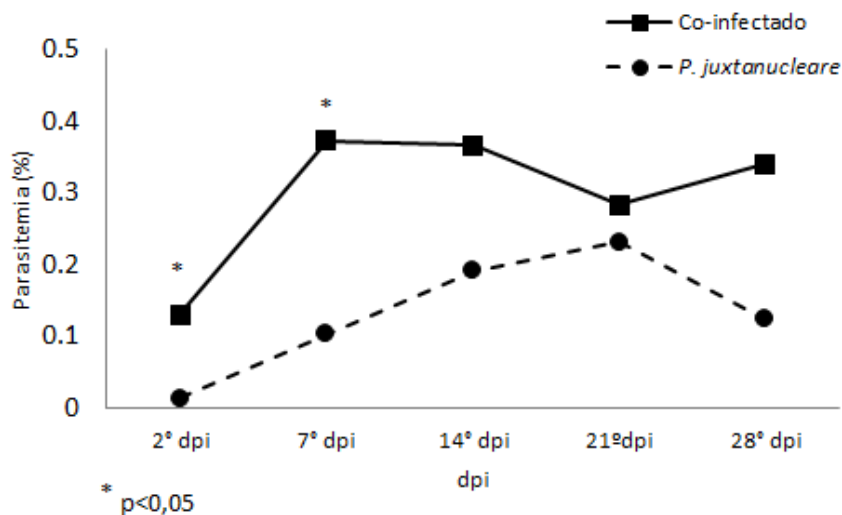
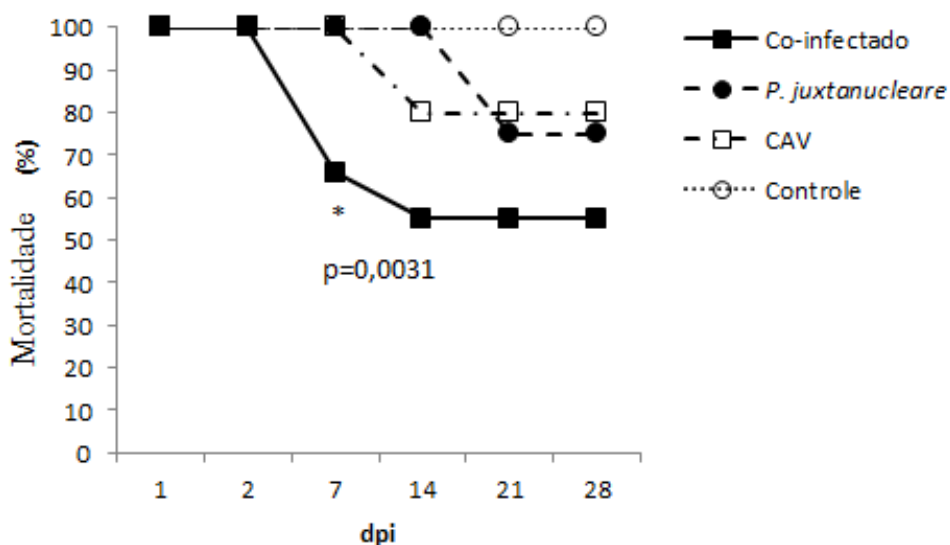


Figura 16. Valor médio de parasitemia (N=6) por *Plasmodium juxtannucleare* presente em esfregaços sanguíneos de pintinhos SPF infectados dos grupos: *P. juxtannucleare* (aves exclusivamente infectadas por *P. juxtannucleare*) co-infectado (aves co-infectadas por *P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa das galinhas-CAV). As aves foram avaliadas de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi). A infecção experimental por CAV foi realizada sete dias antes da infecção por *P. juxtannucleare*; \* diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Assim como na primeira etapa do estudo, no grupo co-infectado, a mortalidade foi mais elevada e detectada precocemente (7° e 14°dpi) a mortalidade observada nos *P. juxtannucleare* e CAV (Figura17,  $p < 0,05$ ). Nos grupos CAV e *P. juxtannucleare*, a mortalidade foi menor e detectada após este período de observação. No grupo controle não houve mortalidade.



**Figura 17.** Mortalidade observada nos pintinhos dos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), co-infectado (*P. juxtannucleare* e vírus da anemia infecciosa- CAV) e CAV (exclusivamente infectado pelo CAV) avaliados de acordo com os dias pós-inoculação por *P. juxtannucleare* (dpi) ao longo de 30 dias. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre co-infectado e os demais grupos de acordo com o Log-Rank test (N=12).

As amostras de DNA obtidas a partir do sangue dos pintinhos, um dia após o nascimento, apresentaram-se negativas na PCR para o CAV. As amostras de DNA das aves que receberam o inóculo viral (CAV e co-infectado), coletadas 14 dias após a inoculação do CAV, apresentaram PCR positiva, enquanto as aves do grupo controle e infectado por *P. juxtannucleare* apresentaram PCR negativas. Os pintinhos

foram avaliados um dia após o nascimento e 28 dias após a inoculação do vírus, quanto à presença ou ausência de anticorpos contra o CAV. No primeiro dia após o nascimento as aves apresentaram-se não reagentes, indicando que não haviam entrado em contato com CAV. As aves presentes nos grupos co-infectado e CAV apresentaram anticorpos contra o vírus da anemia infecciosa das galinhas 28 dias após a inoculação viral. Enquanto as aves do grupo controle e *P. juxtannucleare* encontraram-se não reagentes ao teste.

### **5.12 Leucócitos totais:**

O número de leucócitos totais avaliado nos grupos *P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado foi comparado aos valores presentes no grupo controle de acordo com o período após-inoculação por *P. juxtannucleare*. Uma vez que o número de leucócitos em pintinhos pode apresentar alterações de acordo com a idade (Campbel 1995; Beirão et al. 2012).

O grupo *P. juxtannucleare* apresentou os maiores valores de leucócitos observados no estudo e estes valores foram significativamente maiores quando comparados ao grupo controle nos 2º, 7º, e 28ºdpi (Figura 18). O grupo CAV e co-infectado apresentaram os menores valores de leucócitos observados no estudo e significativamente menores quando comparados ao grupo controle nos 7º e 14ºdpi (Figura 18).

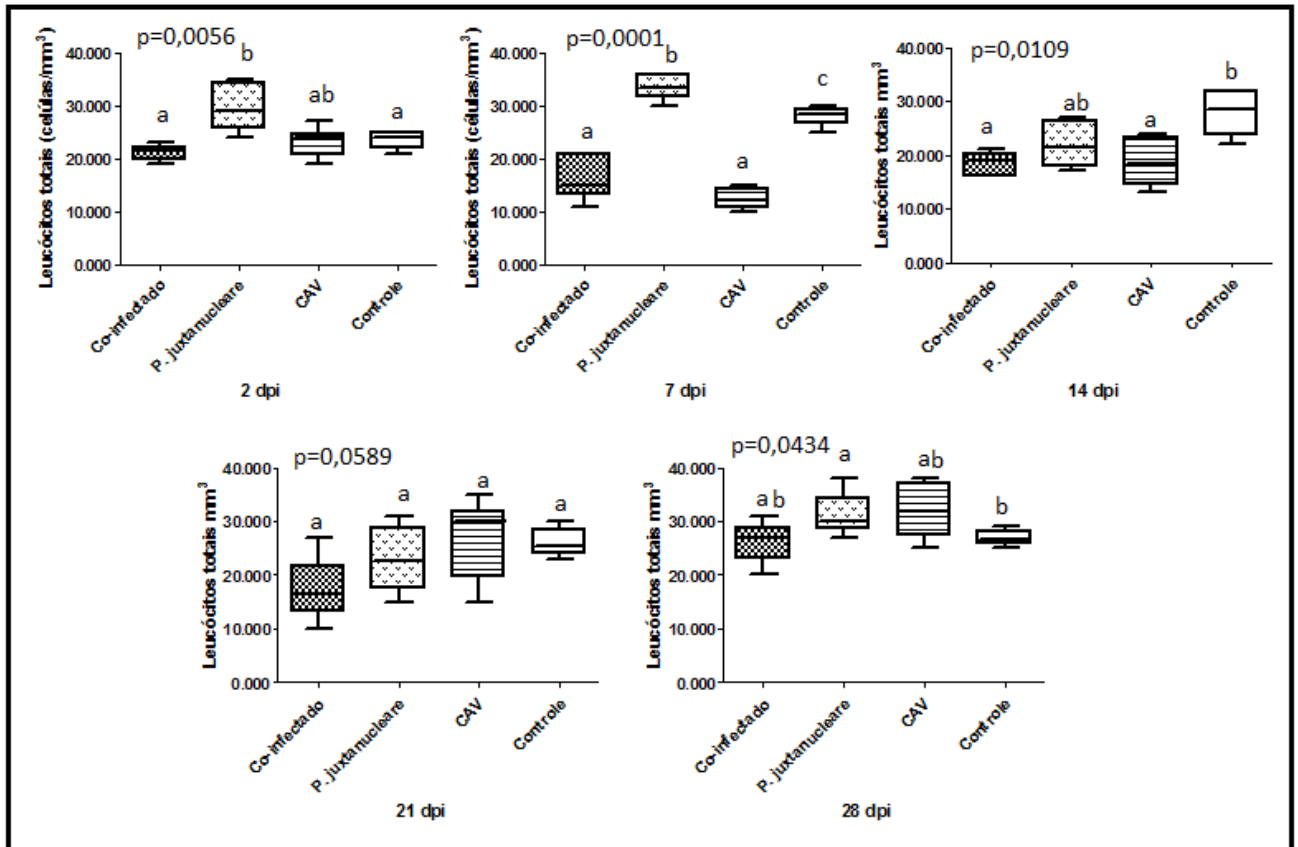
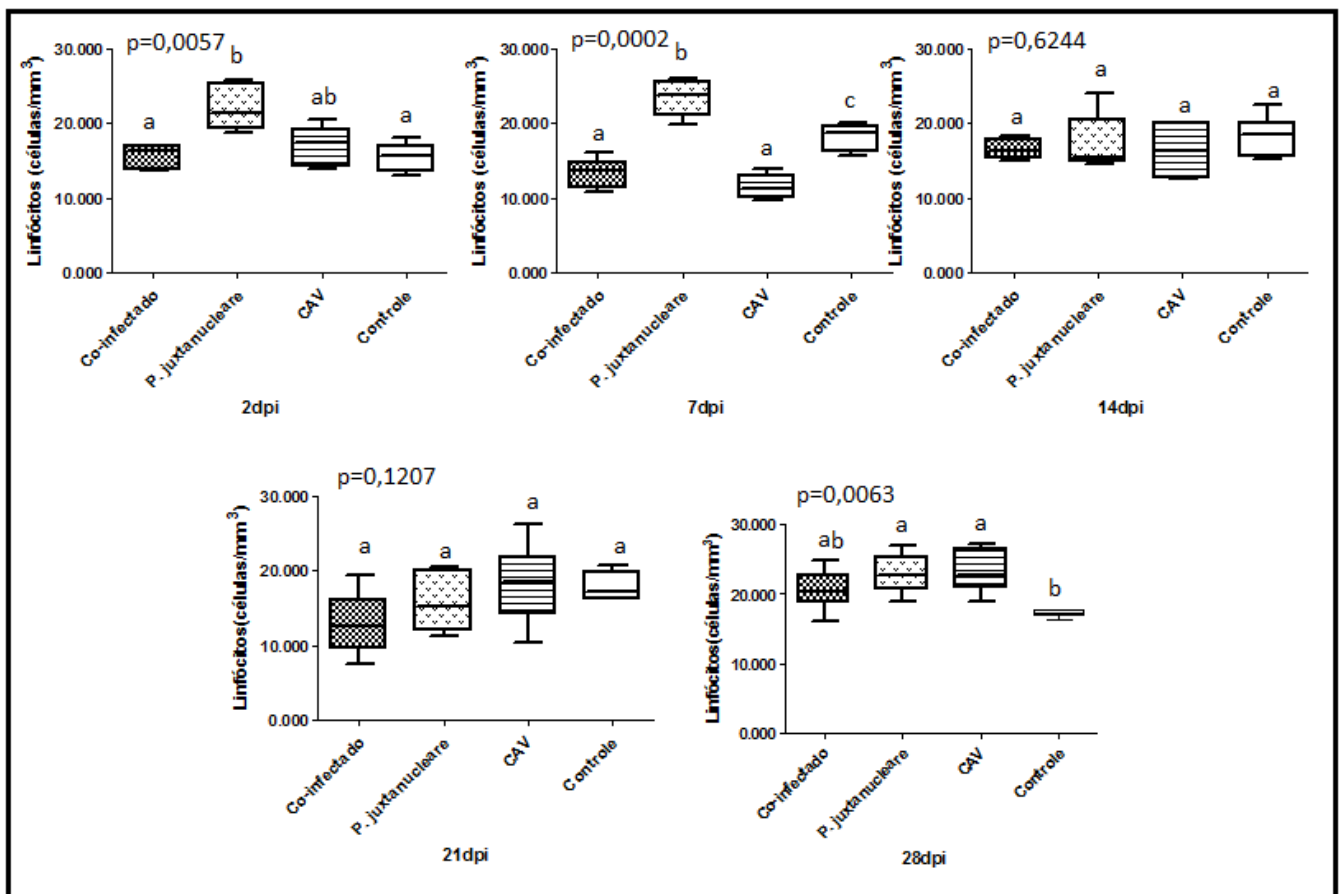


Figura 18. Número de leucócitos totais do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infetado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare* e CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente por *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção por CAV. \* <sup>a,b,c</sup> indicam diferença significativa (N=6) entre os grupos ( $p < 0,05$ )

Os valores absolutos de linfócitos observados nos grupos, CAV, *P. juxtannucleare* e co-infetado apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle. Os maiores valores absolutos de linfócitos foram observados no grupo *P. juxtannucleare* (Figura 19). Estes valores foram significativamente maiores quando comparados ao grupo controle nos 2°, 7° e 28° dpi ( $p < 0,05$ ). Os grupo CAV e co-infetado apresentaram os menores valores de linfócitos observados no estudo. Estes valores foram significativamente menores

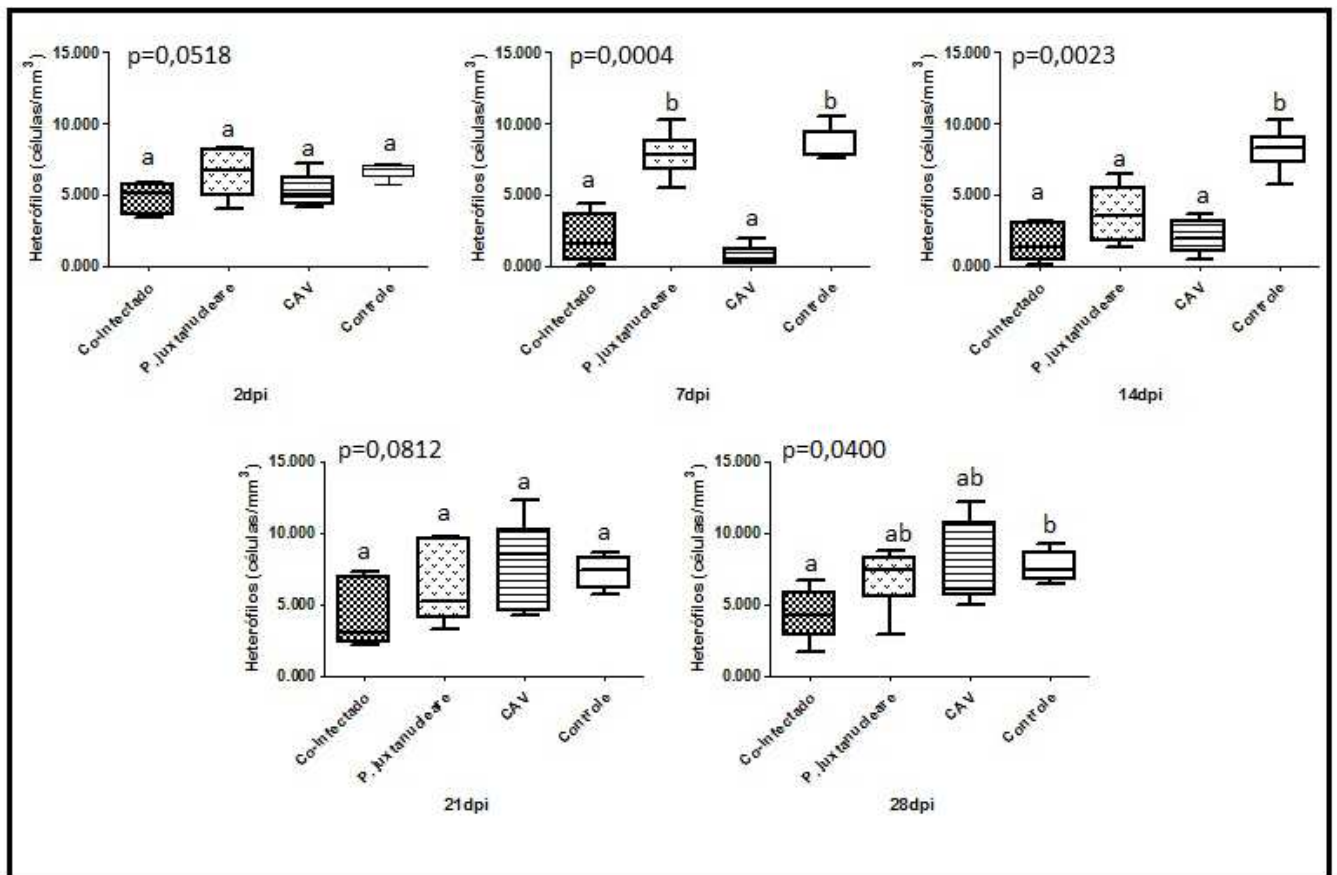


quando comparados ao grupo controle no 7ºdpi ( $p < 0,05$ ). No 28ºdpi (35 dias após a inoculação do CAV) o grupo CAV apresentou aumento do número de linfócitos, e este valor observado foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



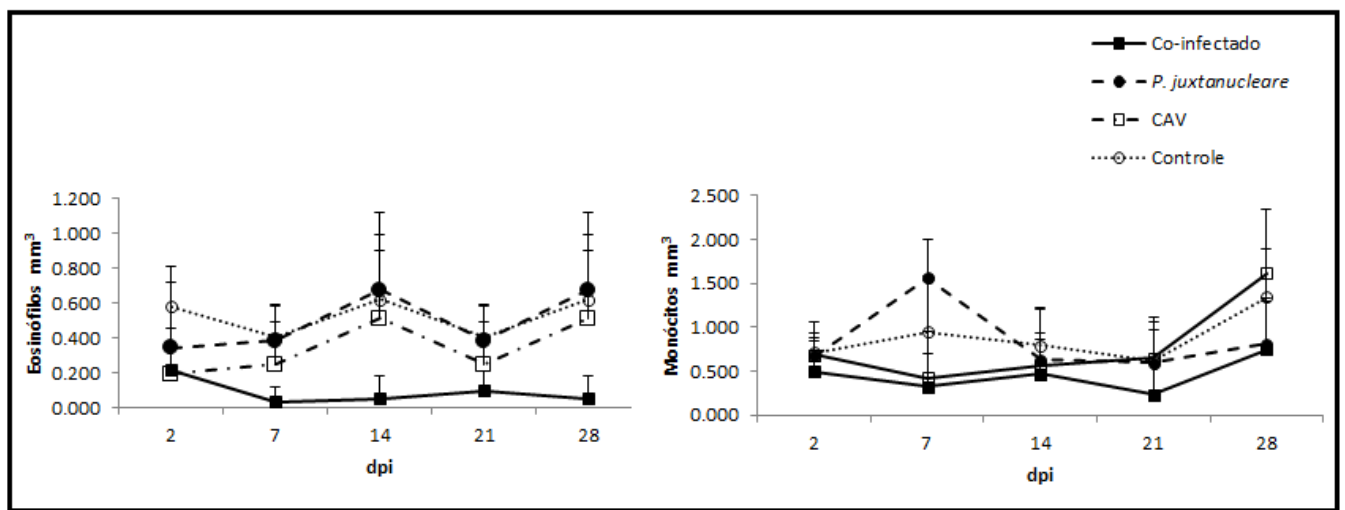
**Figura 19.** Número absoluto de linfócitos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infectado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare* e CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente com *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção com o CAV. \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O número de heterófilos no grupo *P. juxtannucleare* apresentou diminuição significativa quando comparado aos valores obtidos no grupo controle no 14ºdpi (Figura 20). Nas demais observações não se detectaram alterações significativas neste grupo quando comparado ao grupo controle. Nos grupos co-infectado e CAV o número de heterófilos apresentou-se significativamente reduzido quando comparado ao grupo controle nos 7º e 14ºdpi. Os indivíduos do grupo co-infectado apresentaram diminuição do número de heterófilos também no 28ºdpi.



**Figura 20.** Número absoluto de heterófilos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infectado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare*-CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente por *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção com o CAV. \* a,b,c diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O número de eosinófilos e de monócitos nos grupos *P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado, bem como os valores obtidos no grupo controle se apresentam dentro dos valores de referência aceitos para galinhas (Latimer et al 1988; Campbell 1995). Estes tipos celulares são menos frequentemente observados durante as contagens quando comparados aos linfócitos e heterófilos e a realização da contagem destes tipos celulares pode apresentar falhas, por este motivo não foram comparados estatisticamente (Figura 21). Não foram observados basófilos nos esfregaços sanguíneos das aves neste estudo.



**Figura 21.** Número absoluto de eosinófilos e de monócitos do sangue periférico de pintinhos SPF nos grupos: *P. juxtannucleare* (exclusivamente infectado por *P. juxtannucleare*), CAV (exclusivamente infectado por CAV), co-infectado (indivíduos infectados por *P. juxtannucleare*-CAV) e controle (não infectado). Os pintinhos foram infectados experimentalmente com *P. juxtannucleare* sete dias após a infecção por CAV.

## **5.12 Avaliações das células T: citotóxica (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), auxiliadora (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e subpopulações: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>**

Os resultados obtidos em cada um dos grupos inoculados foram descritos para cada tipo celular e comparados estatisticamente com o grupo controle de acordo com os dias após a inoculação por *P. juxtannucleare*. O grupo *P. juxtannucleare* apresentou aumento de determinados tipos celulares, principalmente detectados nos 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup>dpi; enquanto os grupos co-infectado e CAV apresentaram diminuição do número de determinadas células, principalmente observada 14 dias após a inoculação viral. No entanto, o grupo co-infectado apresentou perfil relativamente diferente do grupo CAV, conforme pode ser observado na descrição que se segue sobre os resultados de cada um dos tipos celulares avaliados.

Os linfócitos dos pintinhos foram diferenciados de acordo com o tamanho (forward scatter-FSC) e com a granulosidade das células (Sidescatter-SSC), além disto foram diferenciados utilizando a marcação dupla ou tripla, Figura 22 (A,B,C).

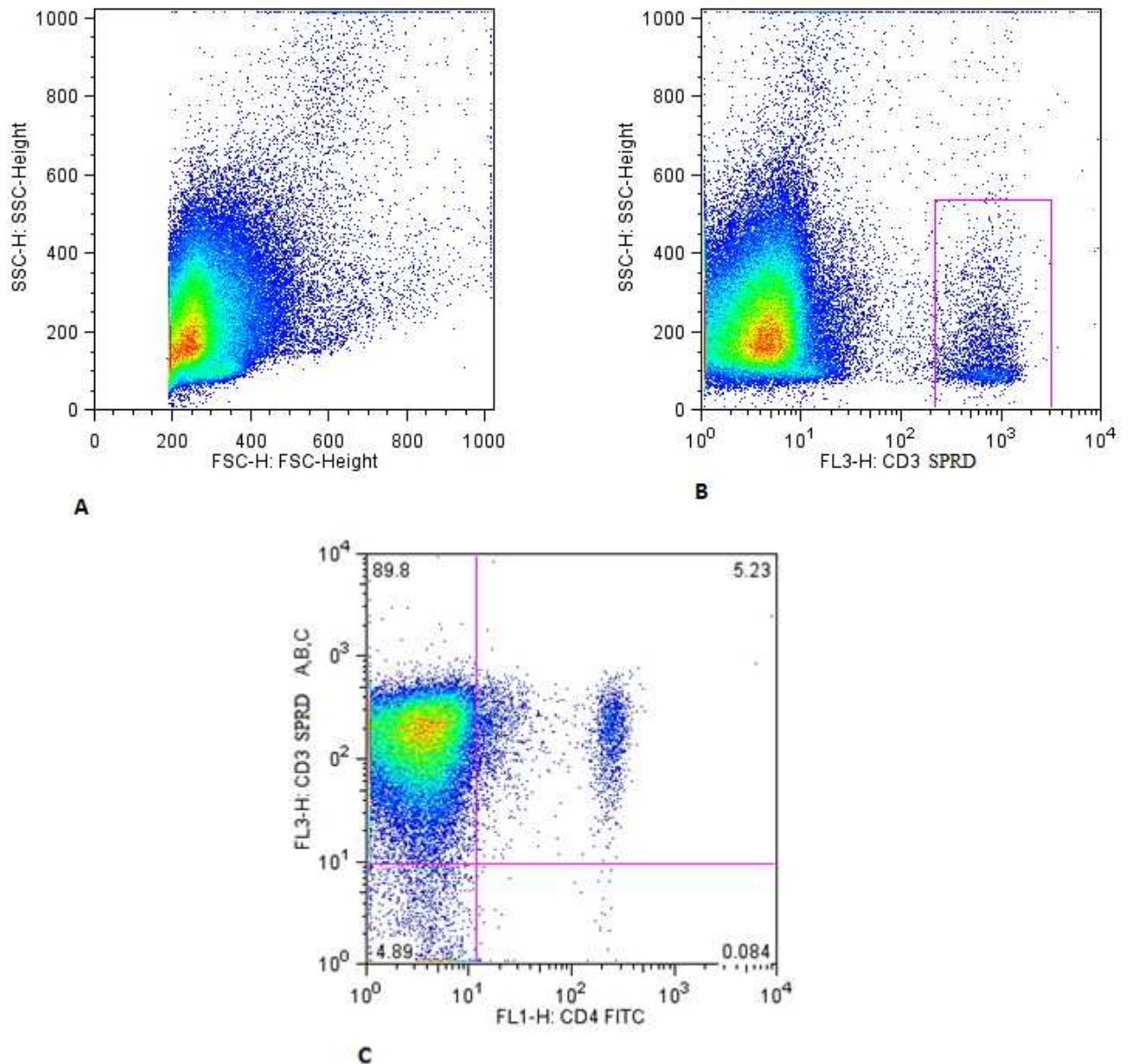


Figura 22. Imunofenotipagem de células T obtida a partir do sangue periférico de pintinhos SPF controle (não infectados) e inoculados (Grupos: *P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado). A- amostra representativa da distribuição das células por tamanho vs granulosidade (FSC X SSC); B- Estratégia da janela de leitura para localização dos linfócitos definidos pela granulosidade vs a marcação por CD3 (SSC x CD3); C- amostra representativa da análise de um dos marcadores (CD4) dentro da janela de leitura CD3.

O número de células T citotóxicas ( $CD3^+CD8^+$ ) não apresentou diferenças significativas na comparação entre cada um dos grupos inoculados (co-infectado, *P. juxtannucleare* e CAV) com o grupo controle ( $p>0,05$ ), figura 23. As diferenças significativas observadas foram associadas à comparação entre os valores obtidos no grupo *P. juxtannucleare* com os grupos co-infectado e CAV no 7dpi (14dpi por CAV;  $p<0,05$ ).

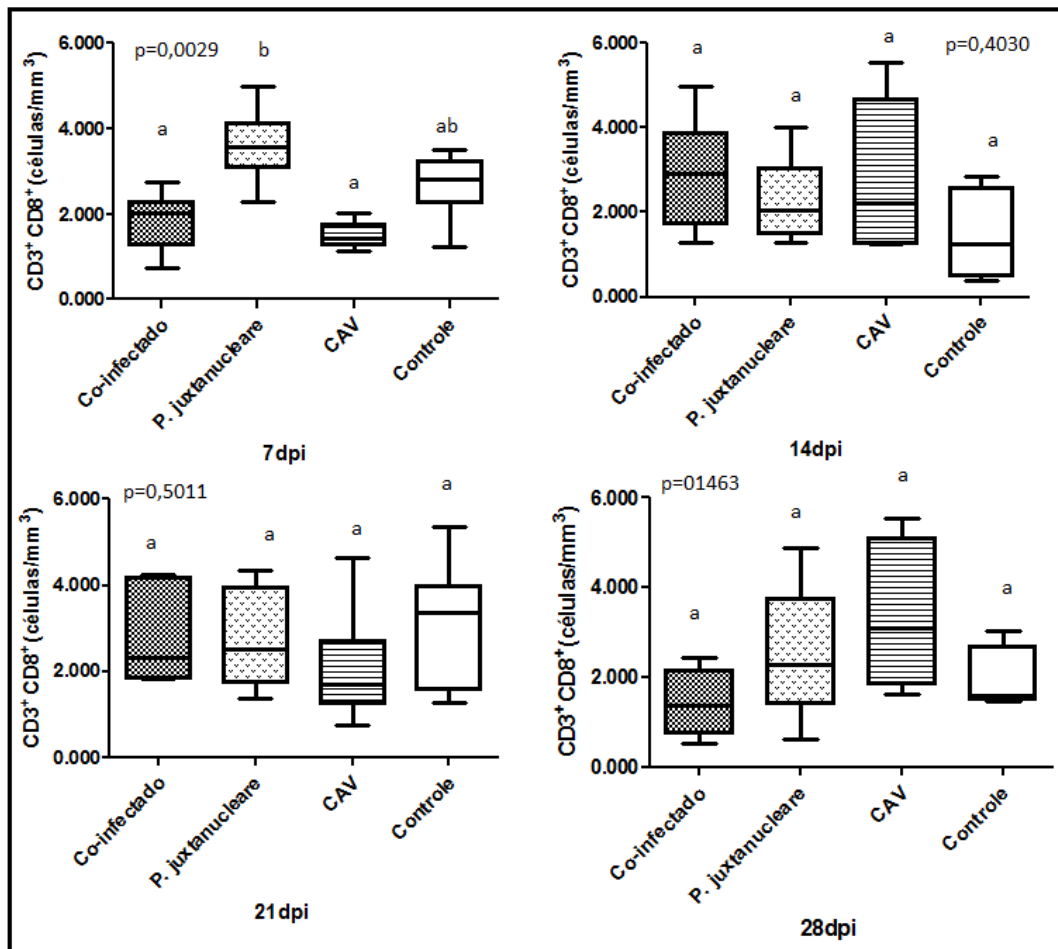


Figura 23. Número absoluto de linfócitos  $CD3^+CD8^+$  do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado

**(inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05).**

A subpopulação de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> foi analisada para observar o número de células citotóxicas ativadas (Figura 24). O grupo *P. juxtannucleare* quando comparado ao grupo controle apresentou maior número desta subpopulação celular nos 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dpi. Os grupos co-infectado e CAV quando comparados ao grupo controle, apresentaram diminuição do número desta subpopulação de células no 7<sup>o</sup>dpi (14dias após a inoculação por CAV). No 28<sup>o</sup>dpi (35dias após a inoculação por CAV) o grupo CAV apresentou número de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> significativamente maior quando comparado ao grupo controle (p<0,05), fato não observado no grupo co-infectado.

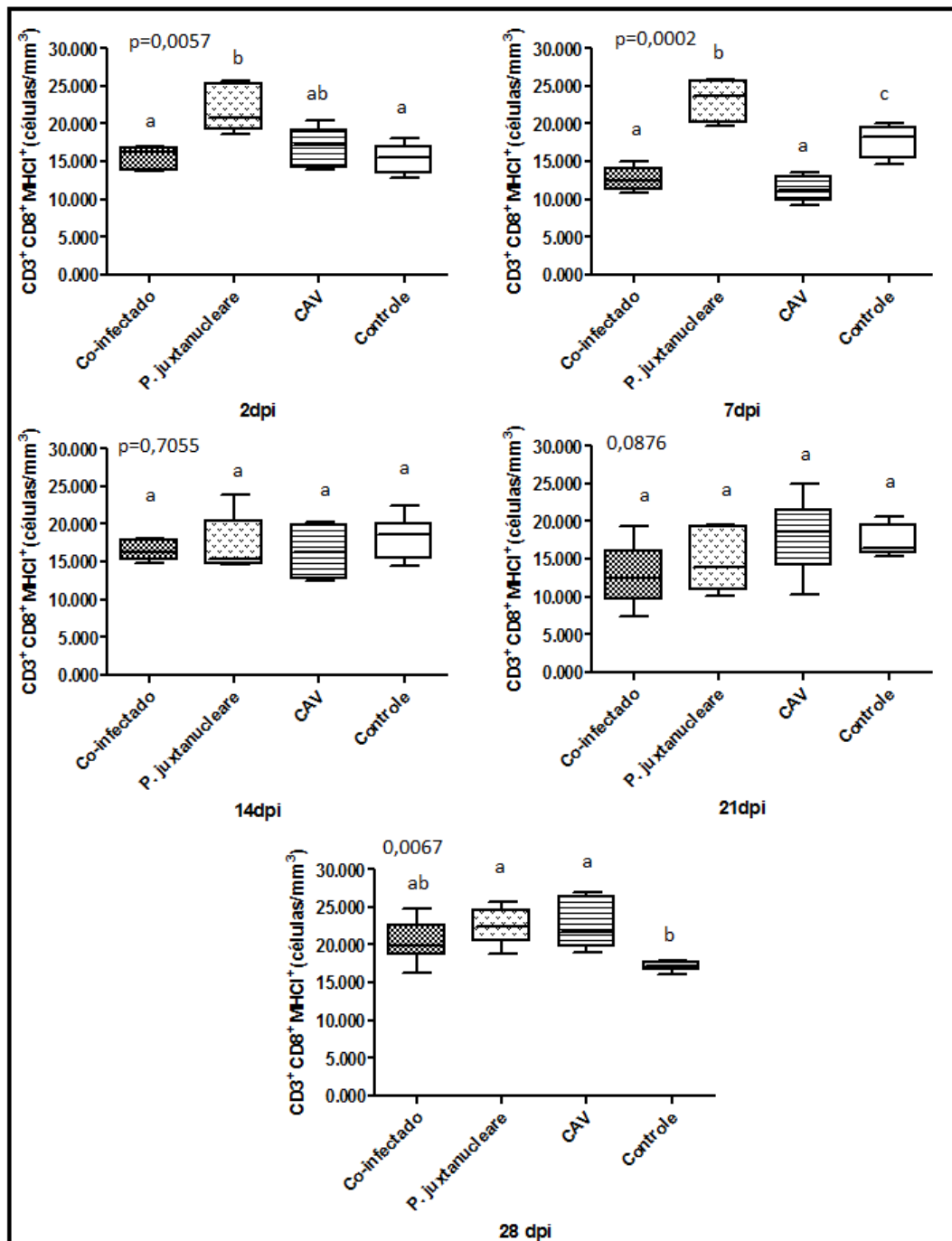


Figura 24. Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHC1<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado



**(inoculados por *P. juxtannucleare* e por CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05).**

Na análise da subpopulação de células T citotóxicas expressando a molécula co-estimulatória CD28<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) observou-se que o grupo *P. juxtannucleare* apresentou o número destas células significativamente maior quando comparado ao grupo controle no 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> (p<0,05; Figura 25).

Os grupos co-infectado e CAV apresentaram o número de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> significativamente menor quando comparados ao grupo controle no 7<sup>o</sup>dpi (14 dias após a inoculação por CAV; p<0,05). No 28<sup>o</sup>dpi o grupo CAV apresentou o número de células significativamente maior quando comparado ao controle, fato não observado na comparação entre grupo co-infectado e controle Figura 25; p<0,05).

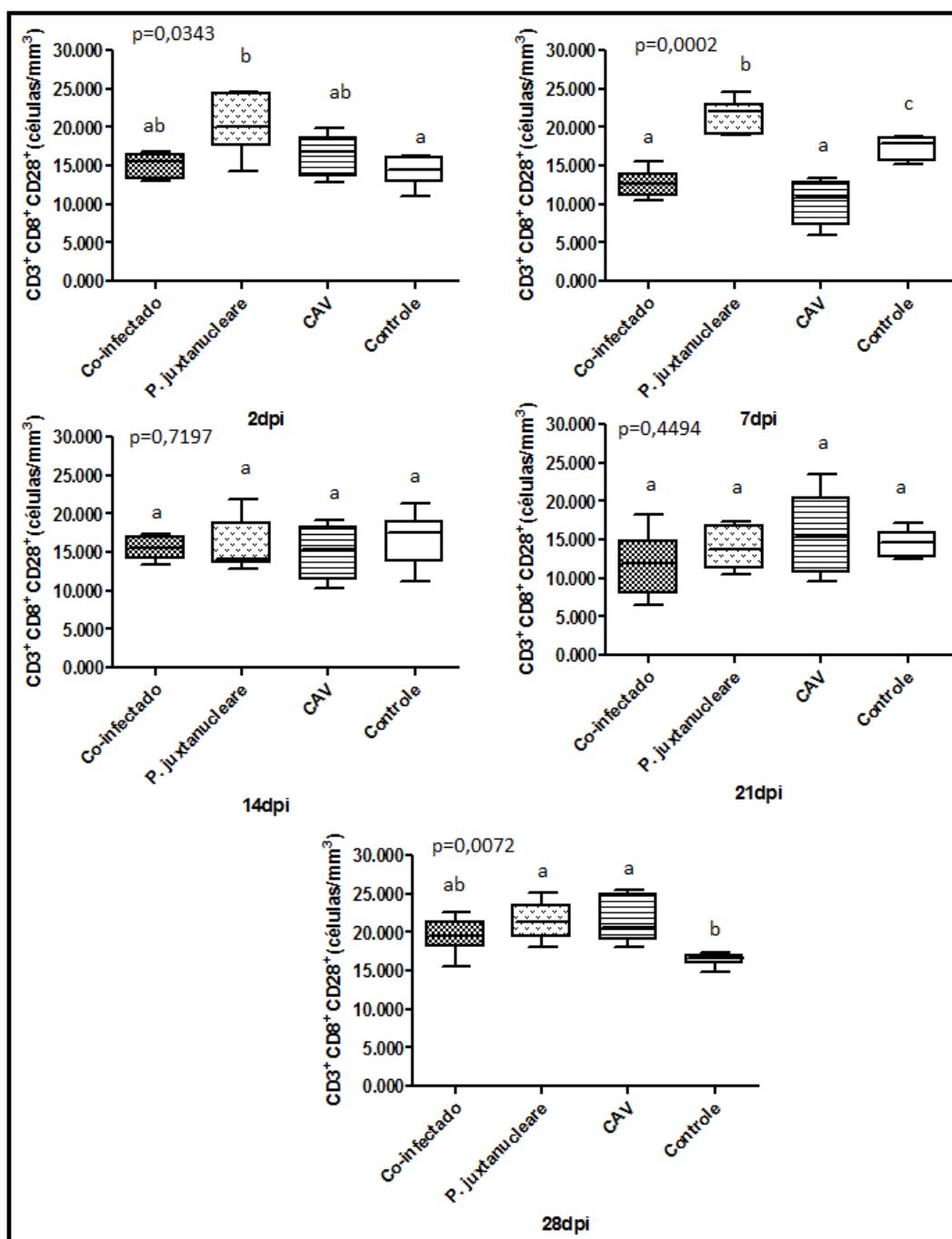
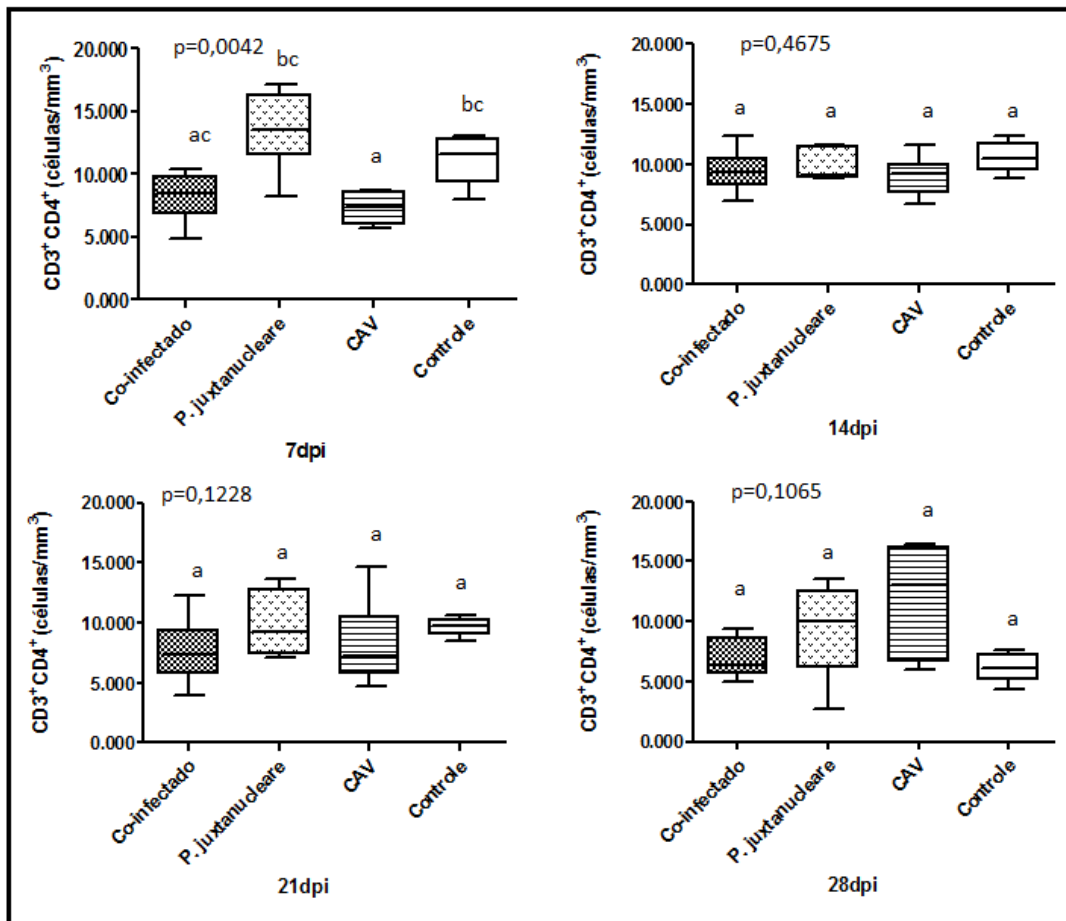


Figura 25. Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtenucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtenucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtenucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtenucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtenucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O número de células T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) nos grupos *P. juxtannucleare* e co-infectado não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle ( $p>0,05$ ). O número deste subtipo celular foi significativamente menor no grupo CAV quando comparado ao grupo controle no 7ºdpi (14 dias após a infecção por CAV;  $p<0,05$ ), figura 26.



**Figura 26.** Número absoluto de linfócitos  $CD3^+CD4^+$  do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ).

O grupo *P. juxtannucleare* apresentou o número de células T auxiliadoras ativadas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> significativamente maior quando comparado ao grupo controle no 21ºdpi (p<0,05; figura 27). Enquanto o grupo co-infectado não apresentou diferenças quando comparado ao controle. O grupo CAV apresentou o número de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> significativamente menor quando comparado ao grupo controle nove dias após a inoculação por CAV. Ao final das observações (35 dias após a inoculação do vírus) o número destas células ativadas aumentou neste grupo e foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle (p<0,05).

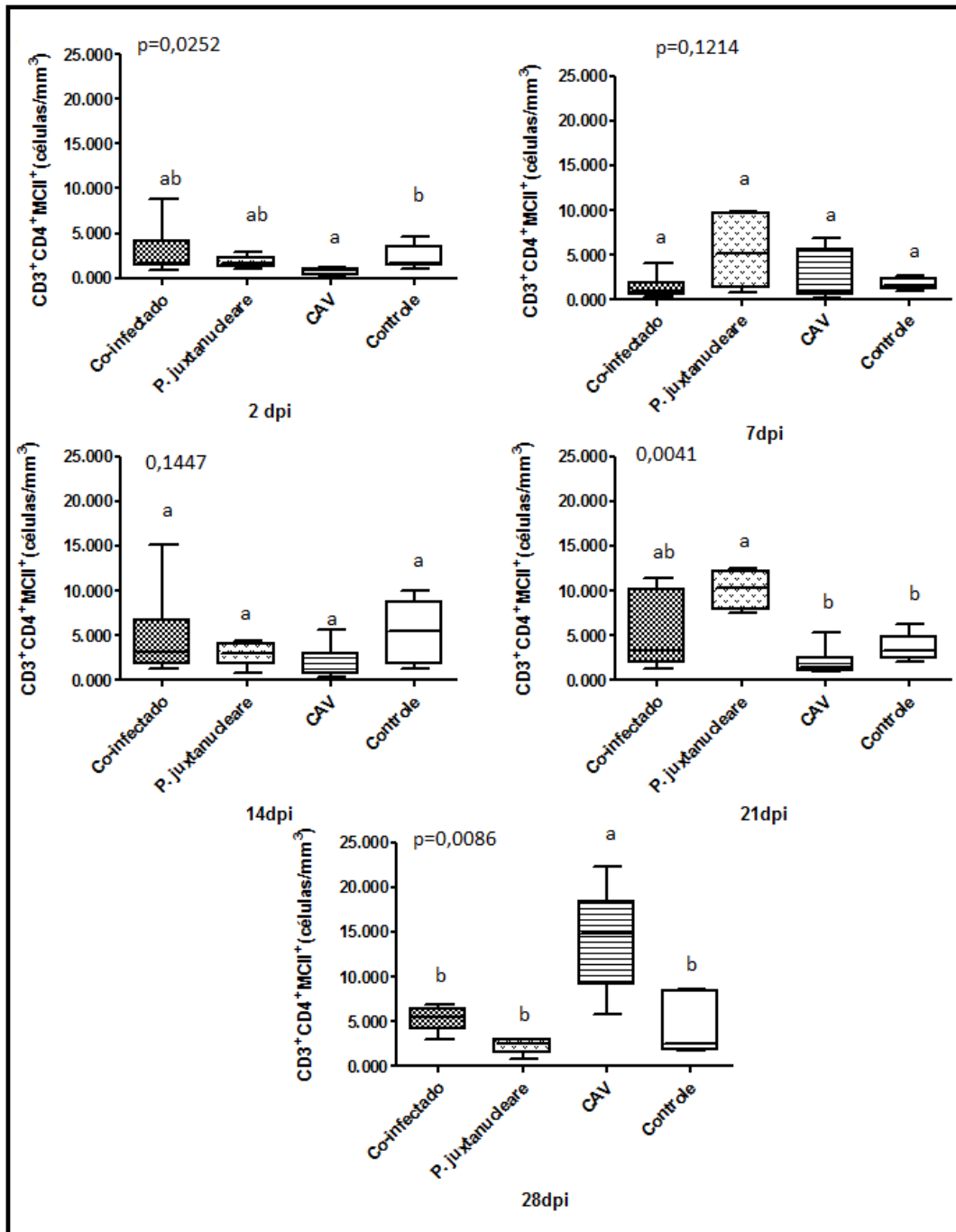


Figura 27. Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculados por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

O número de células T auxiliares expressando a molécula co-estimulatória CD28 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) apresentou aumento significativo no grupo *P. juxtannucleare* quando comparado ao grupo controle nos 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup>dpi (p<0,05; figura 28). Os grupos co-infectado e CAV apresentaram diminuição significativa desta subpopulação celular quando comparados ao grupo controle no 7<sup>o</sup>dpi (14 dias após a infecção por CAV; p<0,05).

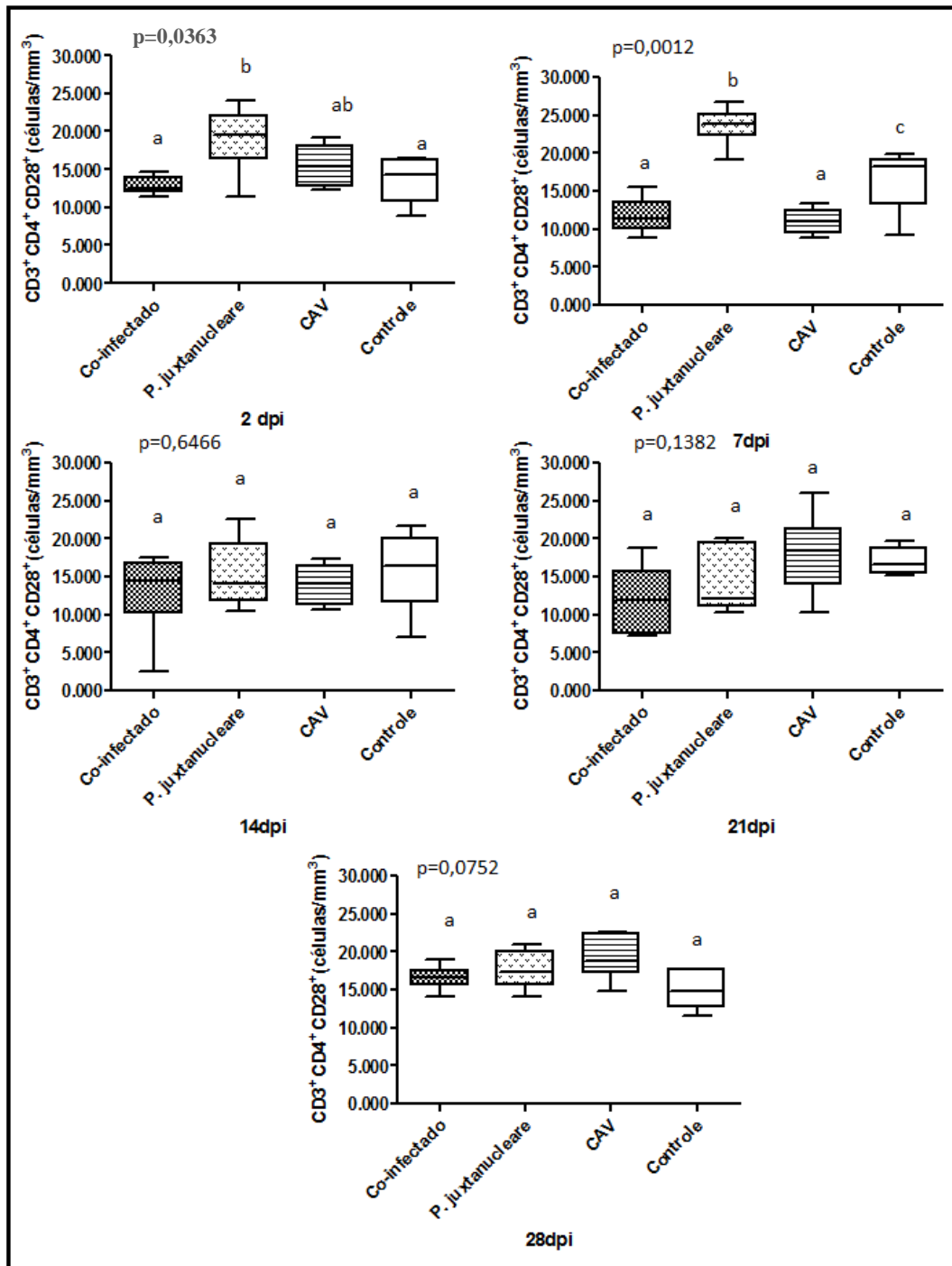
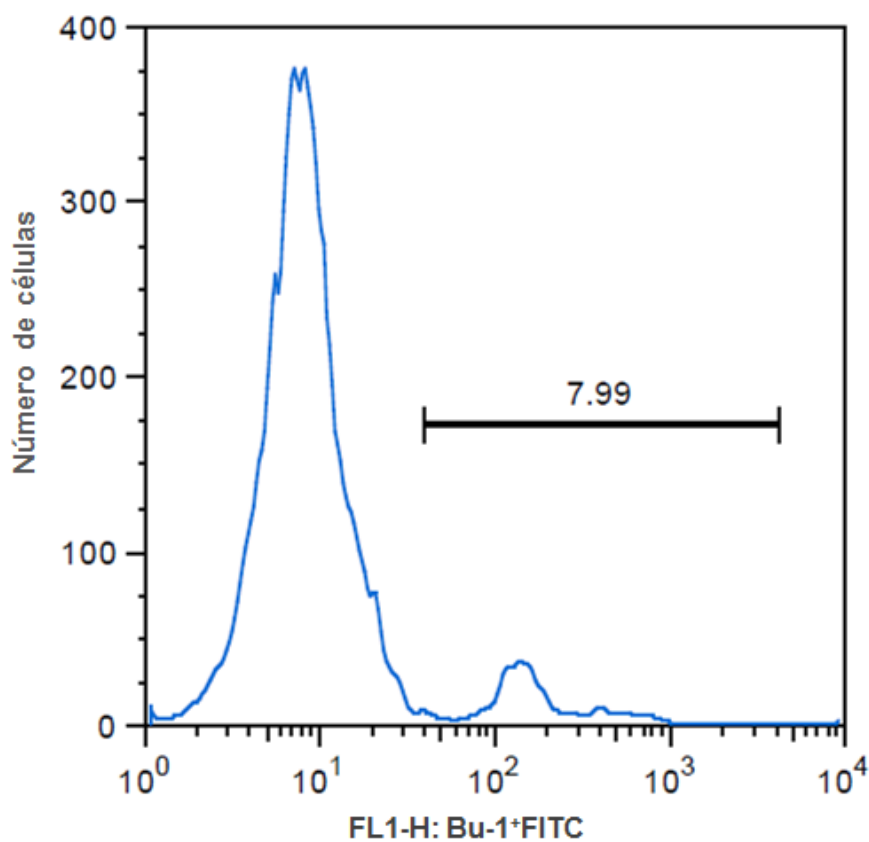


Figura 28. Número absoluto de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV: infectado exclusivamente por CAV e co-infetado (inoculado por *P. juxtannucleare*-CAV). \* <sup>a,b,c</sup> diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

### 5.13 Avaliação das células B (Bu 1<sup>+</sup>)

O anticorpo monoclonal Bu 1 utilizado neste estudo reconhece os alelos Bu1a e Bu 1b, determinantes para a marcação de células B. No presente estudo, este anticorpo utilizado marcou pequena população de células B que podem ser observadas no histograma, determinadas no segundo pico delimitado pela barra (Figura 29). As células B foram observadas no sangue periférico de pintinhos SPF dos grupos: *P. juxtannucleare*, CAV, co-infectado e controle.



**Figura 29: Número de células B. Histograma representativo demonstrando o número de células Bu 1<sup>+</sup> dentro da janela de leitura de linfócitos. O primeiro pico do histograma indica as células negativas para a marcação, enquanto o segundo pico, delimitado pela barra, indica a porcentagem de células marcadas positivamente.**



Neste estudo não foram detectadas alterações significativas na população de células B, utilizando a marcação Bu1<sup>+</sup> nos grupos *P. juxtannucleare* e co-infectado comparativamente aos valores obtidos no grupo controle ( $p>0,05$ ; Figura 30). O grupo CAV apresentou número de células B significativamente menor quando comparado ao grupo controle 14 e 21 dias após a inoculação viral ( $p<0,05$ ), registrando-se o aumento significativo no número destas células 28 dias após a inoculação por CAV ( $p<0,05$ ).

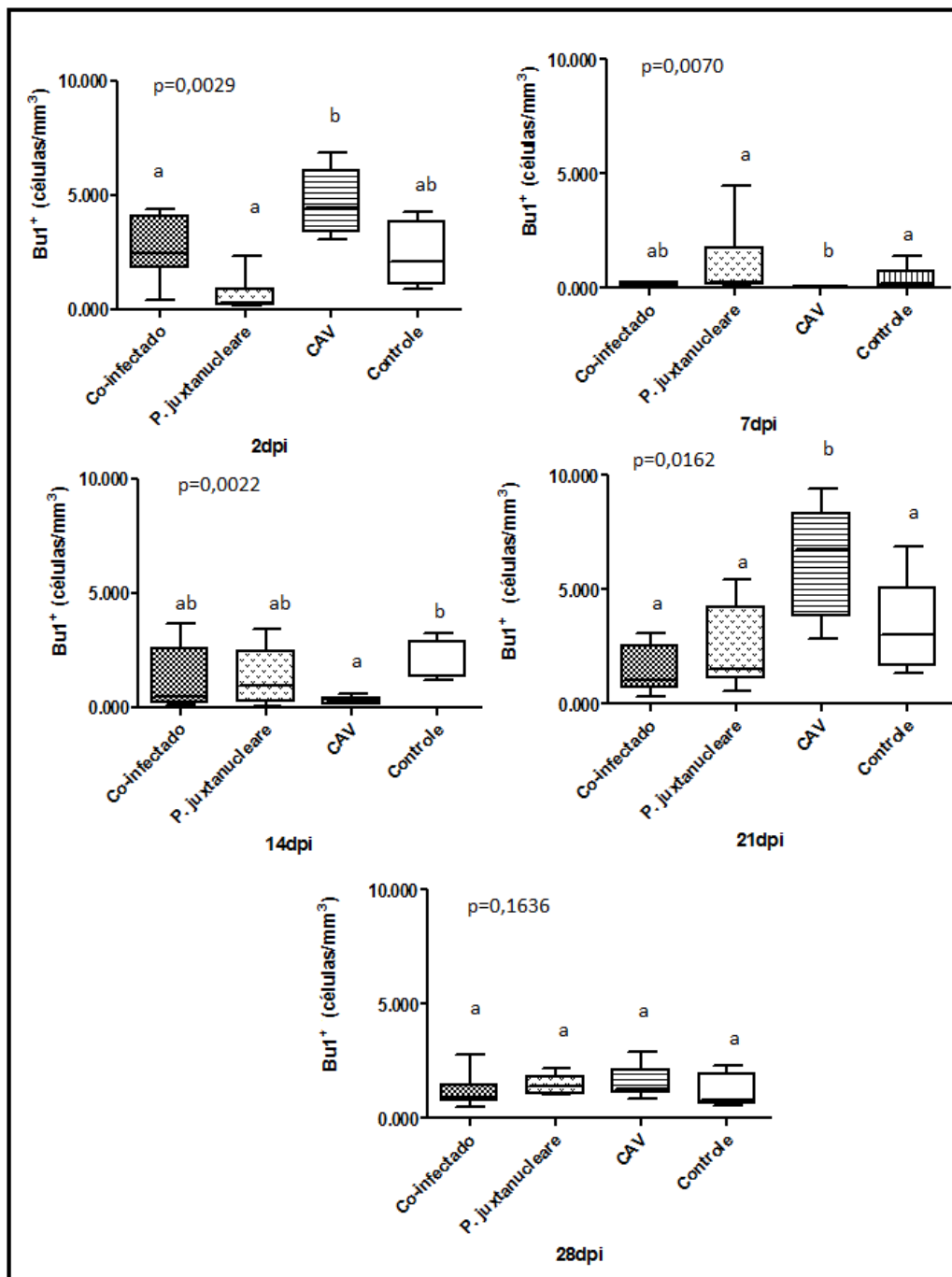


Figura 30. Número absoluto de linfócitos B (Bu 1<sup>+</sup>) do sangue periférico de pintinhos SPF durante a co-infecção por Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e por *P. juxtannucleare* de acordo com o período pós-inoculação por *P. juxtannucleare* em quatro grupos: controle (não infectado), *P. juxtannucleare*: infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*, CAV: infectado exclusivamente por CAV e co-infectado (inoculado por *P. juxtannucleare*-CAV). \* a,b,c diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

## **6. Discussão**

### **6.1 Caracterização molecular da cepa de *P. juxtannucleare***

No presente estudo, os efeitos da co-infecção por *P. juxtannucleare* e pelo Vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) foram investigados experimentalmente em pintinhos SPF. A infecção por *P. juxtannucleare*, a qual foi obtida a partir de uma galinha naturalmente infectada, foi confirmada pelo sequenciamento do fragmento de citocromo b (*cit-b*) deste parasito. A análise filogenética desta nova sequência de *P. juxtannucleare* revelou baixa divergência genética intra-específica, após comparação com as demais sequências deste parasito depositadas em dois diferentes bancos de dados, GenBank e MalAvi. É de suma importância a inclusão de novas linhagens de *P. juxtannucleare* em bancos de dados de acesso público. Entretanto, o depósito de tais sequências deve cumprir o seguinte requisito, a identificação parasitológica precisa em associação à caracterização molecular. Somente desta forma, poderão ser realizadas avaliações corretas da divergência genética intra-específica entre os hemosporídeos aviários. A avaliação genética intra-específica apresenta extrema importância para a definição dos limiares genéticos que separam as espécies de plasmódios aviários (Perkins, 2000). Nesta direção, em nosso trabalho observou-se elevada divergência genética entre a sequência de *P. juxtannucleare* obtida neste estudo e a sequência disponível no GenBank como "P. juxtannucleare-like" descrita por Pacheco e colaboradores em 2011. O distante posicionamento filogenético apontado pela análise da árvore construída com as linhagens de *P. juxtannucleare* e "P. juxtannucleare-like", evidenciam que a linhagem "P. juxtannucleare-like" não é *P. juxtannucleare*. Mais uma vez, reforça-se aqui a necessidade de associação entre métodos morfológicos e moleculares na condução de diferentes estudos acerca dos plasmódios aviários.

### **6.2 Avaliações parasitológica, hematológica, biológica e histopatológica e da interação *P. juxtannucleare*-CAV**

As infecções múltiplas associadas a diferentes patógenos, especialmente nos casos em que um dos patógenos é um vírus imunossupressor, podem apresentar maior gravidade para os indivíduos quando comparadas à infecção exclusivamente causada por um dos patógenos (Loving et al. 2010, Tan et al. 2011, Liang et al. 2013). Casos de co-infecção natural ocorrem com frequência em aves, aumentando assim a necessidade de se avaliar o perfil de infecções mistas em condições controladas (Lapont et al. 2009, Alley et al. 2010, Palinauskas et al. 2011; Tan et al. 2011). Entretanto, é importante ressaltar que o modelo de estudo da interação parasito-hospedeiro desenvolvido neste trabalho constitui a primeira descrição dos efeitos patogênicos envolvidos na co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV. Ambos os microrganismos selecionados para este estudo representam patógenos que infectam naturalmente galinhas e que estão distribuídos mundialmente, inclusive no Brasil, justificando o estudo ora apresentado.

O efeito imunossupressor da infecção por CAV certamente refletiu no curso da parasitemia por *P. juxtannucleare* em pintinhos co-infectados; a parasitemia foi significativamente maior nestes animais em diferentes períodos pós-infecção. A infecção por CAV durante os primeiros dias após o nascimento dos pintinhos ou mesmo durante a vida embrionária pode levar a disfunção permanente ou temporária da resposta imune, aumentando a susceptibilidade destas aves a outros patógenos ou levando a falhas vacinais (Goryo et al. 1989, Pope 1991, McNulty 1991, Smyth et al. 1993, Peters et al. 2007). Em função do número reduzido de estudos sobre a co-infecção envolvendo vírus imunossupressores e os parasitos da malária, torna-se complexa e limitada à discussão acerca da exacerbação dos efeitos negativos da infecção malárica em aves co-infectadas por vírus. Interessantemente, durante a malária humana estudos têm demonstrado haver efeito sinérgico durante a co-infecção por *P. falciparum* e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Durante a malária, indivíduos soro-positivos apresentam parasitemias mais elevadas e sinais clínicos mais graves quando comparados àqueles infectados apenas por *P. falciparum* (Khasnis & Karnad 2003, Chalwe et al. 2009). Por outro lado, na malária aviária foi relatado efeito antagonista durante a co-infecção de galinhas com *P. gallinaceum* e o nematódeo *Ascaridia galli*. A infecção malárica causada por *P. gallinaceum* provocou insucesso significativo do estabelecimento do nematoda no intestino das aves hospedeiras (Juhl and Permin 2002).

A infecção de pintinhos SPF por *P. juxtannucleare* apresentou características bem definidas sendo possível detectar diminuição significativa dos níveis de hemoglobina, valores de hematócrito e número de eritrócitos, levando a um quadro de anemia inclusive em animais que apresentaram baixas parasitemias. Em estudos realizados anteriormente nos quais se observaram baixas parasitemia não foram detectadas alterações nestas variáveis durante a infecção por *P. juxtannucleare* (Motta et al 1997, Silveira et al. 2009B). A anemia na malária por *P. juxtannucleare* geralmente está associada à alta parasitemia, principalmente durante o pico da infecção (Krettl 1972). É possível que pintinhos SPF apresentem marcada susceptibilidade à infecção causada por *P. juxtannucleare*. Animais SPF podem apresentar menores números de determinadas células do sistema imune quando comparados a animais mantidos em ambientes regulares, favorecendo assim o desenvolvimento de infecções (Umesaki et al 1993, Beirão et al. 2012). Até o presente momento, a infecção experimental por *P. juxtannucleare* em pintinhos SPF ainda não havia sido investigada. No entanto, há evidências de que esta espécie de plasmódio cause severas alterações patológicas ou clínicas em hospedeiros mais susceptíveis (Grim et al. 2003, Murata et al. 2008). A malária causada por *P. juxtannucleare* resultou na morte de pinguins (*Spheniscus demersus*) na África do Sul e de faisões (*Crossoptilon crossoptilon*) no Japão (Grim et al. 2003, Murata et al. 2008). A disparidade dos processos patológicos causados por *P. juxtannucleare* também pode ser atribuída à diferença na virulência observada entre cepas distintas de *P. juxtannucleare* obtidas de regiões geográficas diferentes. Estudos anteriores compararam cepas de *P. juxtannucleare* procedentes da Malásia, do Japão e do Brasil relacionando os aspectos associados à patogenicidade e às características morfológicas do parasito (Al-Dabagh 1961, Dhanapala 1962, Bennett & Warren 1966A,B,C). A cepa obtida no Brasil foi considerada a mais patogênica (Bennett & Warren 1966A,B,C). Interessantemente, a linhagem de *P. juxtannucleare* identificada em nosso estudo e a linhagem isolada de faisões no Japão, ambas consideradas patogênicas, não apresentaram diferenças intra-específicas utilizando o *cit b* como marcador molecular.

Os pintinhos co-infectados desenvolveram níveis de hemoglobina, hematócrito e de eritrócitos significativamente menores quando comparados aos níveis verificados para animais do grupo controle e grupo *P. juxtannucleare*. A diminuição destas variáveis hematológicas no grupo co-infectado ocorreu durante a

fase na qual os efeitos da infecção pelo CAV no hospedeiro são descritos como mais graves e pronunciados (Schat 2009). Corroborando estas evidências nossos resultados evidenciam que os níveis de hemoglobina e o número de eritrócitos nos pintinhos do grupo co-infectado foram semelhantes àqueles valores observados para os infectados exclusivamente por CAV. Por outro lado, os valores de hematócrito foram significativamente menores entre animais co-infectados quando se consideram aqueles animais exclusivamente infectados por CAV. Esta observação merece destaque uma vez que a análise do hematócrito é um importante parâmetro hematológico, exame útil na determinação dos quadros de anemia apresentando menor variação de resultados, pois, exige pouca manipulação durante a sua realização (Campbell 1995). Ao considerar que tanto CAV quanto *P. juxtannucleare* podem causar anemia nos hospedeiros (Hoop 1993, Rosenberger & Cloud 1998, Palinauskas et al. 2010) seria esperado encontrar valores de hemoglobina e de eritrócitos significativamente mais baixos no grupo co-infectado. No entanto, durante o período no qual o grupo co-infectado alcançou os valores de hemoglobina e de eritrócitos mais baixos observou-se 50% de mortalidade neste grupo. É possível que a diferença estatística entre as variáveis dos grupos CAV e co-infectado não tenham sido detectadas devido ao efeito deletério da co-infecção que pode ter causado a morte precoce dos pintinhos, anterior à diminuição significativa dos valores hematológicos.

Estudo realizado anteriormente descreveu quadro clínico de anorexia em indivíduos infectados por *P. juxtannucleare* (Massard & Massard 1981). A diminuição da concentração de glicose no sangue pode refletir um estado de anorexia após período prolongado de jejum (Maia et al. 2009). Portanto, a mensuração dos níveis de glicose pode ser um bom parâmetro para avaliar o grau de comprometimento clínico de animais experimentalmente infectados por diferentes patógenos. Neste sentido, procedeu-se a análise dos níveis glicêmicos em todos os animais avaliados em nosso estudo. Aves pertencentes aos dois grupos inoculados com *P. juxtannucleare*, (*P. juxtannucleare* e co-infectado) não apresentaram redução significativa dos níveis de glicose quando comparadas àquelas do grupo controle. Nossos dados indicam que apesar das alterações hematológicas verificadas nos animais infectados por *P. juxtannucleare*, estes apresentaram alimentação regular reforçando o fato de que a anemia observada não se deveu a restrições proteicas, por exemplo.

Ainda nesta direção, outro parâmetro que pode indicar a não restrição proteica entre os animais dos diferentes grupos avaliados é o fato de que aves dos grupos co-infectado e CAV não apresentaram diminuição significativa de peso corporal durante todo o período de observação. Este fato pode ser explicado pela disponibilidade de comida “*ad libitum*” proporcionada em condições experimentais. Diferentes estudos em condições experimentais já relataram não haver alterações no ganho de peso em aves durante a infecção mista ou simples com os parasitos causadores de malária, mesmo em estudos nos quais se detectaram elevada mortalidade (Zehindjiev et al. 2008, Silveira et al. 2009B, Palinauskas et al. 2009; 2010). No entanto, em infecções naturais, nas quais o acesso à alimentação é limitado, aves co-infectadas ou uni-infectadas apresentaram massa corporal inferior quando comparadas àquelas não infectadas (Marzal et al. 2008). Cabe ressaltar que em nosso estudo, o grupo infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare* apresentou diminuição significativa do peso quando comparado aos demais grupos experimentais. Contudo, tal diminuição de peso não apresentou qualquer correlação direta com a parasitemia verificada ao longo do período experimental.

A temperatura corporal dos pintinhos co-infectados apresentou-se diminuída de forma significativa quando comparado às temperaturas de animais do grupo controle. Esta observação foi evidente no sexto dia após a inoculação por *P. juxtannucleare*. Neste período, os pintinhos co-infectados apresentaram acentuada diminuição nos níveis de hemoglobina, valores de hematócrito e número de eritrócitos. É possível que a condição de saúde deteriorada tenha contribuído para a redução da temperatura nestes indivíduos, um tema que merece melhor investigação.

A análise das proteínas plasmáticas totais pode gerar informações importantes sobre o estado de saúde dos animais uma vez que valores diminuídos podem estar associados a processos inflamatórios e à desidratação (Sturkie 1998). Neste estudo, ainda que a análise estatística tenha evidenciado diferenças significativas entre os valores de proteínas plasmáticas totais presentes em animais dos três diferentes grupos (*P. juxtannucleare*, CAV e co-infectado) quando comparados aos valores para aves do grupo controle, estes valores não têm sentido biológico. Os valores observados para os três grupos encontraram-se dentro do intervalo de valor mínimo-máximo observado para o grupo controle bem como de acordo com os valores obtidos em outros estudos (Cardoso & Tessari 2003).

Vashist 2011 observou aumento de proteínas plasmáticas totais em pintinhos durante à infecção mista por *P. juxtannucleare* e por *Borrelia anserina*.

Diferentes estudos relataram que galinhas infectadas por *P. juxtannucleare* geralmente apresentam sinais clínicos discretos. Entretanto, em situações de imunodepressão as aves infectadas podem apresentar sinais clínicos como penas arrepiadas, diarreia, prostração, paresia e morte (Al Dabagh 1961, Bennett & Warren 1966A,C, Krettli 1972, Massard & Massard 1981, Elisei et al. 2007). As aves do grupo co-infectado apresentaram sinais clínicos mais graves e mais acentuados como prostração, palidez, sangue aquoso, penas arrepiadas e diarreia. Alguns destes sinais (penas arrepiadas, diarreia) e também a anemia foram observados em aves exclusivamente infectadas por *P. juxtannucleare*. Entretanto, estes foram menos pronunciados e evidentes, sugerindo mais uma vez que a co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV possa atuar de forma negativa no hospedeiro.

A análise histopatológica confirmou os achados macroscópicos observados durante a necropsia dos animais dos diferentes grupos experimentais. Atrofia e intensa depleção de células linfóides no timo, baço e na bursa de Fabricius foram evidências histopatológicas detectadas entre os animais infectados apenas por CAV e aqueles co-infectados. Estes encontros histopatológicos corroboram os dados de estudos prévios, nos quais CAV foi responsável por atrofia e depleção de células linfóides de diferentes órgãos (Goryo et al. 1989, Pope 1991; McNulty, 1991; Smyth et al. 1993, Rosenberger & Cloud, 1998, Peters et al. 2007). Neste estudo, foi observada hepatoesplenomegalia principalmente associada ao grupo infectado exclusivamente por *P. juxtannucleare*. Um dado que merece destaque é a primeira descrição da ocorrência de cardiomegalia e a presença de hidropericárdio em pintinhos infectados por *P. juxtannucleare*. Versiani & Gomes 1943 já haviam observado derrame pericárdico e Dhanapala (1962) observou a presença de parasitos durante a fase exoeritrocítica no músculo cardíaco, contudo estes estudos não relataram a presença de cardiomegalia. Alterações cardíacas, incluindo hidropericárdio foram observadas em pinguins infectados naturalmente por *P. juxtannucleare* (Grim et al. 2003). As complicações cardíacas durante a malária causada por *P. juxtannucleare* parecem ser marcantes durante a infecção por este parasito. Entretanto as causas destas alterações cardíacas merecem maior investigação.



No presente estudo destaca-se o efeito sinérgico verificado em infecções mistas por *P. juxtannucleare* e CAV evidenciado por aumento da parasitemia, presença de anemia intensa e maior mortalidade entre indivíduos co-infectados.

### **6.3 Resposta celular na interação *P. juxtannucleare*-CAV**

A imunofenotipagem foi utilizada para a determinação do número absoluto de células T e B circulantes no sangue periférico bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias e de ativação na superfície das mesmas. A comparação do perfil obtido nos pintinhos durante a infecção exclusiva ou mista por *P. juxtannucleare* e por CAV e destes com as aves controles pode gerar informações relevantes sobre a aquisição da resposta imune envolvida na determinação dos quadros clínicos e patológicos associados à interação entre ambos os patógenos. Atualmente, a citometria de fluxo tem sido proposta para utilização na imunologia de aves, para diferenciação e quantificação de células (Dalgaard et al. 2010, Seliger et al. 2011, Beirão et al. 2012). Na medicina humana esta técnica tornou-se rotina, entretanto a sua aplicação na área clínica para diferenciação e contagem de leucócitos de aves ainda encontra obstáculos associados ao alto custo das análises, rapidez e acurácia.

Aves infectadas exclusivamente por *P. juxtannucleare* apresentaram aumento significativo do número de leucócitos totais quando em relação às aves do grupo controle. Estes dados corroboram um estudo realizado anteriormente no qual, aves jovens infectadas experimentalmente por *P. juxtannucleare* apresentaram aumento do número de leucócitos mensurado a partir de análises microscópicas convencionais (Silveira et al. 2009B). Sabe-se que o número de leucócitos totais pode sofrer alterações de acordo com o processo infeccioso ou inflamatório (Campbell 1995, Cardoso et al. 2003, Beirão et al. 2012). Um exemplo que caracteriza o aumento expressivo do número de leucócitos totais é a administração de turpentina (óleo essencial volátil extraído da resina de certos pinheiros) em galinhas causando um quadro típico de inflamação aguda (Latimer et al. 1988). Por outro lado, leucopenia tem sido observada em galinhas durante a infecção causada por agentes imunossupressores, tais como o Vírus da Reticuloendoteliose (REV), Vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) ou Vírus da doença de Marek (MDV)

(Burgess & Davison 2002, Withers et al. 2005, Drechsler et al. 2009). Nossos dados aqui descritos corroboram esses últimos achados uma vez que foi observado diminuição do número total de leucócitos nos animais co-infectados e entre aqueles exclusivamente infectados por CAV. A diminuição dos leucócitos nas infecções por CAV tem sido associada à destruição de hemocitoblastos que são precursores de eritrócitos, trombócitos e leucócitos e à depleção de células linfóides (Adair 2000). Em nossos experimentos constatou-se a diminuição expressiva de linfócitos em aves dos grupos co-infectado e CAV. Estes dados sugerem que em infecções concomitantes com patógenos potencialmente imunossupressores, a malária não agrava a leucopenia expressiva na infecção viral. De maneira interessante, observou-se que 35 dias após a inoculação de CAV, período de recuperação da infecção viral, os indivíduos exclusivamente infectados pelo vírus apresentaram aumento do número de linfócitos, fato não observado no grupo co-infectado. Provavelmente, após este período, a infecção malárica crônica subpatente seja responsável pela manutenção dos baixos níveis de linfócitos. A modulação exercida pela infecção plasmodial prolongada sobre a resposta celular decorrente da infecção viral merece mais estudos. Nesta direção, procederam-se à caracterização das subpopulações celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico das aves experimentalmente infectadas em relação às aves controles.

Em concordância com o exposto anteriormente, aves exclusivamente infectadas por *P. juxtannucleare* apresentaram valores absolutos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> similares àqueles verificados para os pintinhos do grupo controle. O mesmo foi verificado para o grupo co-infectado. É possível que a co-infecção tenha levado a um processo de imunomodulação impedindo a diminuição significativa destes tipos celulares. Entretanto, esta observação não está em concordância com os resultados verificados acerca da leucopenia observada no grupo co-infectado o que poderia indicar a diminuição de outras subpopulações celulares não investigadas nesta parte de nosso trabalho, por exemplo as células TCD8β. Além disso, os dados descritos previamente indicam queda considerável dos níveis de heterófilos nas aves com malária bem como naquelas co-infectados. Contrariamente ao observado para as aves dos grupos *P. juxtannucleare* e co-infectado, as aves infectadas do grupo CAV apresentaram redução significativa de células T CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> detectada 14 dias após a inoculação viral. Experimentos conduzidos neste estudo revelaram que os pintinhos do grupo CAV apresentaram depleção linfóide mais acentuada

quando comparados aos animais co-infectados. Cabe ressaltar aqui a esperada diminuição de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> tanto no grupo co-infectado quanto no grupo CAV, uma vez que o vírus infecta e destrói os precursores de linfócitos T e os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Adair 2000, Todd 2004, Tan & Tannock 2005). Vaziry e col. (2011) observaram em aves jovens infectadas por CAV redução da expressão de células CD4<sup>+</sup> no baço e na bursa e o aumento do número de células TCD8<sup>+</sup> nestes órgãos durante o pico da infecção. Infelizmente, não realizamos a imunofenotipagem celular nesses órgãos linfoides nesta etapa do trabalho, tema que merece atenção e que constituirá estudos futuros uma vez que as células T parecem ser fundamentais na recuperação de aves infectadas por CAV (Vaziry et al. 2011, Rautensschlein & Sharma 2002).

No grupo infectado por *P. juxtannucleare* foi observado o aumento do número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando a molécula co-estimulatória CD28<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) e também de células ativadas (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup>). Diminuição no número de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> foi observada para aves dos grupos CAV e co-infectado e principalmente detectada ao início das observações. As células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> apresentaram-se diminuídas apenas nas aves infectadas por CAV ao início das observações. Os sinais co-estimulatórios associados à molécula CD28<sup>+</sup> são indispensáveis para a ativação de células T e produção de citocinas, principalmente IL-2 (Koskela et al. 1998). O aumento no número de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> parece estar associado à ativação policlonal, ativação e regulação de moléculas MHCII<sup>+</sup> durante o desafio experimental de aves infectadas por MDV (Burgess & Davison 2002). Provavelmente, na malária aviária o aumento da expressão da molécula co-estimulatória CD28<sup>+</sup> esteja associado à ativação de linfócitos T e à resposta imune celular efetora contra a infecção. As aves dos grupos co-infectado e CAV provavelmente apresentaram diminuição no número de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> em função do quadro de imunossupressão, contribuindo assim para a diminuição da resposta. O aumento do número de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> no grupo *P. juxtannucleare* possivelmente está associado ao maior estímulo destas células proporcionado pela infecção experimental. A diminuição do número destes dois tipos celulares nos pintinhos do grupo CAV bem como a diminuição do número de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHCI<sup>+</sup> em aves do

grupo co-infectado provavelmente estão associadas ao quadro de imunossupressão, levando a diminuição da resposta imune, principalmente observada 14 dias após a inoculação do vírus. Para explicações mais concretas e suposições sobre os mecanismos envolvidos nessas respostas imunológicas seria essencial utilizar marcadores específicos para células apresentadoras de antígenos e também de citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disto, conforme discutido anteriormente, seria ideal avaliar a resposta imune em cada um dos órgãos linfoides uma vez que diferentes trabalhos demonstraram que a resposta órgão-específica não corresponde ao observado no sangue periférico durante diferentes processos infecciosos (Berndt et al. 2006, Cacho et al. 2011). A diminuição do número de células  $CD3^+CD4^+MHCII^+$  observadas em aves do grupo CAV, nove dias após a inoculação do vírus, está de acordo com os resultados obtidos em estudos realizados anteriormente, nos quais se observaram a diminuição da expressão de  $MHCII^+$  após a infecção experimental de galinhas com o MDV, um alphaherpesvirus linfotrópico (Sarson et al. 2006, Lian et al. 2010). Interessantemente, no presente estudo não foi observado à diminuição do número de células  $CD4^+MHCII^+$  em aves co-infectadas, o que mais uma vez reforça a ideia de que neste grupo possam estar atuando mecanismos imunomodulatórios diferentes do observado no grupo exclusivamente infectado por CAV. O MHC em aves apresenta diferenças quando comparado ao MHC de mamíferos, entretanto a função é homóloga; desempenhando papel central na “vigilância imunológica” do hospedeiro e na resistência à doença (Davison et al. 2008). Em geral, o MHC participa do desenvolvimento de ambas as respostas imunes, humoral e a mediada por células (Lian et al. 2010).

Não somente avaliaram-se as células T e seu possível papel na co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV, mas também o número de células B periféricas nas aves dos diferentes grupos experimentais. O número de células B no sangue periférico de aves do grupo *P. juxtannucleare* e daquelas co-infectadas foi semelhante ao número observado destas células nas aves do grupo controle. Cabe ressaltar que células B estão presentes no sangue periférico em pequenas e variadas proporções (2-18%), (Rothwell et al. 1996) e que este fato poderia interferir na determinação dessas células, prejudicando a observação de diferenças associadas ao número destas células entre os grupos experimentais. É provável que a marcação destas células a partir da bursa de Fabricius seja mais favorável para comparações estatísticas uma

vez que estas células são encontradas em proporções menos variáveis, de 85 a 90%, neste tecido (Chrzastek et al. 2011). Mais uma vez, reforça-se aqui a necessidade de se pesquisar a resposta em órgãos específicos a fim de determinar o papel imune de subpopulações celulares na patogênese ou proteção adquirida contra determinados agentes infecciosos. No entanto, aves do grupo CAV apresentaram número de células B significativamente menor 14 e 21 dias após a infecção viral. A infecção por CAV apresenta os efeitos mais graves próximo ao 15º dia após a infecção viral, período em se observa imunossupressão grave (Adair 2000). A diminuição do número de células B neste período poderia ser explicada pela imunossupressão que ocorre no pico da infecção viral. Curiosamente, 28 dias após a infecção viral, registrou-se o aumento do número destas células em relação aos grupos controle e co-infectado. De acordo com estudos realizados anteriormente, após o 21º dia do desafio por CAV os indivíduos iniciam a recuperação e encontram-se restabelecidos no 28º dia (Hu et al. 1993, Adair 2000). Estes dados reforçam o fato de que anticorpos produzidos por linfócitos B podem desempenhar papel protetor no curso da infecção viral. Em infecções mistas por CAV e outros patógenos as aves podem apresentar maior dificuldade no restabelecimento e não desenvolver resposta protetora como seria esperado no caso de vacinação dos indivíduos (Toro et al 2006).

Os resultados desta parte do trabalho sugerem que aves co-infectadas com *P. juxtannucleare*-CAV apresentam perfil de resposta imunológica diferenciada quando comparados aos indivíduos infectados exclusivamente por um dos patógenos, acarretando prejuízo na recuperação da infecção após período prolongado (28 dias da infecção por *P. juxtannucleare*). É importante mencionar que a co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV pode constituir um modelo adequado para verificar, no sangue periférico, alterações celulares que podem modular ambas as infecções. Isso, porque se utilizaram aves jovens livres de patógenos mantidas em ambientes controlados, eliminando a participação de demais agentes infecciosos comumente encontrados em galinhas domésticas. Nestas circunstâncias, o modelo é adequado para se investigar quais e como os mecanismos imunológicos atuam na modulação das infecções simples ou mistas, tema que pretendemos abordar futuramente.

## 7. Conclusões

- A cepa de *P. juxtannucleare* (FMV) utilizada neste estudo apresenta caráter patogênico quando inoculada experimentalmente em pintinhos SPF. Apesar de ocasionar baixas parasitemias, a infecção causou quadros de anemia, diminuição do ganho de peso, hepatoesplenomegalia, hidropericárdio e morte em animais jovens experimentalmente infectados.
- A co-infecção *Plasmodium juxtannucleare* –CAV apresenta efeito sinérgico; os sinais mais graves da infecção, tais como o aumento da parasitemia e da mortalidade, assim como a redução acentuada do número de hemácias, hematócrito, hemoglobina são detectados em aves co-infectadas.
- A co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV determina lesões macro e microscópicas moderadas, menos pronunciadas do que aquelas verificadas para animais com a infecção exclusiva por um dos patógenos.
- A infecção por *P. juxtannucleare* determina o aumento de leucócitos totais e de linfócitos acompanhado pela diminuição do número de heterófilos. A co-infecção *P. juxtannucleare*-CAV apresenta efeito imunossupressor caracterizado pela diminuição de leucócitos totais, linfócitos e de heterófilos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Adair BM 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Develop Compar Immunol* 24: 247-255.

Akiba K 1959. Studies on avian malaria: On the species of *Plasmodium* from chicken in Japan (*P. japonicum* Ishiguro, 1957 a synonym for *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941). *Jap J Vet Sci* 21: 18.

Al Dabagh MA 1960. The effects of splenectomy on *Plasmodium juxtannucleare* infections in chicks. *Trans R S Trop Med Hyg* 54: 400-405.

Al Dabagh MA 1961. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. *J Comp Pathol* 71: 217-221.

Alley MR, Hale KA, Cash W, Ha HJ, Howe L 2010. Concurrent avian malaria and avipox virus infection in translocated South Island saddlebacks (*Philesturnus carunculatus carunculatus*). *N Z Vet J*. 58: 218-23.

Asghar M, Westerdahl H, Zehtindjiev P, Ilieva M, Hasselquist D, Bensch S 2012. Primary peak and chronic malaria infection levels are correlated in experimentally infected great reed warblers. *Parasitol*. 139:1246-52.

Atkinson CT, Van Riper III C 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian hematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In Bird-parasite interactions: ecology, evolution, and behavior (ed. J. Loye & M. Zuk). New York: Oxford University Press 19-48 pp.

Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J Wildl Dis*. 36:197-204.

Barreto MP 1943. Malária aviária: III. Sobre o encontro das formas exoeritrocíticas do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Hospital*, 24: 643-645.

Beadell JS, Ishtiaq F, Covas R, Melo M, Warren BH, Atkinson CT, Bensch S, Graves GR, Jhala YV, Peirce MA, Rahmani AR, Fonseca DM, Fleischer RC 2006. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proc R Soc. B* 273: 2935–2944.

Beirão BC, Fávoro C Jr, Nakao LS, Caron LF, Zanata SM, Mercadante AF 2012. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. *Vet Immunol Immunopathol.* 145: 32-41.

Belo NO, Pinheiro RT, Reis SE, Ricklefs RO, Braga EM 2011. Host species and parasite lineage diversity of haemosporidians in three different environments with distinct levels of disturbance. *Plos one* 6: 17654.

Belo NO, Rodríguez-Ferraro A, Braga EM, Ricklefs RE 2012. Diversity of avian haemosporidians in arid zones of northern Venezuela. *Parasitol.* 139:1021-8

Beltrán E 1943. Características de uma cepa mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Rev Inst Salubridad enferm trop.* 4: 265-272.

Bennett FG, Warren M 1966A. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941.I. Description of the stages in the vertebrate host. *J Parasitol.* 52: 565-569.

Bennett FG, Warren M, Cheong WH 1966B. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941.II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. *J Parasitol.* 52: 647-652.

Bennett FG, Warren M 1966C. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941.III. Life Cycle of the erythrocytic parasite in the avian host. *J Parasitol.* 52: 653-659.



Bennett GF, Bishop MA, Peirce MA 1993. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. *Syst Parasitol.* 26: 171-179.

Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc R Soc B.* 267: 1583–1589.

Bensch S, Åkesson S 2003. Temporal and spatial variation of haematozoan in Scandinavian willow warblers. *J. Parasitol.* 89:388-391.

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J 2009. A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Mol Ecol Resour.* 9: 1353-1358.

Berndt A, Pieper J, Methner U 2006. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun.* 74: 3967-78.

Bichet C, Cornet S, Larcombe S, Sorci G 2012. Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Exp Parasitol.* 132: 417-23.

Bishop M A, Bennett GF 1992. Host-parasite catalogue of the avian haematozoa, supplement 1, and bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa, supplement 2. *Occ Pap Biol Mem Univ Newfoundland* 15:1–244.

Bonneaud C, Sepil I, Mila B, Buermann W, Pollinger J, Sehgal RNM, Valkiūnas G, Iezhova TA, Saatchi S, Smith TB 2009. The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *J Trop Ecol.* 25: 439-447.

Braga EM, Silveira P, Belo ON, Valkiūnas G 2011. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 3-11.

Brentano L, Mores N, Wentz I, Chandratilleke D, Schat K 1991. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis* 35: 793-800.

Brentano L, Silva BG, Sayd S, Flores SW 2000. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas (CAV) em matrizes de corte no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2: 163-175.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen C L, Wertheim-van DPM, van der Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28, 495-503.

Bülow V von, Fuchs B, Vielitz E, Landgraf H 1983. Frühsterblichkeitssyndrom bei Küken nach Doppelinfection mit dem Virus der Marekschen Krankheit (MDV) und einem Anämie-Erreger (CAA). *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, B30, 742-750.

Burgess SC, Davison TF 2002. Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: recognition by the monoclonal antibody AV37. *J Virol.* 76: 7276-92.

Campbell TW 1995. Common Avian Blood Parasites. In: *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State Press, Ames, Iowa, 30-34 p.

Cardona CJ, Oswald WB, Schat KA 2000. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *J. Gen. Virol.* 81:2067-2075.

Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM 2003. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella gallinarum*. *Arq. Inst. Biol.* 70: 35-42.

Celli A, Sanfelice F 1891. Ueber die parasiten des roten blutkörperchens im Menschen und tieren. "In Valkiūnas G 2005. Avian Malaria parasites and others Haemosporidia. 932p.

Chasar A, Loiseau C, Valkiūnas G, Iezhova T, Smith TB, Sehgal RN 2009. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol Ecol.*18:4121-33.

Chalwe V, Van Geertruyden JP, Mukwamataba D, Menten J, Kamalamba J, Mulenga M, D'Alessandro U 2009. Increased risk for severe malaria in HIV-1-infected adults, Zambia. *Emerg Infect Dis.* 15: 749.

Chettle NJ, Eddy RK, Wyeth PJ, Lister SA 1989. An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. *Vet Record.* 24: 211-215.

Chrzastek K, Madej JP, Mytnik E, Wieliczko A 2011. The influence of antibiotics on B-cell number, percentage, and distribution in the bursa of Fabricius of newly hatched chicks. *Poult Sci.* 90: 2723-9.

Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG 1971. The primate malarias. US Government Printing Office, Washington, 366pp.

Coatney GR 1971. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg.* 20:795-803.

Coggeshall L, Eaton M 1938. The complement fixation reaction in monkey malaria. *J Exp Med.* 31: 871-882.

Craig MI, Rimondi A, Delamer M, Sansalone P, König G, Vagnozzi A, Pereda A 2009. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during *Avian Dis* 3: 331-335.

Dalgaard TS, Norup LR, Rubbenstroth D, Watrang E, Juul-Madsen HR 2010. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution. *Vet Immunol Immunopathol.* 138: 85-94.

Davison F, Bernd K, Schat KA 2008. Avian Immunology. Academic Press Ed., Elsevier Burlington, USA. 496p.

Del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, Lillehoj EP, Sánchez-Acedo C 2011. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine* 29: 3818-25.

Dhanapala SB 1962. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fowls in Ceylon. *Rev Malariol.* 41:39-46.

Drechsler Y, Bohls RL, Smith R, Silvy N, Lillehoj H, Collisson EW 2009. An avian, oncogenic retrovirus replicates in vivo in more than 50% of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from an endangered grouse. *Virology* 386: 380-6.

Elisei C, Souza, PC, Massard CL, Soares CO 2001. Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitol al día* 25: 12-18.

Elisei C, Fernandes KR, Forlano MD, Madureira RC, Scofield A, Yotoko KSC, Soares CO, Araújo FR, Massard CL 2007. Morphology and morphometry of three *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae) isolates. *Rev. Bras. Parasitol Vet.* 16:139-144.

Ejiri H, Sato Y, Kim KS, Tsuda Y, Murata K, Saito K, Watanabe Y, Shimura Y, Yukawa M 2011. Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro wetland, a subarctic zone of Japan. *J Med Entomol* 48: 904-908.

Eltahir YM, Qian K, Jin W, Wang P, Qin A 2011. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virology* 438:145.

Farias ME, Atkinson CT, LaPointe DA, Jarvi SI 2012. Analysis of the trap gene provides evidence for the role of elevation and vector abundance in the genetic diversity of *Plasmodium relictum* in Hawaii. *Malar J.* 11:305.

Farkas T, Maeda K, Sugiura H, Kai K, Hirai K, Otsuki K, Hayashi T A 1998. serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. *Avian Patho.* 27:316-320.

Fecchio A, Lima MR, Silveira P, Braga EM, Marini MA 2011. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil *Emu* 111:132-138.

Frevert U, Späth GF, Yee H 2008. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. *Intern J Parasitol* 6: 655-672.

Galbadón A, Ulloa G 1977. *Plasmodium (Haemamoeba) tejerai* sp. n. en pavo domestico (*Melleagris gallopavo*) del Venezuela. *Bol Dir Malariol y San Amb.* 17: 255-273.

Gallardo RA, van Santen VL, Toro H 2012. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift. *Avian Pathol* 5: 451-458.

Garnham PCC 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Sci. Public. Oxford. 1114 pp.

Ghosh AK, Jacobs-Lorena M 2009. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Curr Opin Microbiol.* 12: 394-400.

Godfrey RD, Jr Fedynich AM, Pence DB 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *J Wildl Dis* 23: 558-565.

Goryo M, Hayashi S, Yoshizawa K, Umemura T, Itakura C, Yamashiro S 1989. Ultrastructure of the thymus in chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol* 18: 605-617.

Graczyk TK, Cranfield MR, Shaw ML, Craig LE 1994. Maternal antibodies against *Plasmodium* spp. in African black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) chicks. *J Wildl dis.* 30: 365-371.

Graczyk TK, Cranfield MR . 1996. A model for the prediction of relative titres of avian malaria and *Aspergillus* spp. IgG in Jackass penguin (*Spheniscus demersus*) females based on maternal IgG in egg-yolk. *Int J Parasitol.* 26:749-54.

Grim KC, van der Merwe E, Sullivan M, Parsons N, Mc Cutchan TF, Cranfield M 2003. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *J Zoo Wildl Med.* 34: 250-255.

Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Haridy M, Goryo M, Sasaki J, Okada K 2009. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus. *Avian Pathol.* 38: 469-483.

Hellgren O, Waldenström J, Bensch S 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol.* 90: 797-802.

Hellgren O, Križanauskienė A, Valkiūnas G, Bensch S 2007. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *J Parasitol.* 93: 889-896.

Hoop RK, Guscetti F, Keller B 1992. An outbreak of infectious chicken anemia in fattening chickens in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd* 134:485–489.

Hoop RK 1993. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Vet Rec* 22: 551-552.

Hu LB, Lucio B, Schat KA 1993. Depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.* 37: 492-500.

Huchzermeyer FW 1993. A host-parasite list of the haematozoa of domestic poultry in sub-Saharan Africa and the isolation of *Plasmodium durae* Herman from turkeys and francolins in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 60:15-21.

Huelsenbeck JP, Ronquist F 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-5.

Iezhova TA, Valkiūnas G, Bairlein F 2005. Vertebrate host specificity of two avian malaria of the subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. *J Parasitol.* 91: 472-475.

Ishiguro H 1957. *Plasmodium japonicum*, a new species of malaria parasite pathogenic for the domestic fowl. *Bull Fac Agri Yamaguti Univ* 8: 723-32.

Itagaki K 1970. An avian malaria in Japan. *J Parasitol.* 56: 164.

Fallon, SM, Bermingham E, Ricklefs RE 2003. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution* 57: 606–615.

Fernando MA, Dissanaiké AS 1975. Studies on *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium juxtannucleare* from the Malayan jungle fowl *Gallus gallus spadiceus*. *South Asian J Trop Med Public Health* 6: 25-32.

Frevert U, Spaeth G, Yee H 2008. Exoerythrocyte development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. *Int J Parasitol.* 38:655-672.

Juhl J, Permin A 2002. The effect of *Plasmodium gallinaceum* on a challenge infection with *Ascaridia galli* in chickens. *Vet Parasitol* 1: 11-19.

Kaushal DC, Carter R, Miller LH, Krishna G 1980. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. *Nature* 31:490-492.

Khasnis AA, Karnad DR 2003. Human immunodeficiency virus type 1 infection in patients with severe falciparum malaria in urban India. *J Postgrad Med* 49: 114-

117.

Kimura M, Darbro JM, Harrington LC 2010. Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. *J Parasitol* 96:144-151.

Koskela K, Arstila TP, Lassila O 1998. Costimulatory function of CD28 in avian gammadelta T cells is evolutionarily conserved. *Scand J Immunol*. 48: 635-41.

Kretzli AU 1971. Estudos sobre a prevalência, biologia e transmissão de o *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 73p.

Kretzli AU 1972A. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14: 235-245.

Kretzli AU 1972B. Pedunculate oocysts in a Brazilian strain of *Plasmodium juxtannucleare*. *J. Parasitol*. 58: 630.

Kretzli AU 1994. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: a retrospective overview and present goals. *Ciênc Cult*. 46: 446-454.

Križanauskienė A, Hellgren O, Kosarev V, Sokolov L, Bensch S, Valkiūnas G 2006. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome B gene sequences. *J Parasitol*. 92:1319-1324.

Križanauskienė A, Pérez-Tris J, Palinauskas V, Hellgren O, Bensch S, Valkiūnas G 2010. Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. *Parasitol*. 137: 217-227.



- Kuscu B, Gurel A 2008. Lesions in the thymus and bone marrow in chicks with experimentally induced chicken infectious anemia disease. *J Vet Science* 1:15-23.
- Laird M 1998. Avian malaria in the asian tropical subregion. Springer-Verlag, Singapore, 130 pp.
- Lamichhane CM, Snyder DB, Girschick T, Goodwin MA, Miller SL 1991. Development and comparison of serologic methods for diagnosing chicken anemia virus infection. *Avian Dis.* 36: 725–729.
- Lapointe DA, Hofmeister EK, Atkinson CT, Porter RE, Dusek RJ 2009. Experimental infection of Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*) with West Nile virus and competence of a co-occurring vector, *Culex quinquefasciatus*: potential impacts on endemic Hawaiian avifauna. *J Wildl Dis.* 45: 257-71.
- Latimer KS, Tang KN, Goodwin MA, Steffens WL, Brown J 1988. Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. *Avian Dis.* 32: 760-72.
- Levin II, Outlaw DC, Vargas HF, Parker PG 2009. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biol Conserv.* 142: 3191-3195.
- Lian L, Qu LJ, Zheng JX, Liu CJ, Zhang YP, Chen YM, Xu GY, Yang N 2010. Expression profiles of genes within a subregion of chicken major histocompatibility complex B in spleen after Marek's disease virus infection. *Poult Sci.* 89: 2123-9.
- Liang M, Zhao Q, Liu G, Yang S, Zuo X, Cui G, Zhong S, Sun J, Liu J, Zhu R 2013. Pathogenicity of *Bordetella avium* under immunosuppression induced by Reticuloendotheliosis virus in specific-pathogen-free chickens. *Microbial Pathog* 54: 40-45.
- Loiseau C, Iezhova TA, Valkiūnas G, Chasar A, Hutchinson A, Buermann W, Smith T, Sehgal R N 2010. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. *J Parasitol.* 96: 21-29.

Lourenço-de-Oliveira R, Castro FA 1991. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 Natural Vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 87-94.

Loving CL, Brockmeier SL, Vincent AL, Palmer MV, Sacco RE, Nicholson TL 2010. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. *Microbial Pathogen* 49: 237-245.

Lucas AM, Jamroz C 1961. Atlas of Avian Haematology. Washington, DC: U.S.D.A., (Monograph, 25), 271p.

Lucena DT 1939. Malaria aviária: Subsídios para sua sistemática e transmissão, PhD Thesis, Jornal do Commercio, Recife, 126 pp.

Lyimo IN, Keegan SP, Ranford-Cartwright LC, Ferguson HM 2012. The impact of uniform and mixed species blood meals on the fitness of the mosquito vector *Anopheles gambiae*: does a specialist pay for diversifying its host species diet? *J Evol Biol* 3: 452-60.

Macchi BM, Quaresma JAS, Herculano AM, Crespo-López M, DaMatta RA, Nascimento JLM 2010. Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: Brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. *Vet Parasitol* 172:16–22.

Marín SYG, Barrios PR, Rios RL, Resende M, Resende JS, Santos BM, Martins NRS 2012. Molecular characterization and epidemiology of infectious anemia virus from subsistence and industrial chickens in Minas Gerais, Brazil. WPC 2012 - *Salvador - Bahia – Brasil*.

Martinsen ES, Paperna I, Schall JJ 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitol.* 133: 279-288.

Marzal A, Bensch S, Reviriego M, Balbontin J, De Lope F 2008. Effects of malaria double infection in birds: One plus is not two. *J Evol Biol.* 21: 979-987.

Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, Albayrak T, Arriero E, Bonneaud C, Czirájk GA, Ewen J, Hellgren O, Hořáková D, Iezhova TA, Jensen H, Križanauskienė A, Lima MR, de Lope F, Magnussen E, Martin LB, Møller AP, Palinauskas V, Pap P L, Pérez-Tris J, Sehgal RN, Soler M, Szöllosi E, Westerdahl H, Zetindjiev P, Bensch S 2011. Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 7: e21905.

Massard CL, Massard CA 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Rev Brasil Med Vet.* 4: 3-23.

Massard CL 1982. Caracterização do parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidea: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* L. da raça Leghorn Branca. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 5: 141-146.

McNeilly F, Smyth JA, Adair BM, McNulty MS 1995. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.* 39: 532–537.

McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW, Todd D 1991. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 35: 263–268.

Mohan RN, Manwell RD 1966. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus* sp.) *J Parasitol.* 55: 543.

Møller AP, Nielsen JT 2007. Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. *Ecology* 88: 871-881.

Mota RA 1997. Variações hematológicas em *Gallus gallus domesticus* de criações da região do Recife naturalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare*. PhD tese.

Instituto de Biologia-Medicina Veterinária, Parasitologia veterinária, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil 58 p.

Mota RA, Cunha ELP, Soares CO, Alves LC, Massard, CL 1998. Variáveis hematológicas em *Gallus gallus domesticus* L. 1758 de criações da região metropolitana do Recife naturalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare*, Versiani e Gomes 1941.. *Ciênc Vet Trop Recife* 1: 76-80.

Murata K, Nii R, Sasaki E, Ishikawa S, Sato Y, Sawabe K, Tsuda Y, Matsumoto R, Suda A, Ueda M 2008. *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* infection in a captive white eared-pheasant (*Crossoptilon crossoptilon*) at a Japanese zoo. *J Vet Med Sci.* 70: 203-205.

Nagao E, Arie T, Dorward DW, Fairhurst RM, Dvorak JA 2008. The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. *J Struct Biol* 3: 460-467.

Natt MP, Herrick CA 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chickens. *Poult Science* 31: 182.

Neto JM, Arroyo JL, Bargain B, Monrós JS, Mátrai N, Procházka P, Zehindjiev 2012. Phylogeography of a habitat specialist with high dispersal capability: the Savi's Warbler *Locustella luscinioides*. *PLoS one* 7:e38497.

Njabo KY, Cornel AJ, Sehgal RN, Loiseau C, Buermann W, Harrigan RJ, Pollinger J, Valkiūnas G, Smith TB 2009. Coquillettidia (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. *Malar J.* 8:193.

Njabo KY, Cornel AJ, Bonneaud C, Toffelmier E, Sehgal RNM, Valkiūnas G, Russell AF, Smith TB 2011. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Mol Ecol.* 20: 1049-1061.

Nogueira EO, J Piantino FA, Martins SR, Luiz DE, Lazzarin S, Brentano L 2007. Genome sequencing analysis of Brazilian chicken anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30: 81-96.

Noland GS, Briones N, Sullivan DJ 2003. The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130:91–99.

Oliveira CE 2001. Criopreservação e caracterizações morfológica, morfométrica e ultra-estrutural de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, 64p.

Oluwayelu DO, Todd D 2008. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *African J Biot.* 7: 271-275.

Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y 1992. Persistence of maternal antibody to chicken anemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathol.* 21: 147-151.

Pacheco MA, Escalante A, Garnerc MM, Bradleyd GA, Aguilar RF 2011. Haemosporidian infection in captive masked bobwhite quail (*Colinus virginianus ridgwayi*), an endangered subspecies of the northern bobwhite quail. *Vet Parasitol.* 182:113-120.

Palinauskas V, Kosarev V, Shapoval A, Bensch S, Valkiūnas G 2007. Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Zootaxa* 1626: 39-50.

Palinauskas V, Valkiūnas G, Bolshakov CV, Bensch S 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Exp Parasitol.* 120: 372-380.

Palinauskas V, Valkiūnas G, Krizanauskiene A, Bensch S, Bolshakov CV 2009. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on

experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone. *Exp Parasitol.* 123:134-9.

Palinauskas V, Valkiūnas G, Bolshakov CV, Bensch S 2011. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): The effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. *Exp Parasitol.* 127: 527-533.

Paraense WL 1947. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocitário do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani e Gomes 1941. *Ibid* 45: 813-824.

Paraense WL 1949. Um inquérito sobre a ocorrência do *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (MG.). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 41:361-365.

Paraense WL 1950. Differences among some strains of *Plasmodium juxtannucleare* concerning the production of exorythrocytic forms in a single species of host. In: *Congresso Internacional de Microbiologia*, Rio de Janeiro, 185p.

Paulman A, McAllister MM 2005. *Plasmodium gallinaceum*: clinical progression, recovery, and resistance to disease in chickens infected via mosquito bite. *Am J Trop Med Hyg.* 73: 1104–1107.

Perkins SL 2000. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proc R S Biol Sci* 267: 2345-2350.

Perkins SL, Schall JJ 2002. A molecular phylogeny of malaria parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. *J Parasitol.* 88: 972-978.

Permin A, Juhl J 2002. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Vet Parasitol.* 105: 1-10.

Peters MA, Crabb B, Tivendale K, Browning GF 2007. Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2. *J Gen Virol.* 88: 2168-2175.

- Pope CR 1991. Pathology of lymphoid organs with emphasis on immunosuppression. *Vet Immunol Immunopathol* 30: 31-44.
- Poulsen J, Permin A, Hindsbo O, Yelifari L, Nansen P, Bloch P. 2000. Prevalence and distribution of gastro-intestinal helminths and haemoparasites in young scavenging chickens in upper Eastern region of Ghana, West Africa. *Prev Vet Med.* 45:237–245.
- Ragland WL, Mazija H, Cvelic-Cabrilo V, Savic V, Novak R, Pogacnik M 1998. Immunesuppression of commercial broilers in Croatia, Slovenia, and Bosnia and Herzegovina from 1981 to 1991. *Avian Pathol* 2: 200-204.
- Rautenschlein S, Yeh HY, Sharma JM 2002. The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Vet Immunol Immunopathol.* 89:159-67.
- Ribeiro SF, Sebaio F, Branquinho FCS, Braga EM 2005. Avian malaria in Brazilian passerini birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.* 3: 261-267.
- Ricklefs RE, Fallon SM 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc R Soc B.* 269: 885–892.
- Ricklefs RE, Outlaw DC 2010. A molecular clock for malaria parasites. *Science* 329: 226-229.
- Richard FA, Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J Parasitol.* 88: 819-822.
- Rosenberger JK, Cloud SS 1989. The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Dis.* 33:753–759.
- Rosenberger JK, Cloud SS 1998. Chicken anemia virus. *Poult Sci.* 77:1190–1192.

- Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF 1996. Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol.* 55: 225-234.
- Santiago-Alarcon D, Havelka P, Schaefer HM, Segelbacher G 2012. Bloodmeal analysis reveals avian *Plasmodium* infections and broad host preferences of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) vectors. *PLoS One* 7: e31098.
- Santos-Prezoto HH, D'Agosto M, Daemom E 2004. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitol Latinoam.* 59: 14-20.
- Sarson AJ, Abdul-Careem MF, Zhou H, Sharif S 2006. Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease viral infection. *Viral Immunol.* 19: 747-758.
- Schat KA 2009. Chicken anemia virus. *Cur Top Microbiol Immunol* 331: 151-183.
- Sehgal RNM 2010. Deforestation and avian infectious diseases. *J Exp Biol* 213: 955-960.
- Sehgal RNM, Buermann W, Harrigan RJ, Bonneaud C, Loiseau C, Chasar A, Sepil L, Valkiūnas G, Iezhova TA, Saatchi S, Smith TB 2011. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest bird. *Proc R Soc B.* 278: 1025-1033.
- Seliger C, Schaerer B, Kohn M, Pendl H, Weigend S, Kaspers B, Härtle S. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 145: 86-99.
- Serra-Freire NM, Massard CL 1976. Ocorrência e incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém- Pará. Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Belém, Pará.
- Serra-Freire NM, Massard CL 1979. *Plasmodium juxtannucleare* Versiane & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. , *Meleagris gallopavo* L. e *Crysolophus* spp. na



região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, 20: 45-48.

Silveira P, Vashist U, Cabral A, Amaral K B, Soares GLG, D'Agosto M 2009<sup>a</sup>. Effect of Rutin and Chloroquine on White Leghorn chickens infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. *Trop Anim Health Prod*. 41:1319-1323.

Silveira P, Damatta RA, D'Agosto M 2009<sup>b</sup>. Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. *Vet Parasitol*. 162: 257-62.

Sinden RE, Smalley ME 1979 Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: the cell-cycle. *Parasitol*. 79:277-296.

Smyth JA, Moffett DA, McNulty MS, Todd D, Mackie DP 1993. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis* 37: 324-38.

Snoeck CJ, Komoyo GF, Mbee BP, Nakouné E, Le Faou A, Okwen MP, Muller C P 2012. Epidemiology of chicken anemia virus in Central African Republic and Cameroon. *Virol J* 1:189.

Soares CO, Massard CL, Fonseca AH, Souza, PC 1999A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: plasmodiidae). *Parasitol al día* 23: 87-90.

Soares CO, Souza PC, Mota RA, Fonseca AH, Massard CL 1999B. Parasitismo de leucocitos y trombocitos de *Gallus gallus* L. por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: plasmodiidae). *Parasitol al día* 23: 44-47.

Souza, PCA 1998. Malária aviária: parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos Clínicos e patológicos de sua infecção

experimental Ph.D. Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 137p.

Souza PCA, Elisei C, Soares CO, Massard CL 2000. Criopreservação de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* con glicerol. *Parasitol. día* 24: 22-26.

Tan J, Tannock GA 2005. Role of viral load in the pathogenesis of chicken anemia virus. *J Gen Virol.* 86: 1327-1333.

Tan Y, Zhu R, Wang H, Wang X, Wei K, Sun Z, Sheng P 2011. Establishment of multiple PCR detection for pathogens of chicken embryos. *Chin J Prev Vet Med* 33: 374-377.

Thompson JD, Desmond GH, Toby JG 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Todd D, Mawhinney KA, McNulty MS 1992. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1661-1666.

Todd D 2004. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.* 98:169–174.

Toro HA, van Santen VL, Hoerr FJ, Breedlove C 2009. Effects of Chicken Anemia Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Commercial Chickens. *Avian Dis.* 53:94-102.

Thrall M A 2007. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária 1º ed. Roca: São Paulo, 582p.

Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.* 23:366–385.

Yamada KA, Sherman IW 1979. *Plasmodium lophurae*: Composition and properties of hemozoin, the malarial pigment. *Exp Parasitol.* 48:61-74.

Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y 1993. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunol* 79: 32-37.

Waknine-Grinberg JH, Hunt N, Bentura-Marciano A, McQuillan JA, Chan HW, Chan WC, Barenholz Y, Haynes R, Golenser J 2010. Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J.* 9:227.

Wedderburn N, Turk JL, Davies DR, Hutt MS 1978. Chronic malarial infection of mice: A comparison of single and multiple infections with *Plasmodium berghei* following *P. yoelii*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 72:610-614.

Williams RB 2005. The efficacy of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Vet Parasitol.* 129: 193–207.

Wintrobe MM 1934. Variations in the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various invertebrates. *Fol Hematol.* 51: 32-49.

Withers DR, Young JR, Davison TF 2005. Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. *Viral Immunol.* 18:127-37.

Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 pp.

Valkiūnas G, Anwar AM, Atkinson CT, Greiner EC, Paperna I, Peirce MA 2005. What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians? *Trends Parasitol.* 21: 357-358.

Valkiūnas G, Bensch S, Iezhova TA, Krizanauskienė A, Hellgren O, Bolshakov CV 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *J Parasitol.* 92: 418-422.

Valkiūnas G, Iezhova TA, Križanauskienė A, Palinauskas V, Sehgal RNM, Bensch S 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J Parasitol.* 94: 1395-1401.

Van Dyke K, Lantz C, Szustkiewicz C 1970. Quinacrine: mechanisms of antimalarial action. *Science* 31:492-493.

van Riper III C, Atkinson CT, Seed TM 1994. Plasmodia of birds. In: Parasitic protozoa (Ed.), Kreier, J. P., San Diego, CA: Academic Press, 73–140 pp.

Vashist U, Silveira P, Cabral A, Amaral KB, Soares GLG, D'Agosto M 2008. Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L., 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941. *Rev Bras Parasitol Vet.* 17: 220-223.

Vashist U 2011. Avaliação biológica bioquímica e histopatológica das infecções causadas por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* L. 1758. PhD Tese Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 124p.

Vashist U, Falqueto AD, Lustrino D, Tunholi VM, Tunholi-Alves VM, dos Santos MA, D'Agosto M, Massard CL, Pinheiro J 2011. Hepatic profile of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Vet Parasitol.* 175: 207-211.

Vaziry A, Silim A, Bleau C, Frenette D, Lamontagne L 2011. Chicken infectious anaemia vaccinal strain persists in the spleen and thymus of young chicks and induces thymic lymphoid cell disorders. *Avian Pathol.* 40: 377-385.

Versiani V, Gomes BF 1941. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* n. sp.(nota prévia). *Rev Bras biol.* 1:231-233.

Versiani V, Gomes BF 1943. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita da galinha doméstica (Notas adicionais). *Rev Bras biol* 3: 113-117.

Zehtindjiev P, Ilieva M, Westerdahl H, Hansson B, Valkiūnas G, Bensch S. 2008. Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Exp Parasitol.* 119: 99–110.

Zehtindjiev P, Križanauskienė A, Bensch S, Palinauskas V, Asghar M, Dimitrov D, Scebba S, Valkiūnas G 2012. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome B gene. *J Parasitol.* 98:657-65.

Apoio Financeiro: CNPq