



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ana Olívia de Almeida Reis

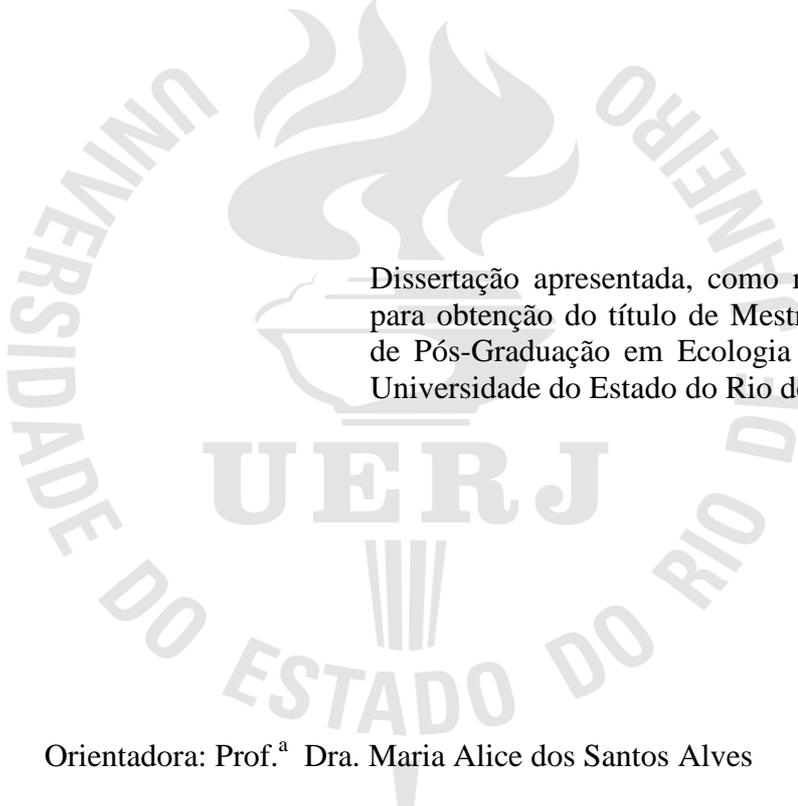
**As aves antárticas estão livres de hemoparasitos? Um estudo de caso de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e de skuas (*Catharacta* spp.) antárticos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.**

Rio de Janeiro

2013

Ana Olívia de Almeida Reis

**As aves antárticas estão livres de hemoparasitos? Um estudo de caso de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e de skuas (*Catharacta* spp.) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.**



-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Alice dos Santos Alves

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/ REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CTC/A

R375

Reis, Ana Olívia de Almeida.

As aves antárticas estão livres de hemoparasitos?:um estudo de caso de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e de skuas (*Catharacta* spp.) antárticos da Baía do Almirantado, Ilha Rei, Antártica/ Ana Olívia de Almeida Reis. - 2013.

53 f.: il.

Orientadora: Maria Alice dos Santos Alves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Parasitismo – Teses. 2. Ave marinha – Admiralty, Baía (Shetland do Sul, Ilhas) -Teses. 3. Ave – Migração. I. Alves, Maria Alice dos Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU591.557.8

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Ana Olívia de Almeida Reis

**As aves antárticas estão livres de hemoparasitos? Um estudo de caso de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e de skuas (*Catharacta* spp.) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de junho de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Alice dos Santos Alves

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes- UERJ

---

Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta

Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Erli Schneider Costa

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Keiko Toma

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maja Kajin

Instituto de Biologia Roberto Alcantara – UERJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Eliana, ao Léo e à minha pequena Valentina, que hoje, são meu porto-seguro e foram essenciais nessa importante realização.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou, confiou em mim e respeitou os caminhos que escolhi para seguir, agradeço principalmente à minha mãe, Eliana, por todo carinho, amor, incentivo e apoio. E à minha linda família que nasceu durante esse trabalho, agradeço ao meu companheiro, marido, namorado e amigo Léo, e ao fruto desse amor, minha filha Valentina, que nasceu para me dar mais força e coragem para encarar a vida e ser uma pessoa bem melhor...Ao meu padrasto Ricardo, pelo incentivo e confiança. À minha sogra, Ivani, agradeço pelos cuidados e dedicação com a neta e pela generosidade, sempre disposta a ajudar... Ao meu pai, pelo orgulho de ter uma filha “bióloga”.

À minha orientadora Dra. Maria Alice dos Santos Alves, pela sabedoria, ensinamentos, cumplicidade, oportunidades e pelo apoio e confiança em mim, acima de tudo. Aos membros do Laboratório de Ecologia de Aves da UERJ, pelo companheirismo, principalmente aos amigos Liliane e Christiano. Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ, principalmente à Paula Martins, pela ótima convivência e amizade.

À Dra. Erli Schneider Costa, pela co-orientação, me acompanhando desde a monografia de conclusão de curso, até o presente... pelas oportunidades, pela atenção, pela disponibilidade e por gerenciar as coletas desse trabalho quando eu não estava na Antártica.

A toda equipe do Projeto Pinguins e Skuas, coordenado pelo Prof. Dr. João Paulo Machado Torres, aos que ajudaram nas coletas do material desse trabalho, direta ou indiretamente, principalmente Larissa Cunha e Rodrigo Meire, pela convivência maravilhosa na Estação Antártica Comandante Ferraz, e à Adriana Rodrigues de Lira Pessôa e Juliana Silva Souza.

Ao pessoal da Estação Antártica Comandante Ferraz da OPERANTAR XXIX, na qual estive presente, e da OPERANTAR XXX, pelo apoio na coleta dos dados.

Ao apoio financeiro à pesquisa pelo CNPq, Projeto CNPq/MCT 557049/2009-1 (2010/2011, coordenador Dr. João Paulo Machado Torres), pela bolsa de Produtividade em Pesquisa (308792/2009-2) com *grant* associado para a Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Alice S. Alves e pela bolsa de mestrado; e à FAPERJ (E-26/111.505/2010).

À Marinha do Brasil, por todo apoio logístico que viabilizou a coleta de dados na Antártica.

Aos membros do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-SVS/MS, da Fiocruz, principalmente ao Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta e ao Prof. Dr.

Nicolau Serra-Freire pela ajuda com as lâminas de esfregaço sanguíneo e com a identificação de hemoparasitos. Ao Leonardo Moreira pela ajuda com a coloração das lâminas, à Fernanda Barbosa pelo auxílio na observação microscópica do material, ao Alessandro Giupponi pela ajuda com as fotografias dos esfregaços e a Nicole Moura pela iniciação à análise molecular. À Prof.<sup>a</sup> Dr. Marinete pela receptividade e acolhimento.

À Prof.<sup>a</sup> Dr. Helena Keiko Toma, pelos ensinamentos sobre técnicas moleculares e pela ajuda na realização desses experimentos no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia (UFRJ), sempre solícita e disposta a ajudar. E a Sabrina Emerick por ter intermediado o encontro com a Prof.<sup>a</sup> Helena.

Ao Ralph Vanstreels, da USP, pela atenção e por tirar milhares de dúvidas sobre técnicas de confecção e armazenamento de amostras para pesquisas de hemoparasitos, quando iniciei meu projeto de Mestrado.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Denise Monnerat, da UFRRJ, pela ajuda com o protocolo da confirmação de sexo em aves.

Às amigas Graziela Mello e Marcela Granato, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, que estão “crescendo” profissionalmente junto comigo, estando presentes em todas as etapas importantes da minha vida.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.

*Albert Einstein*

## RESUMO

REIS, Ana Olívia de Almeida. **Asaves antárticas estão livres de hemoparasitos?** Um estudo de caso de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e de skuas (*Catharacta* spp.) antárticos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O parasitismo é uma importante força seletiva em populações, assim como a competição e a predação. Os parasitos sanguíneos podem afetar a coloração da plumagem, a seleção sexual e o sucesso reprodutivo em aves. As aves da região Antártica têm sido mencionadas na literatura como livres de hemoparasitos. A Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, Península Antártica, é a maior Baía da região, abrigando diferentes espécies de aves durante o período reprodutivo. Dentre elas, estão duas espécies de skuas, as mais frequentes da Antártica, skua-sub-antártica (*Catharacta lonnbergi*) e skua-polar-do-sul (*C. maccormicki*) e três espécies de pinguins, pinguim-antártico (*Pygoscelis antarctica*), pinguim-papua (*P. papua*) e pinguim-de-adélia (*P. adeliae*). Skuas e pinguins são aves que se dispersam durante o inverno austral, podendo ser potenciais reservatórios e transmissores de parasitos, embora resultados negativos de hemoparasitos tenham sido encontrados para diversas outras aves marinhas e também para a região Antártica. O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de hemoparasitos em pinguins e skuas antárticos na Baía do Almirantado. Amostras de lâminas de esfregaço sanguíneo e de sangue para análises moleculares de pesquisa de *Plasmodium/Haemoproteus* foram coletadas em dois períodos reprodutivos, de dezembro de 2010 a março de 2011 e de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012. Um total de 185 amostras de aves foram coletadas, incluindo 120 pinguins e 65 skuas. Skuas foram tiveram resultados negativos para hemoparasitos. As três espécies de pinguins foram positivas para *Plasmodium/Haemoproteus*, via técnica molecular, incluindo dois *P. papua*, dois *P. antarctica* e três *P. adeliae*. Apenas um indivíduo confirmado positivo pela técnica molecular, pertencente a *P. papua*, foi positivo utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, com diagnóstico de *Plasmodium* sp. Não houve diferença significativa entre indivíduos machos e fêmeas das espécies parasitadas, assim como entre adultos e filhotes. As aves parasitadas (n=7), foram categorizadas abaixo do peso (n=5) e acima do peso (n=2). O presente estudo é o primeiro a relatar hemoparasitos na região Antártica e também é o primeiro registro de presença de hemoprotzoários para as três espécies de pinguins analisadas. A ausência de hemoparasitos em aves antárticas tem sido justificada pela ausência de potenciais vetores na região. Portanto, é possível que os pinguins parasitados tenham adquirido a infecção durante a dispersão por ocasião do inverno austral. No entanto, skuas antárticas também são aves migratórias, que podem atingir regiões com potenciais vetores reconhecidos, mas nunca foram diagnosticadas com hemoparasitos, o que foi reforçado pelos resultados negativos do presente estudo. Nesse caso, acredita-se que skuas, podem ter um sistema imune competente ou que a ausência de hemoparasitos nessas aves seja justificada por confinamentos filogenéticos entre parasito-hospedeiro. Entretanto, pouco se sabe sobre a existência de vetores na Antártica, rotas migratórias das aves da região e especificidade parasito-hospedeiro. Os resultados inéditos encontrados no presente estudo devem, portanto, servir como ponto de partida para o entendimento das interações parasito-hospedeiro, de forma a contribuir para a preservação do ambiente antártico.

**Palavras-chave:** *Plasmodium* sp.. Aves marinhas. *Haemoproteus* spp.. Migração. Vetores. Polo Sul.

## ABSTRACT

Parasitism is an important selective pressure in populations, as well as competition and predation. Blood parasites can affect the color of plumage, sexual selection and reproductive success in birds. Antarctic birds have been mentioned in literature absent of blood parasites. Admiralty Bay is located at King George Island, Antarctic Peninsula, and is the largest bay on the region, harboring different avian species during the reproductive period. Among them, are the two most common skuas of Antarctica, the brown-skuia (*Catharacta lonnbergi*) and the south-polar-skuia (*Catharacta maccormicki*), and three penguin species, the Chinstrap (*Pygoscelis antarctica*), the Gentoo (*P. papua*) and the Adelie (*P. adeliae*). Skuas and penguins are seabirds that migrating during the southern winter, and may be potential reservoirs and transmitters of parasites. However, negative results of blood parasites have been found in several seabirds and also to the Antarctic region. The objective of this study was to investigate the presence of blood parasites in Antarctic penguins and skuas at Admiralty Bay. Blood smears and blood samples for molecular analyses to research *Plasmodium*/*Haemoproteus* were collected in two reproductive periods, from December 2010 to March 2011 and from December 2011 to March 2012. A total of 185 bird samples were collected, including 120 penguins and 65 skuas. Skuas were negative for parasites. The three species of penguins were positive to *Plasmodium*/*Haemoproteus* by molecular analysis, including two *P. papua*, two *P. antarctica* and three *P. adeliae*. Only one positive penguin by molecular technique, a *P. papua*, was positive in blood smears, diagnosed with *Plasmodium* sp. There was no significant difference between male and female individuals of the parasitized species, as well as between adults and chicks. Parasitized birds (n = 7) were categorized as underweight (n=5) and overweight (n=2). The present study is the first to report blood parasites in the Antarctic region and is also the first record of the presence of blood protozoa for the three penguin species analyzed. The absence of blood parasites in Antarctic birds has been justified by the absence of potential vectors in the region. Therefore, it is possible that the parasitized penguins acquired infection when they disperse during southern winter. However, antarctic skuas are migratory birds, and they can reach regions with recognized potential vectors, but have never been diagnosed with blood parasites, what was reinforced by data of the present study. In this case, it is believed that skuas may have a competent immune system, or that the absence of these parasites in these birds is justified by phylogenetic constraints between the host-parasite. Nevertheless, little is known about the existence of vectors in the Antarctica, migratory routes of birds in the region and parasite-host specificity. The inedited results found in this study should therefore serve as a starting point to understand the host-parasite interactions, and to contribute to the preservation of the Antarctic environment.

**Keywords:** *Plasmodium* spp.. Seabirds. *Haemoproteus* spp.. Migration. Vectors. South Pole.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Localização da Ilha Rei George, na Península Antártica, Antártica .....	18
Figura 2 -	Detalhe para localização da Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG) na Baía do Almirantado na Ilha Rei George.....	19
Figura 3 -	Skuas que se reproduzem na Baía do Almirantado, Península Antártica.....	19
Figura 4 -	Rotas e áreas de migração da skua-polar-do-sul ( <i>Catharacta maccormicki</i> ).....	20
Figura 5 -	Pinguins do gênero <i>Pygoscelis</i> que ocorrem na Baía do Almirantado, Ilha Rei Gerge, Península Antártica.....	21
Figura 6 -	Áreas de reprodução de <i>Pygoscelis adeliae</i> (representada pelos círculos) <i>P.antarctica</i> (representada pelos triângulos) e <i>P. papua</i> (representada pelos quadrados) na Antártica.....	22
Figura 7 -	Mapa da Baía do Almirantado, revelando as principais áreas livres de gelo em cinza. ....	25
Figura 8 -	Visualização das hemácias de <i>Pygoscelis papua</i> (Ppa 1) infectadas por <i>Plasmodium</i> sp.....	31
Figura 9 -	Gel de agarose após corrida em eletroforese (100V), revelando os fragmentos amplificados para <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> dos sete indivíduos de pinguins das três espécies (Pan 1; Pan 2; Ppa 1; Ppa 2; Pad 1; Pad 2; Pad 3).....	33
Figura 10	Gel de agarose após corrida em eletroforese (100V) dos pinguins positivos para parasitos, revelando dois fragmentos para fêmeas (CHD-Z e CHD-W) e um fragmento para machos (CHD-Z).....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de indivíduos examinados e parasitados por <i>Haemoproteus</i> e/ou <i>Plasmodium</i> , prevalência geral de todas as espécies de pinguins ( <i>Pygoscelis</i> spp.) e skuas ( <i>Catharacta</i> spp.) capturados e técnica de pesquisa que constatou o parasitismo, exame microscópico e técnica molecular (E.M. + PCR), somente exame microscópico (E.M.) e somente técnica molecular (PCR).....	32
Tabela 2 -	Resultados do Teste t aplicado para machos e fêmeas de cada espécie de pinguim, para comparar as médias do peso entre os sexos de cada espécie, em que a média (x), desvio padrão (SD), resultado do Teste t e probabilidade (p) foram calculados.....	34
Tabela 3 -	Sexo, faixa etária, área de coleta, peso e tipo de diagnóstico do parasitismo dos pinguins infectados por <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> .....	36

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>HEMOPARASITISMO EM AVES</b> .....	12
1.1	<b>Principais parasitos sanguíneos em aves</b> .....	13
1.1.1	<u>Filarídeos nematóides</u> .....	13
1.1.2	<u>Trypanosoma</u> .....	14
1.1.3	<u>Hepatozoon</u> .....	14
1.1.4	<u>Babesia</u> .....	14
1.1.5	<u>Leucocytozoon</u> .....	15
1.1.6	<u>Haemoproteus</u> .....	15
1.1.7	<u>Plasmodium</u> .....	16
1.2	<b>Métodos para estudo de prevalência de hemoparasitos em aves</b> .....	16
1.3	<b>Hemoparasitismo em aves antárticas</b> .....	17
1.3.1	<u>Skuas (<i>Catharacta</i> sp.) e pinguins (<i>Pygoscelis</i> sp.) antárticos</u> .....	17
1.3.2	<u>Skuas (<i>Catharacta</i> spp.)</u> .....	19
1.3.3	<u>Pinguins (<i>Pygoscelis</i> spp.)</u> .....	21
1.3.4	<u>Pesquisa de hemoparasitos em aves antárticas</u> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	23
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
3.1	<b>Área de estudo</b> .....	24
3.2	<b>Captura das aves</b> .....	25
3.2.1	<u>Skuas</u> .....	25
3.2.2	<u>Pinguins</u> .....	26
3.3	<b>Coleta de sangue para pesquisa de hemoparasitos</b> .....	26
3.3.1	<u>Confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo</u> .....	26
3.3.2	<u>Sangue para análises moleculares (pesquisa de <i>Plasmodium</i>/<i>Haemoproteus</i> e confirmação do sexo)</u> .....	27
3.4	<b>Pesquisa de hemoparasitos</b> .....	27
3.4.1	<u>Análise das lâminas de esfregaço sanguíneo</u> .....	27
3.4.2	<u>Análise molecular para pesquisa de <i>Plasmodium</i>/<i>Haemoproteus</i></u> .....	27
3.5	<b>Confirmação do sexo</b> .....	28
3.6	<b>Análises estatísticas</b> .....	29
4	<b>RESULTADOS</b> .....	29
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## INTRODUÇÃO

### 1 HEMOPARASITISMO EM AVES

A ecologia de parasitos, o estudo sobre sua diversidade e sua influência sobre seus hospedeiros, que vêm sendo bastante abordados em pesquisas científicas nas últimas décadas, são importantes para que questões relacionadas à especificidade parasito-hospedeiro, relações tróficas e até origem de espécies sejam compreendidas (SECCHI *et al.*, 2003).

Os parasitos exercem importantes pressões evolutivas e ecológicas em seus hospedeiros (QUILLFELDT *et al.*, 2010) sendo considerados, segundo alguns autores, como agentes de seleção natural das espécies (HAKKARAINEN *et al.*, 1998; MARZAL *et al.*, 2005). Dessa forma, assim como a predação e a competição, o parasitismo é uma importante força seletiva em populações, por reduzir a energia relacionada a processos fisiológicos de seus hospedeiros (SORCI *et al.*, 1996). Além disso, parasitos podem reduzir a reprodução e a sobrevivência de seus hospedeiros, resultando em declínios populacionais naturais, o que ameaça a biodiversidade (ANDERSON & MAY, 1978). Por outro lado, parasitos também podem atuar como espécies-chave, tendo um importante papel em comunidades e ecossistemas, no que se refere à manutenção da diversidade (MCCALLUM & DOBSON, 1995).

Os parasitos sanguíneos (hemoparasitos) podem atuar como reguladores do tamanho populacional de hospedeiros, podendo causar extinções de espécies de aves (FELDMAN *et al.*, 1995), além de afetar a seleção sexual, a coloração da plumagem (HŐRAK *et al.* 2001; del CERRO *et al.*, 2010) e o sucesso reprodutivo (HAMILTON & ZUK, 1982; KIRKPATRICK & RYAN, 1991; RICKLEFS, 1992; MERINO *et al.*, 2000). Além disso, indivíduos com altas cargas parasitárias podem se tornar mais suscetíveis a predadores e ter menos habilidade para estabelecer territórios (ANDERSON & MAY, 1979).

Os hemoparasitos podem ser transmitidos com relativa facilidade entre os hospedeiros a partir do repasto sanguíneo de vetores, com conseqüente inoculação das formas infectantes nas aves (VALKIUNAS, 2004). Segundo alguns estudos, uma vez infectadas por esses parasitos, as aves continuam infectadas por muitos anos ou pelo resto de suas vidas (GARNHAM, 1996; VALKIUNAS, 2005). No entanto, a prevalência de infecção varia bastante de acordo com os grupos de aves existentes (BENNET *et al.*; 1993 a, b; VALKIUNAS, 2005) e para alguns grupos, como as aves marinhas, têm-se relatado escassez ou ausência de hemoparasitos (PEIRCE & BROOKE, 1993; MERINO *et al.* 1997, MERINO

& MINGUEZ, 1998; ENGSTROM *et al.*, 2000). A prevalência também é menor em regiões com baixas temperaturas (EARLÉ & UNDERHILL, 1992), em ambientes marinhos (FIGUEROLA, 1999) e áridos (VALERA *et al.*, 2003).

### 1.1 Principais parasitos sanguíneos em aves

Diversos grupos de protozoários e helmintos se desenvolvem e se reproduzem no sangue das aves. Dentre eles, os parasitos mais documentados em aves silvestres são os filarídeos nematóides (que liberam microfírias na corrente sanguínea de seus hospedeiros, apesar de viverem em cavidades peritoneais e em tecidos do corpo) e os protozoários, representados pelos flagelados do gênero *Trypanosoma* (Filo Sarcomastigophora) que vivem no sangue periférico e os intracelulares do Filo Apicomplexa, os esporozoários, os quais completam uma parte do seu ciclo de vida no interior das células sanguíneas (GARNHAM, 1966).

Os esporozoários, representados pelos gêneros *Hepatozoon* (Ordem Haemogregarina), *Babesia* (Ordem Piroplasmida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* (Ordem Haemosporida) são os hemoparasitos encontrados com maior frequência em aves silvestres (ATKISON & VAN RIPER, 1991; VALKIÛNAS, 2005), sendo *Haemoproteus* e *Plasmodium* (protozoários causadores da malária aviária) os parasitos mais documentados para aves marinhas (revisão QUILLFELDT *et al.*, 2011).

#### 1.1.1 Filarídeos nematóides

A distribuição dos filarídeos nematóides que infectam aves é cosmopolita, já tendo sido reportados em diversos grupos. São três os gêneros relatados como parasitas de aves: *Diplotrriaena*, *Serratospiculume* *Serratospiculoides* (Sub-Ordem Spirurina) (STERNER & COLE, 2008) e podem ser transmitidos por diversos artrópodes (simulídeos, tabanídeos, culicídeos e ceratopogonídeos) (GREINER *et al.*, 1975). Tornam-se patogênicos quando ocupam os sacos aéreos de aves, principalmente das carnívoras, como relatado para as famílias da ordem Falconiformes, principalmente em gaviões e águias (família Accipitridae) da América do Norte (ver STERNER & ESPINOSA, 1988; TAFT *et al.*, 1993), o que predispõe o hospedeiro a infecções secundárias por fungos e bactérias (SAMOUR & NALDO, 2001).

### 1.1.2 *Trypanosoma*

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* podem ser transmitidos de diversas maneiras. Por vetores, na maioria dos casos da família Hippoboscidae (OLSEN *et al.*, 1964), mas também há estudos que propõem simulídeos, culicídeos e ácaros como possíveis transmissores, além de outras vias, como a ingestão do artrópode infectado e a contaminação por abrasão na pele (VOTYPKA & SVOBODOVA, 2004).

Já foram descritas mais de 100 espécies de *Trypanosoma* infectando aves, embora muitos desses registros sejam questionados (VOPTYKA *et al.*, 2002) e as espécies desse gênero são nomeadas como pertencentes ao complexo *Trypanosoma avium* (BENNET *et al.*, 1994; SEHGAL *et al.*, 2001). Apesar de pouco se saber sobre o hospedeiro e o vetor específicos para a maioria das espécies de parasitos, já foram relatados casos de morbidade e mortalidade em aves silvestres (MOLYNEUX *et al.*, 1993). No entanto, a maioria dos estudos aponta baixa patogenicidade para a maioria das aves infectadas (ATKINSON & VAN RIPER, 1991).

### 1.1.3 *Hepatozoon*

Cerca de 15 espécies de *Hepatozoon*, que têm as aves como hospedeiros, já foram descritas (BENNET *et al.*, 1992; PEIRCE *et al.*, 2003). Esses parasitos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado por meio da ingestão de um artrópode infectado (BENNET *et al.*, 1992). Informações sobre patogenicidade de *Hepatozoon* advêm de estudos com aves em cativeiro (PARTINGTON *et al.*, 1989) e pouco se conhece sobre seus efeitos em aves silvestres. Além disso, a prevalência desse parasito em aves também é pouco entendida (GREINER, 2008). No entanto, já foi reportado em diversos grupos, incluindo aves sub-antárticas, que são parasitadas por *H. albatrossi*, provavelmente transmitida pelo carrapato *Ixodes uriae*, que parasita principalmente pinguins e albatrozes dessa região (JONES, 1988; WOODS *et al.*, 2009).

### 1.1.4 *Babesia*

O ciclo de vida e a patogenicidade das espécies de *Babesia*, que infectam aves, ainda é pouco conhecido (PEIRCE, 1975), havendo 13 espécies reconhecidas (PEIRCE, 2000). No entanto, EARLÉ *et al.* (1993) relataram a morte de pinguins africanos por infecção de uma

espécie de *Babesia*, *B. peircei*. A transmissão ao hospedeiro vertebrado é feita pelo intermédio de carrapatos do gênero *Ixodes*, os quais são cosmopolitas, com representantes até na região Antártica (*I. uriae*) (JONES, 1988), embora infecções por *Babesia* sp. nunca tenham sido relatadas para essa região.

#### 1.1.5 Leucocytozoon

A transmissão dos parasitos do gênero *Leucocytozoon* é realizada por simulídeos hematófagos, com exceção de uma espécie desse gênero, que é transmitida por moscas da família Ceratopogonidae. Numerosas espécies desse parasito já foram descritas em diversas regiões do mundo, com exceção da Antártica, onde ainda não foram relatados (VALKIUNAS, 2005), e para diversas espécies de diferentes famílias de aves hospedeiras (PEIRCE *et al.*, 2005; SAVAGE *et al.*, 2006).

Apenas três de todas as espécies de *Leucocytozoon* são conhecidas como patogênicas em aves silvestres (*L. simondi*, *L. marchouxi*, e *L. toddi*) (VALKIUNAS, 2005), levando à morte (GARNHAM, 1966). Pesquisas com as demais espécies de *Leucocytozoon* têm mostrado que, quando parasitadas, aves hospedeiras podem apresentar diminuição na produção de ovos (KORPIMAKI *et al.*, 1993) e/ou tornarem-se anêmicas (DESSER & RYCKMAN, 1976).

#### 1.1.6 Haemoproteus

O gênero *Haemoproteus* compreende cerca de 100 espécies que infectam aves e possuem distribuição global (BENNET & PEIRCE, 1988, 1990). No entanto, parece estar ausente em certas regiões, como o ártico, onde não há vetores transmissores das espécies (WHITE *et al.*, 1978), os artrópodes hematófagos (simulídeos, hipoboscídeos e ceratopogonídeos) (DESSER & BENNET, 1993).

A patogenicidade desse gênero é bastante discutida e a maioria dos estudos indica que esses parasitos não afetam aves silvestres, sendo benignos (QUILLFELDT *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos mais detalhados, com acompanhamento da infecção em aves silvestres, revelam que *Haemoproteus* sp. pode exercer efeitos patogênicos importantes, como observado em estudos com fragatas infectadas (*Fregata magnificens*), que revelou que mesmo infecções brandas podem prejudicar o sucesso reprodutivo dessas aves (ver MADSEN *et al.*, 2007).

### 1.1.7 *Plasmodium*

A malária aviária é causada por mais de 40 espécies de *Plasmodium* (ATKINSON, 2008) e transmitida por dípteros ornitofílicos, geralmente dos gêneros *Culex* e *Aedes*, e ocasionalmente por *Anopheles*, todos pertencentes à família Culicidae (VAN RIPER III *et al.*, 1994). Espécies de *Plasmodium* possuem distribuição cosmopolita (ATKINSON, 2008), dentre elas, *P. relictum* é mais comum entre as que parasitam aves (BEADELL *et al.*, 2006), a qual já foi registrada em pinguins-papua (*Pygoscelis papua*), nas ilhas sub-antárticas (GRACZYK *et al.*, 1995).

Apesar de muitas vezes subclínica, a infecção causada por plasmódios aviários pode ser acentuada em condições de estresse e/ou quando ocorre concomitantemente com outros agentes de doença (GRACZYK *et al.*, 1994), podendo ser patogênica em animais silvestres e de cativeiro (ALLANDER, 1997) e levar à morte em casos mais graves (ATKINSON *et al.*, 1995). Estudos com pinguins de cativeiros infectados com malária mostram que as principais conseqüências da doença são morbidez e morte (ver FLEISCHMAN *et al.*, 1968).

### 1.2 Métodos para estudo de prevalência de hemoparasitos em aves

A pesquisa por hemoparasitos pode ser realizada principalmente por meio de duas técnicas, a de esfregaço sanguíneo (análise microscópica) ou por técnicas moleculares. A técnica de esfregaço sanguíneo permite fazer o diagnóstico, medir a intensidade da infecção e estimar a prevalência de hemoparasitos, além de possibilitar a observação morfológica dos estágios sanguíneos (trofozoítas, gametócitos, etc.) do parasita. Essa técnica também permite a quantificação dos hemoparasitos por meio de contagem em eritrócitos parasitados em relação aos não parasitados (VAN RIPPER III *et al.*, 1986).

Quanto às técnicas moleculares para detecção de parasitos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é bastante utilizada para detecção de parasitos. Essa técnica utiliza a variação das sequências genéticas para detectar diferentes linhagens de parasitos, de maneira específica. Segundo HENNING *et al.* (1999), para estudos epidemiológicos, que em sua maioria possuem amostras disponíveis limitadas, a utilização da técnica de PCR é bastante conveniente, uma vez que amplifica uma sequência genômica específica.

Pesquisas têm demonstrado que técnicas moleculares, como a de PCR, são mais sensíveis para a detecção de hemoparasitos em aves do que a pesquisa em lâminas de

esfregaço sanguíneo (RIKLEFS & FALLON, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005). Além disso, fornecem diagnósticos rápidos e confiáveis, sendo um método eficiente e mais acurado que o método de detecção em lâminas com esfregaço sanguíneo (RICHARD *et al.*, 2002). Isto porque a detecção direta de parasitos em esfregaços sanguíneos é um método laborioso, que exige treinamento técnico (BARKER *et al.*, 1992) e pode ter um alto grau de dificuldade quando as aves avaliadas estiverem em fases crônica ou latente da infecção (ATKISON & VAN RIPER, 1991). Mesmo assim, o exame microscópico de esfregaços sanguíneos é o método de diagnóstico de referência (BRAGA *et al.*, 2010), visto que é essencial para detecção morfológica de hemoparasitos.

### 1.1.3 Hemoparasitismo em aves antárticas

Segundo QUIILFELDT, *et al.* (2011), prevalências de hemoparasitos aumentam quanto maior a proximidade aos trópicos, sendo nulas ou muito baixas em regiões polares. Resultados negativos em pesquisas de hemoparasitos têm sido reportados em aves marinhas (ver revisão QUIILFELDT *et al.*, 2011), e hemoparasitos também têm sido considerados ausentes na região Antártica (ver revisão BARBOSA & PALACIOS, 2009).

O motivo para essa ausência ainda é pouco conhecido e estudado (BARBOSA & PALACIOS, 2009), no entanto, a justificativa mais abordada é a de que o clima Antártico é considerado um fator limitante para o desenvolvimento de potenciais vetores de hemoparasitos (LAIRD, 1961). Entretanto, espécies migratórias, como a maioria das aves que se reproduzem na região, são consideradas responsáveis pela transmissão de diversos vírus, bactérias e hemoparasitos (HUBALEK, 2004), mas esse padrão não é conhecido para aves migratórias marinhas (QUIILFELDT *et al.*, 2011).

### 1.2 **Skuas (*Catharacta spp.*) e pinguins (*Pygoscelis spp.*) antárticos**

A região Antártica está situada no Pólo Sul do planeta e engloba o continente Antártico e a Península Antártica (WALLWORK, 1973) (Figura 1). A Península Antártica compreende diversas ilhas, dentre elas a Ilha Rei George, situada nas Ilhas Shetlands do Sul (BIRKENMAJER, 1980), onde o clima é caracterizado por ser marítimo, com alta umidade relativa do ar (RAKUZA-SUSZCZEWSKI *et al.*, 1993), sendo caracterizado como polar oceânico do hemisfério Sul (FERRON *et al.*, 2001). Na Ilha Rei George, a Baía do Almirante se destaca por ser a maior baía da região, com mais de 380 km<sup>2</sup>, com

excelentes locais para mamíferos, aves e outros organismos, adaptados às condições ambientais dessa região, reproduzirem e forragearem (RAKUZA-SUSZCZEWSKI, 1980) (Figura 2).

O ecossistema antártico, embora abrigue poucas espécies animais, é composto por populações densas. Em relação às aves, existem oito espécies de pinguins (aves adaptadas para o mergulho), trinta e duas espécies de aves voadoras, incluindo as skuas, totalizando 40 espécies de aves na região (WATSON, 1975).

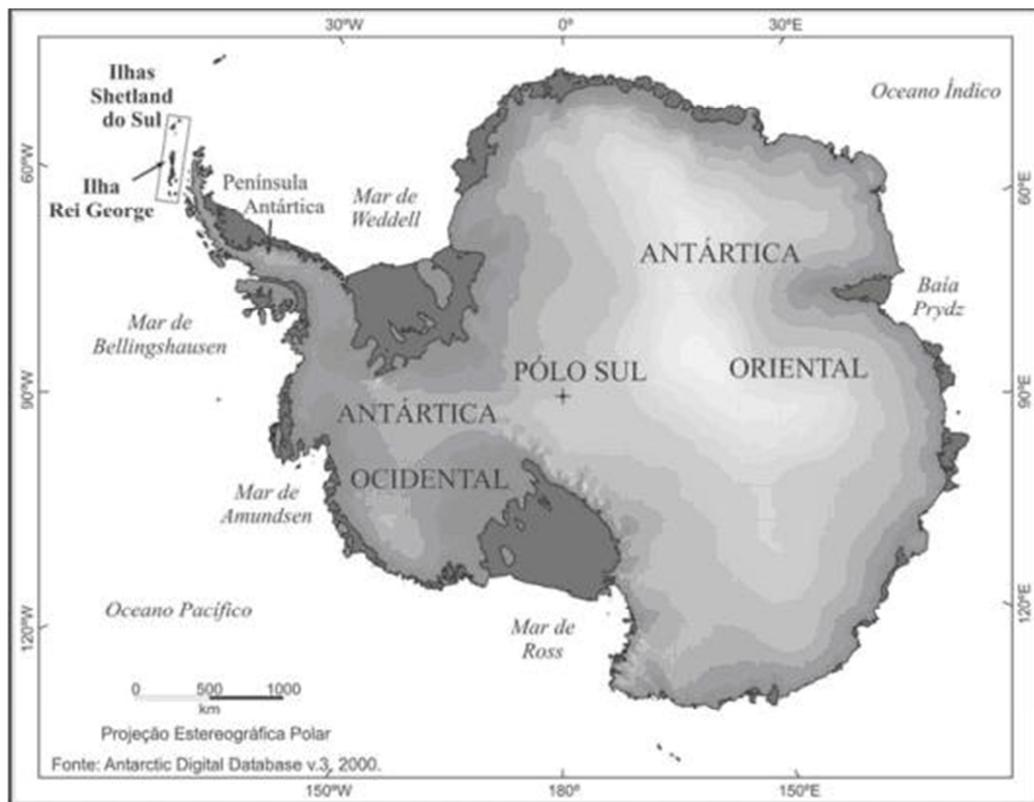


Figura 1- Localização da Ilha Rei George, na Península Antártica, Antártica  
Fonte: BAS, 2000.



Na Antártica, as skuas estão amplamente distribuídas, desempenhando uma importante função nesse ecossistema (YOUNG, 1994). São aves territorialistas, que defendem seus territórios no período reprodutivo (TRIVELPIECE *et al.*, 1980; PIETZ, 1987; MONCORPS *et al.*, 1998; COSTA & ALVES, 2007; 2008), além de serem predadoras de topo, com hábitos alimentares oportunistas (MAXSON & BERNSTEIN, 1982; NORMAN & WARD, 1990; BAKER & BARBRAUD, 2001). A dieta varia de recursos marinhos, como moluscos e peixes (VOTIER *et al.*, 2003), até de outras aves, como pinguins e petréis (MOLLER-SCHWARZE & MOLLER-SCHWARZE, 1973; PIETZ, 1987; TRILLMICH, 1978; ZIPAN & NORMAN, 1993; BROOKE *et al.*, 1999) e lixo deixado por humanos próximo às plataformas de pesquisa (PIETZ, 1987; PHILLIPS *et al.*, 2004).

Durante o inverno austral, *C. maccormicki* e *C. lonnbergi* se deslocam para outros locais, não permanecendo na região antártica. No caso de *C. maccormicki* a migração é caracterizada por ser trans-equatorial, podendo chegar ao Hemisfério Norte (Norte do Atlântico ou ao Norte do Pacífico) (KOPP *et al.*, 2011) (Figura 4). Já *C. lonnbergi*, dispersa menos, permanece em áreas mais próximas ao sul e sua migração ainda é pouco conhecida.

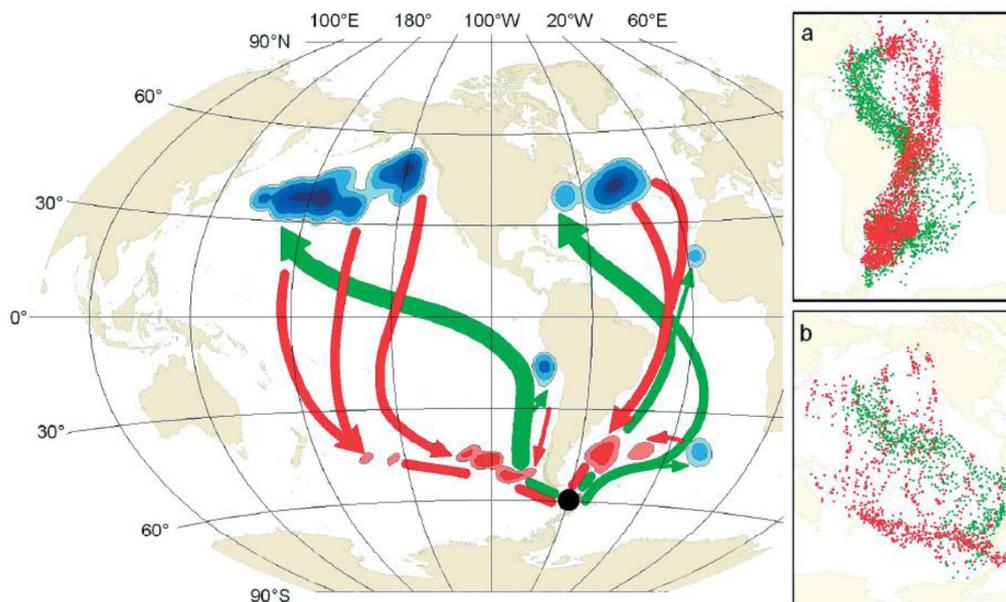


Figura 4 – Rotas e áreas de migração da skua-polar-do-sul (*Catharacta maccormicki*).

Legenda: Em verde, estão representadas as rotas de migração durante o outono, e em vermelho, as rotas de migração durante a primavera. Os contornos azuis correspondem a áreas de invernagem. Destaque para as aves monitoradas no Oceano Atlântico (a) e no Oceano Pacífico (b).

Fonte: KOPP *et al.*, 2011.

### 1.2.2 Pinguins (*Pygoscelis* spp.)

Das oito espécies de pinguins que ocorrem na Antártica, três pertencem ao gênero *Pygoscelis*, as mais comuns na região da Baía do Almirantado (CIAPUTA & SALWICKA, 1997), onde se localiza a Estação Antártica de pesquisa brasileira (Estação Antártica Comandante Ferraz), na Ilha Rei George, Península Antártica. São eles o pinguim-antártico (*Pygoscelis antarctica*), o pinguim-papua (*P. Papua*) e o pinguim-de-adélia (*P. adeliae*) (Figura 5).



Figura 5 – Pinguins do gênero *Pygoscelis* que ocorrem na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

Legenda: a) *Pygoscelis antarctica*; b) *P. papua*; c) *P. adeliae*.

Fotos: Rodrigo Ornellas (a e b) e Erli S. Costa (c)

A distribuição de *P. antarctica* está, em grande parte, restrita à Península Antártica, incluindo suas ilhas periféricas. Indivíduos de *P. papua* ocupam as ilhas sub-antárticas, na área do círculo polar, com reprodução mais ao norte. Pinguins da espécie *P. adeliae* estão distribuídos no continente antártico e no círculo polar, se reproduzindo em áreas mais ao sul (TRIVELPIECE *et al.*, 1987). Segundo WHITE & CONROY (1975), o principal item alimentar consumido por *P. antarctica* e *P. adeliae*, os quais são animais planctívoros, é o *krill*, ao passo que indivíduos de *P. papua* se alimentam principalmente de peixes.

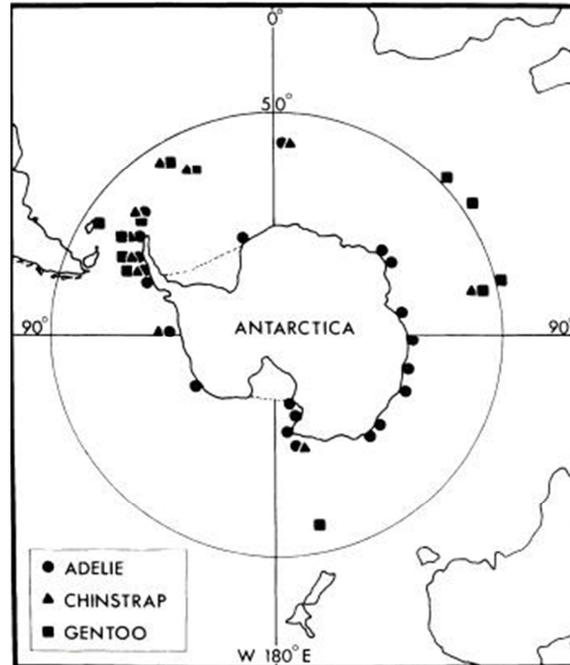


Figura 6 – Áreas de reprodução de *Pygoscelis adeliae* (representada pelos círculos) *P. antarctica* (representada pelos triângulos) e *P. papua* (representada pelos quadrados) na Antártica.

Nota: As linhas pontilhadas mostram fronteiras com plataformas de gelo.

Fonte: TRIVELPIECE *et al.*, 1987.

### 1.2.3 Pesquisa de hemoparasitos em aves antárticas

Os estudos de aves na Antártica se restringem, de modo geral, a levantamentos de abundância e distribuição de espécies de uma determinada área, sendo ainda poucos os estudos ecológicos, especialmente na Baía do Almirantado (revisão em COSTA & ALVES, 2007; 2012).

Com exceção de um recente trabalho realizado na Baía do Almirantado (ver VANSTREELS *et al.*, 2013), não há mais nenhuma pesquisa sobre hemoparasitismo de aves nesta área de estudo. Mesmo que se leve em consideração todo o ambiente geográfico da Antártica, os estudos sobre hemoparasitos são escassos e fragmentados. Além disso, muitos estudos foram realizados a partir de técnicas tradicionais para pesquisa de patógenos, como análise microscópica de lâminas de esfregaço sanguíneo ou por sorologia, técnicas menos confiáveis do que métodos moleculares mais modernos (ver detalhes na revisão de BARBOSA & PALACIOS, 2009).

Apesar do isolamento geográfico, a Antártica não está livre dos riscos representados por patógenos e parasitos (BARBOSA & PALACIOS, 2009) e segundo JONES *et al.* (2002),

o acompanhamento do estado dos parasitos da vida silvestre nesta região é um aspecto importante para a conservação da Antártica.

Na Antártica, estudos têm apontado um aumento nas temperaturas, em especial na Península Antártica e no oeste do continente (TURNER *et al.*, 2005; COSTA & ALVES, 2012). Segundo PATZ (2000), mudanças ambientais podem alterar o balanço ecológico, modificando o contexto sob os quais vetores e parasitos ou hospedeiros desenvolvem-se e transmitem doenças. De acordo com BENSCH *et al.* (2000), o primeiro contato de hemoparasitos com aves nativas, principalmente espécies de *Plasmodium* pode ter um forte impacto negativo nos hospedeiros. Extinções de aves nativas no Haváí têm sido relacionadas ao primeiro contato dessas aves com o protozoário *Plasmodium* sp. (ATKINSON *et al.*, 2000).

O presente estudo, portanto, pretende preencher uma lacuna sobre a existência ou não de hemoparasitos em skuas e pinguins antárticos na região da Baía do Almirantado, utilizando lâminas de esfregaço sanguíneo (com análise por microscopia) e técnicas moleculares para pesquisa de hemoparasitos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a existência de hemoparasitos em pinguins (*Pygoscelis* spp.) e skuas (*Catharacta* spp.) antárticos na região da Baía do Almirantado, Península Antártica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Comparar a presença de hemoparasitos em skuas (*Catharacta maccormicki* e *C. lonnbergi*) e em pinguins antárticos (*Pygoscelis antarctica*, *P. papua* e *P. adeliae*).
- Pesquisar a existência de hemoparasitos em *Catharacta maccormicki* e *C. lonnbergi* e, caso presentes, investigar se há diferenças na composição de espécies de parasitos.

- Pesquisar a existência de hemoparasitos em *Pygoscelis antarctica*, *P. papua* e *P. adeliae* e, caso presentes, investigar se há diferenças na composição de espécies de parasitos.
- Pesquisar a presença de Plasmodium/Haemoproteus em skuas e pinguins por meio de análises moleculares.
- Avaliar se há diferenças nas espécies de hemoparasitos encontrados entre:
  - machos e fêmeas das skuas e dos pinguins amostrados no presente estudo.
  - adultos e filhotes das skuas e dos pinguins amostrados.
- Comparar o peso de cada ave parasitada com a média do peso da espécie à qual pertence.
- Comparar as técnicas de esfregaço sanguíneo (microscopia) e análise molecular (técnica de PCR) para a detecção de parasitos nas skuas e pinguins estudados.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Área de estudo

As amostras foram coletadas na Baía do Almirantado (62°05'0"S, 58°23'28"W), Ilha Rei George, Península Antártica, nas principais áreas de reprodução das skuas e pinguins antárticos, em dois períodos reprodutivos, de dezembro de 2010 a março de 2011 e de dezembro de 2011 a março de 2012. A autora esteve presente na Antártica durante o período de fevereiro a março de 2011, quando realizou a coleta das amostras. Amostras dos demais meses foram coletadas pelos demais membros do projeto Pinguins e Skuas (CNPq/MCT 557049/2009-1 e FAPERJ E-26/111.505/2010).

Amostras de skuas foram coletadas em seis diferentes áreas, Keller Peninsula, Hennequin Point, Demay Point, Machu Pichu, Cape Vauréal e Chabrier Rock; as áreas de coleta de amostras de pinguins foram Keller Peninsula, Demay Point, Chabrier Rock, Bontany, Thomas Point e Hennequin Point, totalizando seis diferentes áreas (Figura 7).

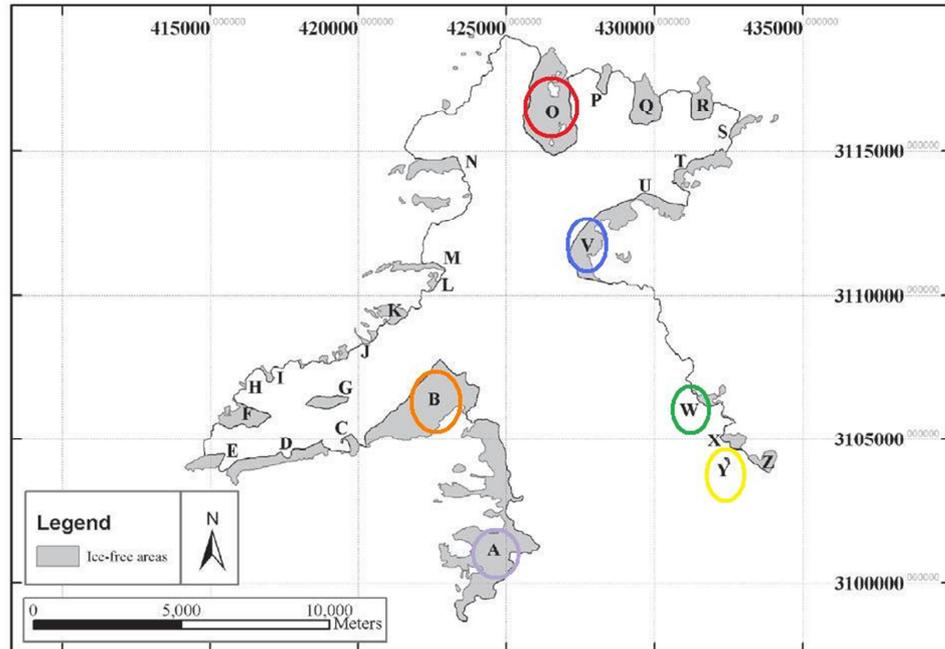


Figura 7 – Mapa da Baía do Almirantado, revelando as principais áreas livres de gelo em cinza.

Legenda: Destaque para as áreas A (Demay Point), B (Thomas Point), O (Keller Peninsula), V (Hennequin Point), W (Cape Váureal) e Y (Charbrier Rock), principais áreas onde as amostras das skuas (*Catharacta spp.*) e pinguins (*Pygoscelis spp.*) foram coletadas.

Fonte: Modificado de SANDER *et al.*, 2006.

## 3.2 Captura das aves

### 3.2.1 Skuas

As aves foram atraídas com alimentos (pedaços de carne) e capturadas utilizando-se uma armadilha de laço. A fim de reduzir o estresse de captura, as aves foram colocadas em sacos de algodão. Seus pesos foram obtidos com balança de precisão (Pesola, precisão  $\pm 0,1g$ ) e as aves foram individualmente marcadas com anilhas metálicas fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (ICMBio/CEMAVE/SNANet) no projeto 2958. Além disso, as aves foram categorizadas de acordo com a faixa etária em filhote (F), adulto reproduzindo (AR) e em adulto não reproduzindo (ANR). As aves foram categorizadas como adulto (A), quando não foi possível avaliar se estavam ou não reproduzindo.

### 3.2.2 Pinguins

Os pinguins foram capturados com um puçá e em seguida colocados em sacos de algodão, para reduzir o estresse de captura. O peso foi obtido com uma balança de precisão (Pesola, precisão  $\pm 0,1g$ ) e as aves foram individualmente marcadas com anilhas metálicas fornecidas pelo CEMAVE (ICMBio/CEMAVE/SNANet, projeto 2958). As aves também foram categorizadas de acordo com a faixa etária em filhote (F), adulto reproduzindo (AR) e em adulto não reproduzindo (ANR). As aves foram categorizadas como adulto (A), quando não foi possível avaliar se estavam ou não reproduzindo.

### 3.3 **Coleta de sangue para pesquisa de hemoparasitos**

O sangue das aves foi obtido por meio de punção das veias metatársicas ou braquiais, utilizando-se seringas (3mL) e agulhas descartáveis de espessura mediana (25x7mm). O volume máximo de coleta de sangue para cada ave dependeu do seu peso, respeitando-se o limite de coleta de sangue equivalente a no máximo 1 % do peso do animal (ARCTANDER, 1988). Para cada indivíduo amostrado com lâminas de esfregaço sanguíneo, procurou-se obter amostras de sangue para análises moleculares de pesquisa de *Plasmodium/Haemoproteus*, assim como para confirmação do sexo. No entanto, não foram coletadas amostras de sangue para análises moleculares das aves que aparentavam estar com sinais de fraqueza, estresse e ou quando as veias estavam com difícil acesso.

Devido ao incêndio ocorrido na Estação Antártica Comandante Ferraz em fevereiro de 2012, algumas lâminas de esfregaço sanguíneo foram perdidas. No entanto, o sangue coletado para as análises moleculares referentes a essas aves já haviam sido enviados pelo navio de pesquisa da Marinha do Brasil, Ary Rongel. Nesse último caso, foram realizadas apenas as análises moleculares.

#### 3.3.1 Confeção de lâminas de esfregaço sanguíneo

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados no campo a partir de uma gota de sangue. Para cada ave foram confeccionados de dois a três esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, secos ao ar. As lâminas foram fixadas com álcool metílico, em no máximo 12 horas depois de confeccionadas, durante 2 minutos, em laboratório na Estação Antártica Comandante Ferraz. Após secagem completa, o material foi embrulhado em papel toalha e

armazenado em caixas para ser transportado até o Brasil. Os esfregaços sanguíneos foram corados no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-SVS/MS, na Fiocruz, utilizando-se uma solução de GIEMSA em água tamponada (pH 7,2 - 7,4) a uma diluição de 1:10, durante 15 minutos.

### 3.3.2 Sangue para análises moleculares (pesquisa de *Plasmodium/Haemoproteus* e confirmação do sexo)

Obteve-se uma amostra de sangue da maioria dos animais que tiveram sangue coletado para confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo, que foi fixado em etanol absoluto (1:1). As amostras de sangue foram armazenadas em tubos tipo *ependorf* e mantidas refrigeradas até a chegada ao Brasil, onde foram aplicadas técnicas moleculares para pesquisa de hemoparasitos e confirmação do sexo, no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia da UFRJ.

## 3.4 **Pesquisa de hemoparasitos**

### 3.4.1 Análise das lâminas de esfregaço sanguíneo

As lâminas de esfregaço sanguíneo foram analisadas com microscópio óptico (Olympus BX40), utilizando lente objetiva de imersão, com aumento de 10.000x. Dentre as lâminas confeccionadas para cada indivíduo, foi escolhida a melhor lâmina para ser analisada. A análise foi feita na região da franja da lâmina, onde foram escolhidos 200 campos microscópicos (aproximadamente 200 eritrócitos/campo) com melhor visualização das células. Os esfregaços foram re-examinados quando foi observada positividade pela técnica molecular de PCR.

### 3.4.2 Análise molecular para pesquisa de *Plasmodium/Haemoproteus*

A extração de DNA das amostras de sangue foi feita a partir de Acetato de Amônio, de acordo com a técnica de NICHOLLS *et al.* (2000), com pequenas modificações, como a adição das etapas a seguir. Como o sangue foi conservado em etanol absoluto, sem anticoagulantes, ele se apresentou na forma sólida, endurecido. Sendo assim, antes de começar o procedimento de extração, retirou-se um pedaço de cada amostra de sangue

coletado, que foi colocado em papel absorvente para evaporação do etanol por cerca de 10 minutos. Além disso, antes da etapa de banho-maria a 55°C *overnight* adicionou-se 28 µL de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio).

Para as análises moleculares, foram utilizados os *primers* não específicos PALU-F (5'-GGGTCAAATGAGTTTCTGG-3') e PALU-R (5'-DGGAACAATATGTARAGGAGT-3') para detecção de espécies de *Plasmodium/Haemoproteus*, por meio da amplificação por PCR (ver MARTINEZ *et al.*, 2009). As reações de PCR realizadas foram as mesmas determinadas por QUILLFELDT *et al.* (2010). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5 %), por eletroforese (100V), durante 25 minutos. Após a separação, o gel foi submerso em solução de Brometo de Etídio, durante 5 minutos, para revelação dos fragmentos amplificados. Controles positivos para *Plasmodium sp.*, utilizando-se sangue infectado com *P. gallinaceum*, e negativos foram utilizados em todas as reações.

### 3.5 Confirmação do sexo

Para a confirmação do sexo das aves, foram realizadas análises moleculares utilizando-se os *primers* P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e a técnica de PCR determinada por GRIFFTS *et al.* (1998), na qual a amplificação de dois fragmentos (CHD-Z e CHD-W) indica presença de material genético de fêmeas de aves e de um fragmento (CHD-Z) indica presença de material genético de machos de aves.

O DNA foi extraído de acordo com NICHOLLS *et al.* (2000), com as mesmas modificações realizadas para a pesquisa de hemoparasitos por técnicas moleculares. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%), durante 25 minutos, por eletroforese (100 V), e revelados após submersão do gel em solução de Brometo de Etídio, durante 5 minutos. As amostras que não tiveram uma amplificação definida (1 fragmento = macho; 2 fragmentos = fêmea), apresentando bandas indefinidas ou sem separação visível, foram categorizadas como de aves cujo sexo não foi confirmado.

O presente trabalho utilizou, em sua maioria, amostras dos mesmos indivíduos de skuas pesquisados por Costa (2012) em seu trabalho, que confirmou o sexo de *C. maccormicki* e *C. lonnbergi*. Dessa forma, para determinação do sexo das skuas, foram utilizados parte dos resultados encontrados por Costa (2012).

### 3.6 Análises estatísticas

Todos os dados submetidos a análises estatísticas foram testados quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov). Os valores de peso das espécies de aves que apresentaram positividade a parasitos foram testados quanto à diferença entre machos e fêmeas da mesma espécie a fim de avaliar se havia ou não diferença significativa entre os pesos de machos e fêmeas (Teste t – duas amostras). O índice de significância considerado foi de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores de peso de cada indivíduo parasitado foram comparados com o valor da média dos pesos ( $\bar{x}$ ) dos indivíduos do mesmo sexo e mesma espécie quando o resultado do Teste t foi significativo ( $p < 0,05$ ) e comparados com o valor da média dos pesos ( $\bar{x}$ ) de todos os indivíduos (machos e fêmeas) da mesma espécie quando não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ). Os pesos das aves considerados positivos no presente estudo foram categorizados abaixo da média, quando o valor do peso da ave foi mais baixo do que a média ( $\bar{x}$ ) a que foi comparada, e acima da média, quando o peso da ave foi mais alto do que a média ( $\bar{x}$ ) a que foi comparada. O desvio padrão (SD) também foi calculado, e apresentado junto com os valores de média ( $\bar{x}$ ) da seguinte forma:  $\bar{x} \pm SD$ .

A prevalência dos hemoparasitos foi estimada a partir da porcentagem de aves infectadas por pelo menos um parasito. Prevalência é uma análise comumente utilizada em estudos parasitológicos (BUSH *et al.*, 1997). O teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para avaliar diferenças entre as prevalências de infecções entre as faixas etárias e sexo dos animais, além de testar as diferenças entre as prevalências de infecção de espécies do mesmo gênero, quando positivas. O índice de significância considerado foi de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

No total, foram coletadas amostras de 185 aves em dois períodos reprodutivos, de novembro de 2010 a março de 2011 e de novembro de 2011 a fevereiro de 2012. Desse total de amostras, 120 pertencem aos pinguins (*P. antarctica*,  $n = 60$ ; *P. adeliae*,  $n=31$ ; e *P. papua*,  $n=29$ ) e 65 às skuas (*C. maccormicki*,  $n=55$ ; e *C. lonnbergi*,  $n=10$ ) (Tabela 1).

A pesquisa por hemoparasitos em 78 pinguins ( $n=120$ ) e em 32 skuas ( $n=65$ ) foi realizada pelos dois métodos, exame microscópico de lâminas de esfregaço sanguíneo e análises moleculares ( $n=110$ ); em 22 pinguins ( $n=120$ ) e em 31 skuas ( $n=65$ ) só foram coletadas amostras de lâminas de esfregaço sanguíneo ( $n=53$ ), e em 20 pinguins ( $n=120$ ) e em

duas skua (n=65), amostra de sangue para análises moleculares (n=26) foi o único material para pesquisa dos parasitos.

Não foram encontradas espécies de filarídeos nematóides, *Trypanosoma*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Leucocytozoon* e *Haemoproteus* em nenhuma das lâminas de esfregaço sanguíneo das três espécies de pinguins estudadas. Entretanto, um indivíduo de *P. papua* (Ppa 1) foi diagnosticado positivo para *Plasmodium* sp., sendo visualizadas, por meio de exame microscópico, desde formas evolutivas mais jovens do parasito (trofozoítas), até formas mais avançadas, como gametócito e esquizonte (Figura 8), o que indica uma alta taxa de parasitemia. Os exames microscópicos das lâminas referentes às skuas foram negativos para todos esses hemoparasitos pesquisados, incluindo *Plasmodium* spp.

O indivíduo de *P. papua* (Ppa 1) positivo para *Plasmodium* sp. também foi diagnosticado positivo para *Plasmodium*/*Haemoproteus* pela amplificação de fragmento resultante da técnica de PCR, mas nenhum estágio sanguíneo de *Haemoproteus* sp. foi observado no exame microscópico. Além desse indivíduo, em mais seis pinguins, um *P. papua* (Ppa 2), dois *P. antarctica* (Pan 1; Pan 2) e três *P. adeliae* (Pad 1; Pad 2; Pad 3) houve amplificação de fragmento resultante da técnica de PCR positiva para *Plasmodium*/*Haemoproteus*, totalizando sete pinguins positivos para esses hemoparasitos com o uso dessa técnica (Figura 9). No entanto, não houve amplificação de nenhum fragmento resultante da técnica de PCR para as duas espécies de skuas (*C. maccormicki* e *C. lonnbergi*).

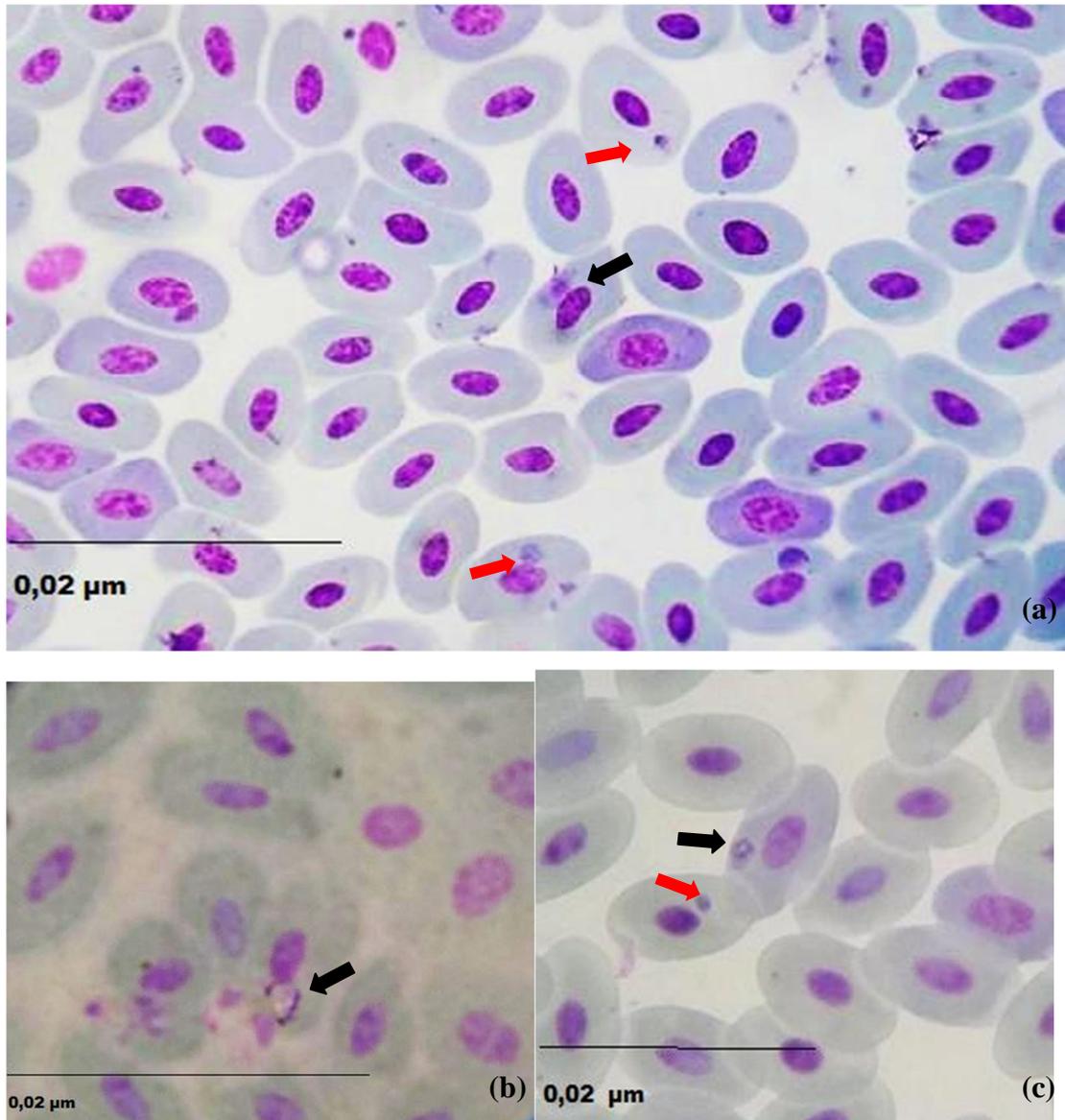


Figura 8 – Visualização das hemácias de *Pygoscelis papua* (Ppa 1) infectadas por *Plasmodium* sp..

Legenda: Detalhe para as formas trofozoítas (**a** e **c** – setas vermelhas), esquizonte imaturo (**b** – seta preta) e gamonte (**c** - seta preta) intracelulares do parasito em três diferentes campos (**a**; **b** e **c**).

A prevalência de infecção por *Plasmodium*/*Haemoproteus* entre todos os indivíduos de pinguins e skuas analisados (n=186) foi de 3,76%. Entre as skuas (n=66), a prevalência foi de 0%. Entre os pinguins das três espécies (n=120), a porcentagem de indivíduos infectados foi de 5,83%; no nível de espécie, a maior prevalência dos hemoparasitos encontrados foi em *P. adeliae* (9,67%), seguido de *P. papua* (6,89%) e *P. antarctica* (3,33%) (Tabela 1). No entanto, não houve diferença significativa entre as prevalências encontradas para cada espécie ( $\chi^2=1,33$ ; p = 0, 514).

Tabela 1 – Número de indivíduos examinados e parasitados por *Haemoproteus* e/ou *Plasmodium*, prevalência geral de todas as espécies de pinguins (*Pygoscelis* spp.) e skuas (*Catharacta* spp.) capturados e técnica de pesquisa que constatou o parasitismo, exame microscópico e técnica molecular (E.M. + PCR), somente exame microscópico (E.M.) e somente técnica molecular (PCR).

Gênero-Espécie	Número de indivíduos		Diagnóstico do parasitismo			Prevalência
	Examinados	Infectados	E.M. + PCR	E.M.	PCR	<i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> (%)
<i>Pygoscelis</i>	120	7	1	-	6	5,83
<i>P. adeliae</i>	31	3	-	-	3	9,67
<i>P. antarctica</i>	60	2	-	-	2	3,33
<i>P. papua</i>	29	2	1	-	1	6,89
<i>Catharacta</i>	66	0	-	-	-	0
<i>C. lonnbergi</i>	11	0	-	-	-	0
<i>C. maccormicki</i>	55	0	-	-	-	0
<b>Total geral</b>	<b>186</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>3,76</b>

Como não houve diferença significativa entre os pesos de machos e fêmeas nas três espécies de pinguins (Tabela 2), a comparação entre os pesos das aves infectadas foi realizada com a média de peso total ( $\bar{x}$ ) de machos e fêmeas de cada espécie. Dessa forma, os pesos dos animais infectados foram abaixo da média em cinco indivíduos parasitados, incluindo dois indivíduos de *P. adeliae* (Pad 1 = 3,450 kg; Pad 2 = 3,950 kg;  $\bar{x} \pm SD = 4,351 \pm 0,464$ ), dois de *P. antarctica* (Pan 1 = 3,800 kg; Pan 2 = 4,000 kg;  $\bar{x} \pm SD = 4,294 \pm 0,506$ ) e um de *P. papua* (Ppa 2 = 4,800 kg;  $\bar{x} \pm SD = 5,722 \pm 0,952$ ). No entanto, para dois pinguins, inclusive o

indivíduo que foi diagnosticado com alta taxa de parasitemia (Ppa 1), os pesos estavam acima da média, sendo um deles pertencente a *P. adeliae* (Pad 3= 4,600 kg;  $x \pm SD = 4,351 \pm 0,464$ ) e o outro a *P. papua* (Ppa 1= 5,750 kg;  $x \pm SD = 5,722 \pm 0,952$ ) (Tabela 3).

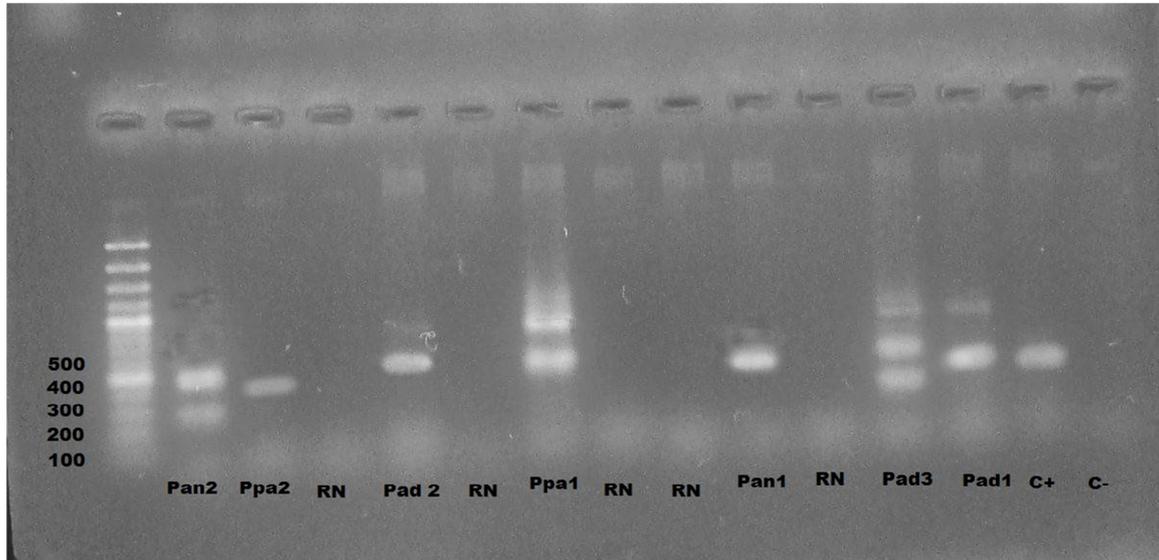


Figura 9 - Gel de agarose após corrida em eletroforese (100V), revelando os fragmentos amplificados para *Plasmodium/Haemoproteus* dos sete indivíduos de pinguins das três espécies (Pan 1; Pan 2; Ppa 1; Ppa 2; Pad 1; Pad 2; Pad 3).

Legenda: Pan = *Pygoscelis antarctica*; Ppa = *P. papua*; Pad = *P. adeliae*. Controles positivo e negativo estão representados por C+ e C-, respectivamente.

Nota: Animais que não apresentaram banda de amplificação estão representados como resultado negativo (RN).

Foram realizadas confirmações de sexo para 41 pinguins, incluindo 19 *P. antarctica* (machos = 8; fêmeas = 11), 12 *P. papua* (machos =10; fêmeas = 2) e 10 *P. adeliae* (machos =8; fêmeas = 2) e 43 skuas, 36 *C. maccormiki* (machos =23 ; fêmeas =23) e sete *C. lonnbergi* (machos=3; fêmeas=4). Para as skuas, a confirmação do sexo de 27 indivíduos foi realizada por Costa (2012) e 16 confirmações foram realizadas pela autora do presente trabalho. Quanto aos pinguins parasitados, de acordo com a análise molecular, dois foram confirmados como fêmeas (Pan1; Pan 2) e cinco como machos (Pad1; Pad2; Pad3; Ppa1; Ppa2) (Figura 10). No entanto, não houve diferenças significativas entre as prevalências de machos e fêmeas positivos ( $\chi^2 = 0,04$ ;  $p = 0,846$ ).

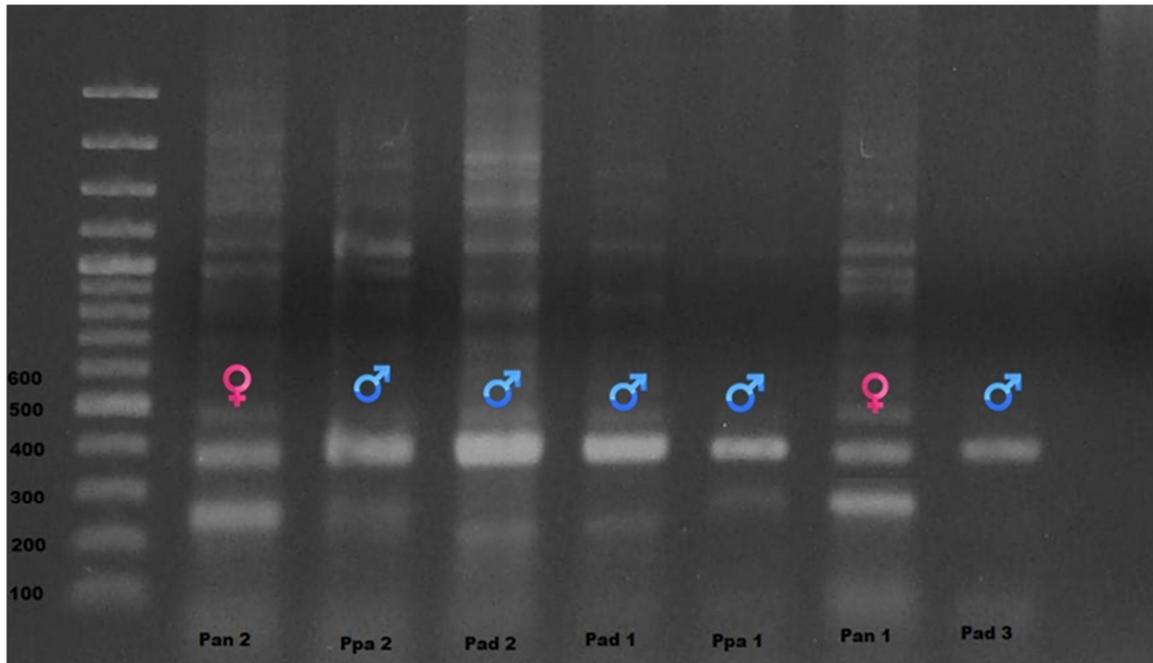


Figura 10 – Gel de agarose após corrida em eletroforese (100V) dos pinguins positivos para parasitos, revelando dois fragmentos para fêmeas (CHD-Z e CHD-W) e um fragmento para machos (CHD-Z).

Legenda: Pan = *Pygoscelis antarctica*; Ppa = *P. papua*; Pad = *P. adeliae*.

Nota: Os valores na coluna à esquerda correspondem ao peso molecular, e na linha, os nomes correspondem aos indivíduos das espécies infectadas.

Fonte: GRIFFTS *et al.*, 1998.

Tabela 2 – Resultados do Teste t aplicado para machos e fêmeas de cada espécie de pinguim, para comparar as médias do peso entre os sexos de cada espécie, em que a média (x), desvio padrão (SD), resultado do Teste t e probabilidade (p) foram calculados.

Resultado Teste t	Espécie					
	<i>P. adeliae</i>		<i>P. papua</i>		<i>P. antarctica</i>	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
x	4,625	4,128	4,500	5,672	4,720	4,664
SD	0,106	0,603	0,494	0,718	0,807	0,101
t	1, 11		- 2, 15		0, 13	
p	<b>0,30</b>		<b>0,06</b>		<b>0,90</b>	

Nota: Os resultados de probabilidade (p), em negrito, não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

Os indivíduos das três espécies de pinguins estudadas totalizaram 119 adultos, os quais foram categorizados em 72 adultos reproduzindo (AR), três adultos não reproduzindo (ANR), além de 47 adultos (A), que não puderam ser classificados como AR ou ANR, e apenas um filhote (F). Dos pinguins com diagnósticos positivos para hemoparasitos, todos foram adultos, sendo seis indivíduos (n=7) categorizados como AR, incluindo dois indivíduos de *P. papua*(Ppa 1; Ppa 2), dois indivíduos de *P. antarctica* (Pan 1; Pan 2) e dois dos três indivíduos de *P. adeliae*(Pad 1; Pad 2). O terceiro indivíduo desta última espécie (Pad 3) não pôde ser categorizado como AR ou ANR, e por isso foi categorizado apenas como adulto (A) (Tabela 3). O total de skuas adultas das duas espécies foi 25 reproduzindo (AR), cinco não reproduzindo (ANR) e quatro (A) que não foram enquadrados em nenhuma das duas categorias, além de 31 filhotes. Não houve diferença significativa quando comparadas as prevalências de parasitos com as faixas etárias de todas as espécies positivas ( $\chi^2 = 0,231$ ; p = 0,891).

Todas as amostras referentes aos pinguins positivos para *Plasmodium/Haemoproteus* (n=7) foram coletadas no mês de dezembro do ano de 2011, em quatro pontos diferentes da Baía do Almirantado: três na Península Keller (Pad 3; Pan 2; Ppa 2), dois em Ponta Hennequin (Pad 1; Ppa 1) um em Thomas Point (Pad 2) e um em Charbrier Rock (Pan 1) (Tabela 3).

Tabela 3 – Sexo, faixa etária, área de coleta, peso e tipo de diagnóstico do parasitismo dos pinguins infectados por *Haemoproteus/Plasmodium*.

Espécie parasitada	N	Sexo	Faixa etária	Área de coleta	Peso (kg)	Diagnóstico
<i>Pygoscelis adeliae</i> (Pad)	3					
	Pad 1	Macho	AR	Ponta Hennequin	3,450	PCR
	Pad 2	Macho	AR	Thomas Point	3,950	PCR
	Pad 3	Macho	A	Península Keller	4,600	PCR
<i>Pygoscelis papua</i> (Ppa)	2					
	Ppa 1	Macho	AR	Ponta Hennequin	5,750	E.M. + PCR
	Ppa 2	Macho	AR	Península Keller	4,800	PCR
<i>Pygoscelis antarctica</i> (Pan)	2					
	Pan 1	Fêmea	AR	Charbrier Rock	3,800	PCR
	Pan 2	Fêmea	AR	Península Keller	4,000	PCR

Legenda: AR = Adulto reproduzindo; A = Adulto; PCR = técnica molecular de PCR; E.M. = Exame microscópico.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra, pela primeira vez, a ocorrência de hemoprotozoários na região Antártica e a primeira ocorrência para as três espécies de *Pygoscelis* que se reproduzem na região. Além disso, apresenta o primeiro registro de infecção por espécies de Haemosporida (*Plasmodium-Haemoproteus*) para *P. adeliae*, espécie nunca antes reportada com hemoparasitos na natureza (LAIRD, 1961; BECKER & HOLLOWAY, 1968) e em condições de cativeiro (JONES & SHELLAM, 1999). Também foi o primeiro registro por espécies de Haemosporida para *P. antarctica* de vida livre, visto que já foram encontrados hemoparasitos nesses pinguins quando em cativeiro (PEIRCE & PRINCE, 1980).

Apesar de GRAKCYC *et al.* (1995), já terem relatado uma espécie de *Plasmodium* para *P. papua* de ilhas sub-antárticas, tal pesquisa foi realizada a partir de sorologia, sendo o presente trabalho o primeiro a identificar a presença de malária aviária por exame microscópico de lâmina de esfregaço sanguíneo em *P. papua* de vida livre. Sendo assim, a presença de hemoprotozoários registrada para pinguins antárticos no presente trabalho, contradiz diversos estudos prévios, que mencionavam a região Antártica como livre de hemoparasitos (LAIRD, 1961; LITTLE & EARLE, 1995; PIERSMA, 1997; FIGUEROLA, 1999; JOVANI *et al.*, 2001; VALERA *et al.*, 2003).

Além da espécie de *Plasmodium* detectada, nenhuma forma evolutiva de outros hemoparasitos foi encontrada a partir da análise de lâminas de esfregaço de pinguins e skuas antárticos no presente trabalho. Estudos em diversas regiões do planeta já reportaram alguns desses gêneros de parasitos em diversas aves marinhas (ver revisão QUILLFELT, *et al.* 2011), inclusive em regiões sub-antárticas, como *Hepatozoon* (por exemplo, *H. albatrossi*, descrito para espécies de albatrozes - *Diomedea exulans* e *Thalassarche melanophrys* por PEIRCE & PRINCE, 1980), e em espécies de pinguins, como *Trypanosoma* sp. (registrado para pinguins, como pinguins-azuis, *Eudyptula minor*, por JONES & WOEHLER, 1989), *Leucocytozoon* sp. (em pinguins-de-Fiordland, *Eudyptes pachyrhynchus* por FALLIS *et al.*, 1976), *Babesia* sp. (em pinguins africanos, *Spheniscus demersus* por EARLÉ *et al.*, 1993), *Haemoproteus* sp. (para pinguins-das-Galápagos, *Spheniscus mendiculus* por LEVIN *et al.*, 2009). Entretanto, nenhum desses hemoparasitos já foi relatado para aves marinhas da região Antártica (ver revisão BARBOSA & PALACIOS, 2009).

Apenas um indivíduo (n=7) foi positivo pelos dois métodos utilizados no presente estudo (microscopia e análise molecular), para o qual foram encontradas formas evolutivas de *Plasmodium* sp. em lâminas de esfregaço, confirmando a infecção de malária aviária. No

entanto, apesar de não ter sido encontrada nenhuma forma evolutiva de *Haemoproteus* spp., a infecção por este parasito não pode ser descartada para o indivíduo detectado como positivo para *Plasmodium* sp. pelas duas análises (microscópica e molecular) e nem para os outros seis pinguins positivos somente pela técnica molecular, visto que o *primer* utilizado no presente estudo constitui uma sequência comum a *Plasmodium*/*Haemoproteus*. Apesar disso, o sequenciamento genético do material amplificado pode confirmar a presença de espécies de *Plasmodium* ou *Haemoproteus*, ou de infecção mista por ambas (ATKINSON, 2008), o que não foi realizado para o presente trabalho.

A justificativa para resultados negativos na Antártica é pautada, principalmente, na ausência de potenciais vetores na região, consequência da alta salinidade (FIGUEROLA, 1999) e das condições climáticas extremas (LAIRD, 1961; QUILLFELDT *et al.*, 2010). No entanto, segundo MARTINÉZ-ABRAIN *et al.* (2004) mais hipóteses como a relação parasito-hospedeiro (BENNETT *et al.* 1993), competência imunológica do hospedeiro (RICKLEFS, 1992) e até a exclusão competitiva por ectoparasitos (MARTINÉZ-ABRAIN *et al.*, 2004) deveriam ser levadas em conta para explicar a aparente ausência desses parasitos, já relatada em diversos estudos.

No que diz respeito aos principais hemoparasitos de aves no mundo, acredita-se que o que regula essa distribuição entre os grupos de aves e entre as diferentes regiões é a alta especificidade parasito-hospedeiro de filarídeos nematóides (PEARLMAN & JAENIKE, 2003), *Hepatozoon* spp. (BENNETT *et al.*, 1992) *Leucocytozoon* spp. e *Babesia* spp. (BAKER, 1976). Ausência de vetores (MENDES *et al.*, 2005), diferenças entre resistências de hospedeiros e competência imunológica podem explicar a ausência de *Haemoproteus* spp. (SOL *et al.*, 2003). Espécies de *Plasmodium* que infectam aves possuem uma gama de hospedeiros, sendo o grau de especificidade parasita-hospedeiro considerado pequeno, tendo sua distribuição limitada à presença de vetores (VAN RIPPER III *et al.*, 1994). No entanto, os estudos são escassos sobre esses mecanismos de limitação de infestação por parasitos em aves marinhas e na região Antártica (BARBOSA & PALACIOS, 2009).

A prevalência de hemoparasitos encontrada no presente estudo via técnica molecular por PCR (n=7) foi superior à prevalência encontrada em lâminas de esfregaço sanguíneo (n=1). Segundo, ATKINSON & VAN RIPPER (1991), infecções em fases crônicas ou latentes podem ser sub-estimadas em lâminas de esfregaço sanguíneo. O sangue periférico de indivíduos com baixa parasitemia pode também apresentar pequena quantidade de formas evolutivas de hemoparasitos, dificultando o diagnóstico (HENNING *et al.*, 1999). Além disso,

levando em conta as condições climáticas da Península Antártica (alta umidade relativa do ar e ventos fortes), onde o estudo foi realizado, a confecção de lâminas de esfregaço no campo é uma tarefa difícil e pode afetar a qualidade do esfregaço e sua posterior visualização.

Considerando que não houve confirmação de infecção parasitária de seis indivíduos positivos pela PCR (n=7) em suas respectivas amostras de lâminas de esfregaço, entende-se que a pesquisa molecular por hemoparasitos é mais sensível que a microscópica, assim como previamente encontrado em alguns estudos (RICKLEFS & FALLON, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005). No entanto, o achado das formas evolutivas de hemoparasitos em lâminas de esfregaço pode fornecer informações importantes, não permitidas pela técnica de PCR, como medidas de intensidade de infecção, além da visualização da sua morfologia (VAN RIPPER III *et al.*, 1986). Nesse contexto, acredita-se que a utilização conjunta das técnicas molecular e microscópica é a melhor opção para pesquisa de hemoparasitos.

Embora menos enfatizada que outros fatores, a escolha da técnica de pesquisa de hemoparasitos pode também ser uma justificativa para a ausência e/ou baixa prevalência de parasitos na Antártica, visto que muitas pesquisas foram realizadas há mais de 20 anos atrás, com predominância do uso de lâminas de esfregaço sanguíneo para a pesquisa de hemoparasitos (ver revisão PALACIOS & BARBOSA, 2009). Segundo QUILLFELDT *et al.* (2011), pesquisas de hemoparasitos em aves marinhas que combinaram duas ou mais técnicas apresentaram resultados superiores de prevalência de parasitos quando comparadas com pesquisas em que apenas esfregaços sanguíneos foram analisados. O estudo ainda revelou que a escolha do método para detecção de *Plasmodium* sp. em aves marinhas influencia, significativamente, a prevalência desse parasito, sendo bem maior em análises moleculares utilizando a técnica de PCR e que, no entanto, para espécies de *Haemoproteus* o método de pesquisa não influencia a prevalência em hospedeiros.

Até então, nenhum estudo foi direcionado a entender as possíveis formas de aquisição de hemoparasitos em aves antárticas. Apesar de potenciais vetores de transmissão desses hemoparasitos nunca terem sido relatados para a Antártica (LAIRD, 1961; LITTLE & EARLE, 1995), carrapatos da espécie *Ixodes uriae*, registrados para aves da Península Antártica, inclusive para as espécies de pinguins (MURRAY & VESTJENS, 1967; WILSON, 1970), têm sido considerados possíveis transmissores de *Hepatozoon albatrossi* em ilhas sub-antárticas (PEIRCE & PRINCE, 1980) e de *Babesia peirce* no sul da África (EARLÉ *et al.*, 1993). Porém, essa espécie de carapato nunca foi relatada como possível transmissora de espécies de Haemosporida (*Plasmodium*/*Haemoproteus*). De acordo com QUILLFELDT *et al.*, (2011), os atuais vetores de espécies de *Plasmodium* que infectam aves marinhas ainda

são desconhecidos e estudos mais direcionados a esses vetores devem ser realizados, a fim de se entender seus padrões de distribuição.

Considerando a ausência de artrópodes transmissores de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. na Antártica, a presença de hemoparasitos em pinguins antárticos, parece ocorrer fora da área de reprodução, podendo ser explicada pela característica de dispersão dessas aves, visto que pinguins antárticos (*Pygoscelis* spp.) migram em direção ao norte no inverno austral (WILLIAMS, 1995). Segundo alguns autores, espécies migratórias teriam uma maior exposição a parasitos, visto que durante suas rotas, podem entrar em contato com diferentes vetores e/ou parasitos (WALDENSTROM *et al.*, 2002).

Embora a migração de pinguins da Baía do Almirantado seja pouco conhecida, estudos em outras áreas da Península Antártica apontam que *P. antarctica* (WILSON *et al.*, 1998) e *P. adeliae* (DAVIS *et al.*, 1996) podem se movimentar cerca de 1.000km além das áreas de reprodução durante o inverno. Mesmo que *P. papuase* movimente bem menos, cerca de 100km além da colônia (WILSON *et al.*, 1998), já houve relatos dessa espécie a 2.000km de distância da área de reprodução (ENTICOTT, 1986). Suposições sobre o contato do hospedeiro com o parasito durante a migração dessas aves ou nos locais de reprodução podem ser feitas a partir da prevalência de parasitos em filhotes, visto que estes nascem e permanecem nos locais de reprodução. Todos os pinguins positivos para Haemosporida foram indivíduos adultos (n=7), no entanto, apenas um filhote de pinguim (*P. antarctica*) foi analisado no presente estudo, o que não é conclusivo, devido ao pequeno número amostral.

Dos sete pinguins infectados, apenas um adulto (A) não pôde ser categorizado como adulto reproduzindo (AR) ou adulto não reproduzindo (ANR), sendo os seis demais categorizados como AR, uma prevalência de 8% nessa categoria. De acordo com SHELDON & VERHULST (1996), a prevalência dos parasitos tende a aumentar consideravelmente no período reprodutivo, visto que o esforço reprodutivo reduz recursos destinados à defesa das aves hospedeiras (SHELDON & VERHULST, 1996). Entretanto, isso não pôde ser avaliado no presente estudo, visto que não foram coletadas amostras de pinguins no período não-reprodutivo (inverno austral) e apenas três pinguins (n=120) foram considerados ANR no período de coleta, não havendo diferença significativa entre AR e ANR ( $\chi^2 = 0,23$ ; p = 0,891).

Tanto fêmeas quanto machos de pinguins foram positivos para hemoparasitismo no presente estudo, mas não houve diferença significativa ( $\chi^2 = 0,04$ ; p = 0,846) quando comparadas as prevalências de fêmeas e machos para cada uma das três espécies. Entretanto, estudos com populações de hospedeiros definidos de espécies de *Plasmodium* mostram que a

prevalência do parasita diferiu consideravelmente entre os sexos (WEATHERHEAD & BENNET, 1991).

Do total de pinguins infectados (n=7), cinco tiveram peso categorizado como abaixo da média quando comparados com a média de pesos da sua respectiva espécie. Segundo ATKINSON *et al.* (1988), infecções por *Haemoproteus* podem causar perda de peso em seus hospedeiros. Em relação à *Plasmodium* spp., formas mais agudas da infecção podem levar as espécies à anorexia. No entanto, o indivíduo de *P. papua* em que se indentificou *Plasmodium* spp., inclusive com formas evolutivas que indicam intensa parasitemia, apresentou um peso acima da média para indivíduos da sua espécie (Tabela 2).

Nenhum indivíduo de skua das duas espécies estudadas, *C. maccormicki* e *C. lonnbergi*, foi positivo para hemoparasitos em nenhuma das duas técnicas abordadas no presente estudo. Resultados similares já foram relatados para skuas antárticas (BECKER & HOLLOWAY, 1968; PEIRCE & PRINCE, 1980; BISHOP & BENNET, 1992; BEARHOP *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2002), sendo reportada a ausência de hemoparasitos para as cinco espécies de *Catharacta* existentes (QUILLFELDT *et al.*, 2011). Considerando que essas aves realizam migrações em longas distâncias dos locais de reprodução e em regiões onde potenciais vetores de hemoparasitos já foram descritos, um mecanismo de defesa imunológica parece ser a principal hipótese para ausência de hemoparasitos em alguns grupos, como no caso de infecções por *Haemoproteus* em aves marinhas (MARTINÉZ-ABRAIN *et al.*, 2004). Além disso, essa ausência pode também ser entendida pelos possíveis confinamentos filogenéticos relacionados à especificidade parasito-hospedeiro em aves marinhas, visto que dados de diversos estudos apontam que espécies de aves de uma mesma região, expostas aos mesmos parasitos, diferem quanto à infecção, sendo *Plasmodium* spp. mais comum em pinguins, *Hepatozoon* spp. foi registrado em sua maioria em albatrozes e petréis e *Haemoproteus* spp. parasitou mais fragatas e gaivotas. No entanto, mais dados sobre hemoparasitos em aves marinhas devem ser coletados a fim de testar as hipóteses explicativas para a ausência de hemoparasitismo em alguns grupos de aves (ver revisão QUILLFELDT *et al.*, 2012).

A primeira estimativa de prevalência total de hemoparasitos de aves da Antártica diferente de 0% (ver revisões BARBOSA & PALACIOS, 2011; QUILLFELDT *et al.*, 2011) foi feita no presente estudo e correspondeu a 3, 36%. Além disso, as três espécies de pinguins amostradas no presente estudo foram positivas, em termos de hemoparasitismo, e tiveram as prevalências de infecção estimadas pela primeira vez (*P. adeliae*, 8,11%; *P. papua*, 6,66%; *P. antarctica*, 3,07%). Embora esses números pareçam baixos, os dados de prevalência desse

estudo são importantes visto que, segundo RAPPORT (2007), qualquer variação na prevalência de parasitos pode ser um sinal de “síndrome de ecossistema em perigo”. A introdução de patógenos resistentes causadores de infecção ou doença em uma população susceptível pode ter desastrosas conseqüências (BENSCH *et al.*, 2000), visto que relatos de extinções de espécies silvestres têm sido explicados por parasitos e doenças (MCCALLUM & DOBSON, 1995).

Um dos principais fatores que afeta a saúde do ecossistema antártico é a crescente alteração climática, por meio da relação entre mudança climática e presença humana, associado ao aumento dos limites de distribuição, abundância e / ou virulência de parasitas e patógenos (HARVELL *et al.*, 2002; EPSTEIN *et al.*, 2003). Segundo JONES *et al.* (2002), uma pequena variação do clima pode permitir a presença de outros artrópodes vetores e, portanto, aumentar a entrada de parasitos transmitidos pelo sangue nesse ecossistema. Entretanto, há escassos estudos sobre esses e diversos outros artrópodes no mundo. Segundo QUILLFELDT *et al.* (2011), é necessário um maior esforço para que se identifiquem os possíveis artrópodes vetores, de forma a conhecer sua biologia e distribuição e entender as relações ecológicas ainda pouco conhecidas entre parasito-hospedeiro.

Os resultados inéditos do presente estudo, referentes à presença de hemoprotozoários na Antártica, devem servir como ponto de partida para que lacunas de conhecimento dos sistemas parasito-hospedeiro sejam preenchidas, a fim de contribuir para preservação do ambiente antártico. Nesse contexto, sugere-se fortemente que mais estudos com hemoparasitos sejam realizados com aves e com os demais vertebrados da Antártica, envolvendo todas as possíveis técnicas de detecção desses parasitos, além de mais estudos com os artrópodes existentes na região. Além disso, mais estudos sobre as rotas migratórias de pinguins e skuas antárticos devem ser realizados, visto que ainda não se tem conhecimento sobre a origem da infecção por esses hemoparasitos, o que pode ser um aspecto chave no que diz respeito ao monitoramento de populações e à conservação de aves na região Antártica.

## REFERÊNCIAS

- ALLANDER, K. Reproductive investment and parasite susceptibility in the Great Tit. *Functional Ecology*. 1997; 11: 358–364.
- ANDERSON, R.M. & MAY, R.M. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology*. 1978; 47: 219-247.
- ANDERSON, R.M. & MAY, R.M. Population biology of infectious diseases. *Nature*. 1979; 280: 361-7.
- ARCTANDER, P. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal of Ornithology*. 1988; 129: 205-216.
- ARIGONY, J.; SIMÕES, J.C.; BREMER, U. F.; DANI, N. Perspectives for environmental management of the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Revista do Departamento de Geografia*. 2002; 15: 91-99.
- ATKINSON, C.T. Avian Malaria. In : ATKINSON, C.T., THOMAS, N.J. & HUNTER, D.B., editores. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Ames: John Wiley & Sons; 2008. p.28; p.35.
- ATKINSON, C.T.; DUSEK, R.J.; WOODS, K.L. & IKO, W.M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*. 2000; 36:197-204.
- ATKINSON, C.T.; FORRESTER, D.J. & GREINER, E.C. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Parasitology*. 1988;74: 228–239.
- ATKINSON, C.T. & VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leukocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: LOYE, J.E. & ZUK, M., editores. *Bloodparasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour*. Oxford University Press; 1991. p.19- 47.
- ATKINSON, C.T.; WOODS, K.L.; DUSEK, R.J.; SILEO, L.S. & IKO, W.M. Wildlife disease and conservation in Hawaii: Pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology*. 1995; 111: S59–69.
- BAS. British Antarctic Survey. Antarctic digital database, Version 3.0, Manual and bibliography. Cambridge: ScientificCommittee on Antarctic Research; 2000. p.74.
- BAKER, J.R. Biology of the trypanosomes of birds. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., editores. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press; 1976, 1: p.131–174.
- BAKER, S.C. & BARBRAUD, C. Foods of the South Polar skua *Catharacta maccormicki* at Ardery Island, Windmill Islands, Antarctica. *Polar Biology*. 2001; 24: 59-61.

BARBOSA, A. & PALÁCIOS, M.J. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biology*. 2009; 32: 1095–1115.

BARKER Jr., R.H.; BANCHONGAKSORN, T.; CURVAL, J. M. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerise chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1992; 46 (4): 416-26.

BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; COVAS, R.; MELO, M.; WARREN, B. H.; ATKINSON, C.T.; BENSCH, S.; GRAVES, G. R.; JHALA, Y. V; PEIRCE, M. A.; RAHMANI, A.R.; FONSECA, D.M. & FLEISCHER, R.C. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal SocietyB*. 2006;273: 2935-44.

BEARHOP, S.; GRIFFITH, R.; ORR, K.; FURNESS, R.W. The normal haematology of Great Skuas (*Catharacta skua*) in the wild. *Comparative Haematology International*. 1999; 9 (2): 107-9.

BECKER, C.D. & HOLLOWAY, H.L. A survey for haematozoa in Antarctic vertebrates. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1968; 87: 354-60.

BENNETT, G.F.; BISHOP, M.A. & PEIRCE, M.A. Checklist of the avian species of *Plasmodium Marchiafava* and *Celli*, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. *Systematic Parasitology*. 1993a; 26:171–9.

BENNETT, G.F.; EARLE, R.A. & PEIRCE, M.A. New species of avian *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and a redescription of *Hepatozoon neophrontis* (Todd and Wolbach, 1912) Wenyon 1926. *Systematic Parasitology*. 1992; 23: 183–193.

BENNETT, G.F. & PEIRCE, M.A. Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890. *Journal of Natural History*. 1988;22: 1683–96.

BENNETT, G.F. & PEIRCE, M.A. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). *Journal of Natural History*. 1990; 24, 311–25.

BENNETT, G.F.; PEIRCE, M.A.; ASHFORD, R.W. Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History*. 1993b; 27:993–1001.

BENNETT, G.F.; SIIKAMAKI, P.; RATTI, O.; ALLANDER, K.; GUSTAFSSON, K. & SQUIRES-PARSONS, D. Trypanosomes of some Fennoscandian birds. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 531-537.

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; ÖRJAN, Ö.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H. & PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London, B*. 2000; 267: 1583–9.

BIRKENMAJER, B.K. Tertiary volcanic-sedimentary succession at Admiralty Bay, King George Island (South Shetland Islands, Antarctic). *Studia geologica polonia*. 1980;64: 7-65.

BISHOP, M.G. & BENNETT, G.F. Host-parasite catalogue of avian Haematozoa. Dept. of Biology, Memorial University of Newfoundland. Occasional Papers in Biology, St John's, Newfoundland Canada .1992; (1 Suppl 15): S209.

BRAGA, E. M.; Belo, N.O. & PINHEIRO, R.T. Técnicas para estudo de hemoparasitos em aves. In: VON MATTER, S.; STRAUBE, F.; ACCORDI, Y.; PIACENTINI, V. & CÂNDIDO-JR, J.F., organizadores. Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento. Rio de Janeiro: Technical Books; 2010. 1: pp.395-411.

BROOKE, M.D.L.; KEITH, D.&ROV, N. Exploitation of inland-breeding Antarctic petrels by south polar skuas. *Oecologia*. 1999; 121: 25–31.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M. &SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*. 1997; 83: 575-83.

CIAPUTA, P. & SALWICKA, K. Tourism at Antarctic Arctowski Station 1991–1997: policies for better management. *Polish Polar Research*. 1997; 20: 65–75.

COHEN, B.L.; BAKER, A.J.; BLECHSCHMIDT, K.; DITTMANN, D.L.; FURNESS, R.W.; GERWIN, J.A.; HELBIG, A.J.; DE KORTE, J.; MARSHALL, H.D.; PALMA, R.L.; PETER, H-U.; RAMLI, R.; SEIBOLD, I.; WILLCOX, M.S.; WILSON, R.H. & ZINK, R.M. Enigmatic phylogeny of Skuas (Aves: Stercorariidae). *Proceedings of Royal Society of London Biological Sciences*. 1997; 264: 181–190.

COSTA, E.S. *Biologia e comportamento reprodutivos, análises não invasivas de mercúrio e ecologia do estresse em skuas antárticas (Catharacta spp.)*. 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Ecologia)- Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

COSTA, E.S. & ALVES, M.A.S. Biologia reprodutiva e ecologia comportamental de Skuas antárticas *Catharacta maccormicki* e *C. lonnbergi*. *Oecologia Brasiliensis*. 2007; 11: 78-94.

COSTA, E.S.&ALVES, M.A.S. The breeding birds of Hennequin Point: an ice free area of Admiralty Bay (Antarctic Specially Managed Area), King George Island, Antarctica. Ararajuba. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 2008; 16: 137-141.

COSTA, E.S. & ALVES, M.A.S. Climatic changes, glacial retraction and the skuas (*Catharacta* sp. Stercorariidae) in Hennequin Point (King George Island, Antarctic Peninsula). *Pesquisa Antartica Brasileira*. 2012; 5: 163-70.

DAVIS, L.S.; BOERSMA, P.D. & COURT, G.S. Satellite telemetry of the winter migration of Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *Polar Biology*. 1996; 16: 221- 225.

DEL CERRO, S.; MERINO, S.; MARTÍNEZ-DE-LA-PUENTE, J.; LOBATO, E.; RUIZ-DE-CASTAÑEDA, R.; RIVERO-DE-AGUILAR, J.; MARTÍNEZ, J.; MORALES, J.; TOMÁS, G. & MORENO, J. Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Oecologia*. 2010; 162: 825-35.

DESSER, S.S. & BENNETT, G. F. The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepaticystis*. KREIR, J.P & BAKER, J.R., editores. In: Parasitic Protozoa. New York: Academic Press;1993. p.273–307.

DESSER, S.S. & RYCKMAN, A.K. The development and pathogenesis of *Leucocytozoon simondi* in Canada and domestic geese in Algonquin Park, Ontario. Canadian Journal of Zoology. 1976;54: 634–43.

EARLÉ, R.A.; HUCHZERMAYER, F.W.; BENNETT, G.F. & BROSSY, J.-J. *Babesia peircei* sp. nov. from the Jackass Penguin. African Zoology. 1993;28: 88–90.

EARLÉ, R.A. & UNDERHILL, L.G. Absence of haematozoa in some Charadriiformes breeding in the Taimyr Peninsula, Russia. Ardea. 1992; 81: 21-4.

ENGSTRÖM, H.; DUFVA, R. & OLSSON, G. Absence of haematozoa and ectoparasites in a highly sexually ornamented species, the crested auklet. Waterbirds. 2000; 23:486–8.

ENTICOTT, J.W. Distribution of penguins at sea in the South- eastern Atlantic and Southwestern Indian Oceans. Cormorant. 1986; 13: 118-42.

EPSTEIN, P.R.; CHIVIAN, E. & FRITH, K. Emerging diseases threaten conservation. Environmental Health Perspective. 2003; 111: A506–7.

FALLIS, A.M.; BISSET, S.A. & ALLISON, F.R. *Leucocytozoon tawaki* n. sp. (Eucoccida: Leucocytozoidae) from the penguin *Eudyptes pachyrhynchus*, and preliminary observations on its development in *Austrosimulium* spp. New Zealand Journal of Zoology. 1976; 3: 11-6.

FELDMAN, R.A.; FREED, L.A. & CANN, R.L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. Molecular Ecology. 1995; 4: 663-73.

FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C. & AQUINO, F. E. Série temporal de temperatura atmosférica para a Ilha Rei George, Antártica. Revista do Departamento de Geografia. 2001; 14: 25-32.

FLEISCHMAN, R.W.; SQUIRE, R.A.; SLADEN, W.J.L. & MELBY, E.C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). Journal of the American Veterinary Medical Association. 1968; 153: 928–35.

FIGUEROLA, J. Effects of salinity on rates of infestation of waterbirds by haematozoa. Ecography . 1999; 22:681–5.

GARNHAM, P.C.C. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell, Oxford;1966.

GRACZYK, T.K.; COCKREM, J.F.; CRANFIELD, M.R.; DARBY, J.T. & MOORE, P. Avian malaria sero-prevalence in wild New Zealand penguins. Parasite-Journal de la Societé Française de Parasitologie. 1995; 2 : 401-5.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; MCCUTCHAN, T.F. & BICKNESE, E.J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). Parasitol. Res., 1994; 80: 634–7.

- GREINER, E.C. *Isospora*, *Atoxoplasma*, and *Sarcocysti*. In: ATKINSON, C.T., THOMAS, N.J. & HUNTER, D.B., editores. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Ames: John Wiley & Sons; 2008. p.109.
- GREINER, E.C.; BENNETT, G. F.; WHITE, E. F. & COOMBS, R.F. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Canadian Journal of Zoology*. 1975; 53: 1762-87.
- GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M.C.; ORR, K. & DAWSON, R.J.G. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 1998; 7: 1071-5.
- HAKKARAINEN, H.; ILMONEN, P.; KOIVUNEN, V. & KORPIMAKI, E. Blood parasites and nest defense behaviour of Tengmalm's owls. *Oecologia*. 1998; 114: 574-7.
- HAMILTON, W. D. & ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science*. 1982; 218: 384-7.
- HARVELL, C.D.; MITCHELL, C.E.; WARD, J.R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A.P.; OSTFELD, R.S. & SAMUEL, M.D. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*. 2002; 296: 2158-63.
- HENNING, L.; FELGER, I. & BECK, H. P. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Tropica*. 1999; 72: 149-55.
- HŔRAK, P.; OTS, I.; VELLAU, H.; SPOTTISWOODE, C.; MŔLLER, A.P. Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia*. 2001;126: 166-73.
- HUBALEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40: 639-59.
- JONES, H.I. Notes on Parasites in Penguins (Spheniscidae) and Petrels (Procellariidae) in the Antarctic and Sub-antarctic. *Journal of Wildlife Diseases*. 1988; 24: 166-7.
- JONES, H.I.; GALLAGHER, J.M. & MILLER, G.D. Survey of South Polar Skuas (*Catharacta maccormicki*) for blood parasites in the Vestfold Hills region of Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*. 2002; 38: 213-5.
- JONES, H. I. & SHELLAM, G. R. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. *Polar Biology*. 1999; 21(1): 5-10.
- JONES, H.I. & WOEHLE, E.J. A new species of blood trypanosome from Little Penguins (*Eudyptula minor*) in Tasmania. *Journal of Protozoology*. 1989; 36: 389-90.
- JOVANI, R.; TELLA, J.L.; FORERO, M.G.; BERTELLOTTI, M.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O.; DONAZAR, J.A. Apparent absence of blood parasites in the Patagonian seabird community: is it related to the marine environment? *Waterbirds*. 2001; 24: 430-3.
- KIRKPATRICK, M. & RYAN, M.J. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*. 1991; 350: 33-8.

- KOPP, M.; PETER, H.-U.; MUSTAFA, O.; LISOVSKI, S.; RITZ, M.S.; PHILLIPS, R.A. & HAHN, S. South polar skuas from a single breeding population overwinter in different oceans though show similar migration patterns. *Marine Ecology Progress Series*. 2011; 435: 263-7.
- KORPIMAKI, E.; HAKKARAINEN, H. & BENNETT, G. F. Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owls: detrimental effects on females but not on males? *Functional Ecology*. 1993;7: 420-6.
- LAIRD, M. A lack of avian and mammalian haematozoa in the Antarctic and Canadian Arctic. *Canadian Journal of Zoology* .1961; 39: 209-13.
- LEVIN, I.I.; OUTLAW, D.C.; VARGAS, F.H. & PARKER, P.G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biology of Conservation*. 2009; 142: 3191-5.
- LITTLE, R.M. & EARLÉ, R. A. Sandgrouse (Pterocleididae) and sociable weavers *Philetarius socius* lack avian Haematozoa in semi-arid regions of South Africa. *Journal of Arid Environments*. 1995; 30: 367-70.
- MADSEN, V.G.; IEZHOVA, T.A.; MERCADE, C.; SANCHEZ, M. & OSORNO, J.L. Testosterone levels and gular pouch coloration in courting magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*): variation with age-class, visited status and blood parasite infection. *Hormones and behavior* . 2007; 51: 156-63.
- MARTINEZ-ABRAÍN, A.; ESPARZA, B. & ORO, D. Lack of blood parasites in bird species: Does absence of blood parasite vectors explain it all? *Ardeola*. 2004; 51: 225-32.
- MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-DE-LA-PUENTE, J.; HERRERO, J.; DEL CERRO, S.; LOBATO, E.; RIVERO-DE-AGUILAR, J.; VASQUEZ, R.A. & MERINO, S. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology*. 2009; 136: 713-22.
- MARZAL, A.; LOPE, F.; NAVARRO, C. & MOLLER, A. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*. 2005; 142: 541-5.
- MAXSON, S.J.&BERNSTEIN, N.P. Kleptoparasitism by south polar skuas on blue-eyed shags in Antarctica. *Wilson Bulletin*. 1982; 94: 269-281.
- MCCALLUM, H. & DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*. 1995; 10: 190-4.
- MENDES, L.; PIERSMA, T. ; LECOQ, M. ; SPAANS, B.; & RICKLEFS, R. E. Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats. *Oikos*. 2005; 109: 396-404.
- MERINO, S.; BARBOSA, A.; MORENO, J. & POTTI, J. Absence of haematozoa in a wild chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* population. *Polar Biology*. 1997; 18:227-8.
- MERINO, S. & MINGUEZ, E. Absence of hematozoa in a breeding colony of the storm petrel *Hydrobates pelagicus*. *Ibis*. 1998; 140:180-1.

- MERINO, S.; MORENO, J.; SANZ, J.J. & ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). Proceedings of the Royal Society of London B. 2000; 267: 2507-10.
- MOLLER-SCHWARZE, D.& MOLLER-SCHWARZE, C. Differential predation by South Polar Skuas in an Adelie Penguin rookery. Condor. 1973; 75: 127-31.
- MOLYNEUX, D. H.; COOPER, J. E. & SMITH, W. J. Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection and experimentally infected canaries. Parasitology. 1993; 87: 49-54.
- MONCORPS, S.; CHAPUIS, J.L.; HAUBREUX, D.& BRETAGNOLLE, V. Diet of the brown skua (*Catharacta lonnbergi*) on the Kerguelen archipelago: comparisons between techniques and between islands. Polar Biology. 1998; 19: 9-16.
- MURRAY, M.D. & VESTJENS, W.J.M. Studies on the ectoparasites of seals and penguins. Australian Journal of Zoology . 1967; 15: 715-25.
- NICHOLLS, J. A.; DOUBLE, M. C.; ROWELL, D. M.& MAGRATH, R. D. The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). Journal of Avian Biology. 2000; 31(2): 165-76.
- NORMAN, F.I.& WARD, S.J. Foods of the South Polar skua at Hop Island, Rauer Group, East Antarctica. Polar Biology. 1990; 10: 489-93.
- OLSEN, P. F; SHOEMAKER, J. P.; TURNER, H. F. & HAYS, K. L. Incidence of *Trypanosoma cruzi* (chagas) in wild vectors and reservoirs in east-central Alabama. Journal of Parasitology. 1964; 50: 599-603.
- PARTINGTON, C. J., GARDINER, C. H., FRITZ, D., PHILLIPS JR, L. G., & MONTALI, R. J. Atoxoplasmosis in Bali mynahs (*Leucopsar rothschildi*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 1989; 328-35.
- PATZ, J. A. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. Environmental Health Perspectives. 2000; 112: 1092-98.
- PEIRCE, M. A. *Nuttallia* França, 1909 (Babesiidae) preoccupied by *Nuttallia* Dall, 1898 (Psmammobiidae): A re-appraisal of the taxonomic position of the avian piroplasms. International Journal for Parasitology. 1975; 5: 285-7.
- PEIRCE, M.A. A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893 (Apicomplexa: Piroplasmorida: Babesiidae). Journal of Natural History. 2000; 34: 317-32.
- PEIRCE, M.A.; GREENWOOD, A.G. & STIDWORTHY, M.F. *Leucocytozoon* in captive penguins. Veterinary Record. 2005; 157, 819-20.
- PEIRCE, M.A. & BROOKE, M. Failure to detect blood parasites in seabirds from the Pitcairn Islands. Seabird. 1993; 15: 72-4.

- PEIRCE, M.A.; JAKOB-HOFF, R.M. & TWENTYMAN, C. New species of haematozoa from Apterygidae in New Zealand. *Journal of Natural History*. 2003;37: 1797–804.
- PEIRCE, M. A. & PRINCE, P. A. *Hepatozoon albatrossi* sp nov. (Eucoccida: Hepatozidae) from *Diomedea* spp in the Antarctic. *J Nat Hist*. 1980; 14: 447–52.
- PERLMAN, S. J. & JAENIKE, J. Infection success in novel hosts : an experimental in phylogenetic study of *Drosophila* – parasitic nematodes. *Evolution*. 2003; 57: 544-57.
- PHILLIPS, R.A.; PHALAN, B.& FORSTER, I.P. Diet and long-term changes in population size and productivity of brown skuas (*Catharactaantarctica lonnbergi*) at Bird Island, South Georgia. *Polar Biology*. 2004; 27: 555–61.
- PIERSMA, T. Do global patterns of habitat use and migration strategies coevolve with relative investment in immunocompetence due to spetial variation in parasites presure? *Oikos*. 1997; 80: 623-31.
- PIETZ, P.J. Feeding and nesting ecology of sympatric South Polar and Brown Skuas. *Auk*.1987; 104: 617-27.
- QUILLFELDT, P.; ARRIERO, E.; MARTÍNEZ, J.; MASELLO J. F. & MERINO, S. Prevalence of blood parasites in seabirds – a review. *Frontiers in Zoology*. 2011; 8:26.
- QUILLFELDT, P.; MARTÍNEZ, J.; HENNICKE, J.; LUDYNIA, K.; GLADBACH, A.; MASELLO, J.F.; RIOU, S. & MERINO, S. Hemosporidian blood parasites in seabirds-a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. *Naturwissenschaften*. 2010; 97: 809-17.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Environmental conditions and the functioning of Admiralty Bay (South Shetland Islands) as a part of the near shore Antarctic ecosystem. *Polish Polar Ressearch*, 1980;1: 11-27.
- RAKUZA-SUSZCZEWSKI, S. King George Island. South Shetland Islands, Maritime Antarctic. In: BEYER, L. & BÖLTER, M., editores. *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal LandsCabos*. Berlin:Ecological Studies; 2002.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S.; MIETUS, M. & PIASECKI, J. Weather and climate. In: Rakusa-Suszczewski, S., editor. *The Maritime Antarctic coastal ecosystem of Admiralty Bay*. Warsaw: Department of Antarctic biology, Polich Academy of Sciences; 1993.
- RAPPORT, D.J. Sustainability science: an ecohealth perspective. *Sustain Science*. 2007; 2: 77–84.
- RIBEIRO, S.F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F.C.S.;MARINI, M.A.; VAGO, A.R. & BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology*. 2005; 130: 261-7.
- RICHARD, F.A.; SEHGAL, R.N.M.; JONES, H.I. & SMITH, T.B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology*. 2002;88: 819-22.

RICKLEFS, R.E. Embryonic development period and prevalence of avian blood parasites. *Proceedings of the National Academy Science*. 1992; 89: 4722-5.

RICKLEFS, R.E. & FALLON, S.M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 2002; 269: 885-92.

SAMOUR, J.H. & NALDO, J.N. Serratospiculiasis in Captive Falcons in the Middle East: A review. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2001; 15: 2–9.

SANDER, M.; CARNEIRO, A.P.B.; BALBAO, T.C.; BAYS, S.R.; COSTA, E.S.; MASCARELLO, N.E.; OLIVA, T.D. & DOS SANTOS, C.R. Status and Trends of Antarctic Seabirds at Admiralty Bay, King George Island. *Polarforschung*. 2006; 75 (2-3): 145-50.

SAVAGE, A.F., ARIEY, F. & GREINER, E.C. *Leucocytozoon atkinsoni* n. sp. (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the avian family Timaliidae. *Systematic Parasitology* . 2006; 64, 105–109.

SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; OTT, P.H. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet managment objectives. *Journal of Cetacean Research and Management*. 2003; 5 (1): 61-8.

SEHGAL, R.N.M., JONES, H.I. & SMITH, T.B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* . 2001; 10: 2319–27.

SHELDON, B. C. & VERHULST, S. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*. 1996; 11(8): 317-21.

SOL, D.; JOVANI, R. & TORRES, J. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*. 2003; 135: 542–7.

SORCI, G.; CLOBERT, J. & MICHALAKIS, Y. Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard (*Lacerta vivipara*) . *Oikos* . 1996; 76: 121-30.

STERNER, M.C.III & COLE, R.A. *Diplotriaeana*, *Serratospiculum*, and *Serratospiculoides*. In: ATKINSON, C.T., THOMAS, N.J. & HUNTER, D.B., editores. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Ames: John Wiley & Sons; 2008.

STERNER, M.C.III & ESPINOSA, R.H. *Serratospiculoides amaculata* in a Cooper's hawk *Accipiter cooperii*. *Journal of Wildlife Disease*. 1988; 24: 378 - 9.

TAFT, S.; SCHUCHOW, K. & HORN, M.V. Helminths from some Minnesota and Wisconsin raptors. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 1993; 60: 260–3.

TRILLMICH, E. Feeding territories and breeding success of South Polar Skuas. *Auk*. 1978; 95: 23-33.

TRIVELPIECE, W.; BUTLER, R.G. & VOLKMAN, N.J. Feeding territories of brown skuas (*Catharacta lonnbergi*). *Auk*. 1980; 97: 669-76.

- TRIVELPIECE, W.Z; TRIVELPIECE, S.G. & VOLKMAN, N.J. Ecological Segregation of Adelie, Gentoo, and Chinstrap Penguins at King George Island, Antarctica. *Ecology*. 1987; 68 (2): 351-61.
- TURNER, J; COLWELL, S.R. & MARSHALL, G.J.; LACHLAN - COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A. & IAGOVKINA, S. Antarctic climate change during the last 50 years. *International journal of Climatology*. 2005; 25(3), 279-94.
- VALERA, F.; CARRILLO, C.M.; BARBOSA, A. & MORENO, E. Low prevalence of haematozoa in trumpeter finches *Bucanetes githagineus* from south-eastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. *Journal of Arid environments*. 2003; 55:209–213.
- VALKIUNAS, G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. Boca Raton: CRC Press; 2005.
- VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C.T. & SEED, T.M. Plasmodia of birds. In: KREIER, J.P., editor. *Parasitic protozoa*. San Diego : Academic Press; 1994. 73–140p.
- VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GAFF, M. L. & LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaii land birds. *Ecological Monographs*. 1986; 56: 327-44.
- VANSTREELS, R.E.T.; MIRANDA, F.R.; RUOPPOLO, V.; REIS, A.O.A.; COSTA, E.S.; PESSÔA, A.R.L.; TORRES, J.P.M.; CUNHA, L.S.T.; PIUCO, R.C.; VALIATI, V.H.; GONZÁLES-ACUÑA, D.; LABRUNA, M.B.; PETRY, M.V.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J.L. Investigation of blood parasites of pygoscelid penguins at the King George and Elephant Islands, South Shetlands Archipelago, Antarctica. *Polar Biology*. 2013.
- VOTIER, S.C.; BEARHOP, S.; MACCORMICK, A.; RATCLIFFE, N. & FURNESS, R.W. Assessing the diet of great skuas, *Catharacta skua*, using five different techniques. *Polar Biology*. 2003;26: 20–6.
- VOTYPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M. & LUKES, J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* . 2002; 125: 253–63.
- VOTYPKA, J. & SVOBODOVA, E. M. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*. 2004; 92: 147-51.
- WALDENSTROM, J.; BROMAN, T.; CARLSSON, I.; HASSELQUIST, D.; ACHTERBERG, R.P.; WANEGAAR, J.A. & OLSE, B. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 5911–17.
- WALLWORK, J. A. Zoogeography of some terrestrial micro - Arthropoda in Antarctica. *Biological Reviews*. 1973; 48(2), 233-59.

- WATSON, G.E. Birds of the Antarctic and Sub-Antarctic. Washington: Antarctic Research Series – American Geophysical Union; 1975. p.349.
- WEATHERHEAD, P.J. & BENNETT, G.F. Ecology of red-winged blackbird parasitism by haematozoa. Canadian Journal of Zoology. 1991;69: 2352–59.
- WILLIAMS, T.D. The penguins. Oxford: Oxford University Press; 1955.
- WILSON, N. Acarina: Mesostigmata: Halarachnidae, Rhinonyssidae of South Georgia, Heard and Kerguelen. Pac Insects Monogr . 1970; 23: 71–7.
- WILSON, R.P.; ALVARREZ, B.; LATORRE, L.; ADELUNG, D.; CULIK, B. & BANNASCH, R. The movements of gentoo penguins *Pygoscelis papua* from Ardley Island, Antarctica. Polar Biology. 1998; 19(6): 407-13.
- WHITE, E.M., GREINER, E.C. ; BENNETT, G.F. & HERMAN, C.M. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. Revista de Biología Tropical . 1978; 26: 43–102.
- WHITE, M.G. & CONROY, J.W.H. Aspects of competition between pygoscelid penguins at Signy Island, South Orkney Islands. Ibis . 1975; 117: 371-73.
- WOODS, R.; JONES, H.I.; WATTS, J.; MILLER, G.D. & SHELLAM, G.R. Diseases of Antarctic seabirds. In: KERRY, K.R. & RIDDLE, M.J., editores. Health of Antarctic Wildlife. Heidelberg: Springer; 2009. pp.35-55.
- YOUNG, E.C. Skua and penguin, predator and prey. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.
- ZIPAN, W.& NORMAN, F.I. Foods of the south polar skua *Catharacta maccormicki* in the eastern Larsemann Hills, Princess Elizabeth Land, East Antarctica. Polar Biology. 1993; 13: 255–62.