

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TREMATÓDEOS RENAIIS EM AVES SELVAGENS:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Mariele de Santi
Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TREMATÓDEOS RENAIIS EM AVES SELVAGENS:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Mariele de Santi

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

2017

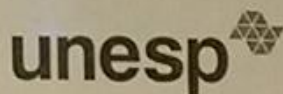
S235a Santi, Mariele de
Trematódeos renais em aves selvagens: aspectos
histopatológicos, morfológicos e moleculares / Mariele de Santi. –
Jaboticabal, 2017
XLVII, 47 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Karin Werther
Banca examinadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe, Tânia de
Freitas Raso
Bibliografia

1. Aves. 2. Histopatologia. 3. Digenea. 4. Eucotylidae. 5.
Trematoda. 6. *Paratanaisia* I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:636.6

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TREMATÓDEOS RENAIIS EM AVES SELVAGENS: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

AUTORA: MARIELE DE SANTI

ORIENTADORA: KARIN WERTHER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KARIN WERTHER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. TÂNIA DE FREITAS RASO
USP / São Paulo, SP
Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIELE DE SANTI – Nascida em 13 de abril de 1988, em Concórdia, Santa Catarina. Filha de Ivanir Antonio de Santi e Geni Maria de Santi. Ingressou em fevereiro de 2010 no curso de Medicina Veterinária no Instituto Federal Catarinense – IFC Câmpus Concórdia, onde se graduou em março de 2014. Ingressou no programa de Pós-graduação, nível mestrado, em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus Jaboticabal, em março de 2015, com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, de 18 meses.

**A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez.**

George Bernard Shaw

DEDICO...

À minha mãe **Geni** e meu pai **Ivanir**
pelo esforço e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades oferecidas.

À FCAV/Unesp, por disponibilizar este programa de Pós-graduação, fornecer suporte laboratorial, estrutural, técnico e bibliográfico de ótima qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio à pesquisa 2015/22851-8.

À Profa. Karin Werther, pela orientação e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Marcos Rogério André, pelo apoio laboratorial, contribuições na qualificação, ensinamentos na área de biologia molecular e prontidão em todos os momentos.

Ao Prof. Estevam Guilherme Lux Hoppe, pelo apoio laboratorial e auxílio na área de parasitologia.

Ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte pelas contribuições no exame de qualificação.

À técnica Francisca de Assis Ardisson pelo excelente trabalho de confecção das lâminas histológicas.

À minha irmã Tatiane de Santi, pelo apoio e valiosos conselhos nos momentos difíceis.

Ao Mauricio Baldi, por me apoiar durante grande parte desta caminhada.

Às colegas do Departamento de Patologia Veterinária, Juliana Paula de Oliveira e Aline Eyko Kawanami e às colegas do ambulatório de animais selvagens, Júlia Maria Ribeiro e Lívia Perles, vocês tornaram meus dias mais felizes.

Aos meus pais Ivanir e Geni de Santi, por apoiarem meus sonhos, independente de quais fossem.

.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Afecções parasitárias em aves selvagens.....	2
2.2 Anatomia e histologia do sistema urinário em aves.....	3
2.3 <i>Paratanaisia</i> spp.....	6
2.3.1 Taxonomia e morfologia	6
2.3.2 Biologia	8
2.3.3 Patogenia.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Material de arquivo.....	12
3.3 Procedimentos laboratoriais.....	13
3.3.1 Detecção de ovos de <i>Paratanaisia</i> spp. nos excrementos.....	13
3.3.2 Avaliação histopatológica	14
3.3.3 Identificação morfológica dos parasitos	15
3.3.4 Análises moleculares	16
Extração do DNA dos parasitos.....	16
Extração de DNA do tecido renal parafinizado	16
PCR convencional para o gene endógeno GAPDH	17
PCR convencional para os genes 28S rDNA e 18S rDNA.....	17
Eletrforese de DNA em gel de agarose	18
Purificação dos produtos amplificados na PCR convencional	19
Sequenciamento.....	19
Análise das sequências	19

4 RESULTADOS.....	22
4.1 Detecção de ovos de <i>Paratanaisia</i> spp. nos excrementos das aves vivas	22
4.2 Necropsias realizadas em 2015 e 2016	23
4.3 Material de arquivo: blocos de parafina e lâminas histológicas.....	23
4.4 Avaliação necroscópica e histopatológica: Necropsias e material de arquivo ...	24
4.5 Identificação morfológica dos parasitos	27
4.6 Análises moleculares.....	29
4.6.1 Detecção dos genes GAPDH, 28S rDNA e 18S rDNA.....	29
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO.....	39
7 REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	407



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

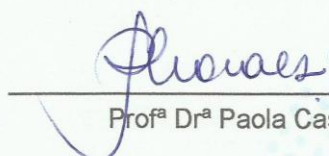


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009414/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo da patogenia e caracterização molecular do trematoda renal *Paratanaisia* spp. em diversas espécies de aves selvagens**", sob a responsabilidade do Prof^a. Dr^a. Karin Werter, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado "Ad-referendum" da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em 20 de maio de 2015.

Jaboticabal, 20 de maio de 2015.


Prof^a Dr^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49343-1	Data da Emissão: 27/05/2015 12:35	Data para Revalidação*: 25/06/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: karin werther	CPF: 532.920.309-00
Título do Projeto: Estudo da Patogenia e caracterização molecular do trematoda renal Paratanasia spp em diversas especies de aves selvagens	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita de material, análise, interpretação e redação do trabalho final	07/2015	08/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Aline Kawanami	colheita de material biológico	326.770.618-13	284615985 SSP-SP	Brasileira
2	Livia Perles	colheita de material biológico	409.689.888-06	48637144x ssp-SP	Brasileira
3	Estevam Guilherme Lux Hoppe	colheita e processamento de material biológico	216.001.668-30	304783602 SSP-SP	Brasileira
4	MARIELE DE SANTI	colheita, processamento e análise de material biológico	058.614.069-79	3942192 SSP-SC	Brasileira
5	Juliana Paula de Oliveira	colheita de material biológico	047.224.079-08	68720087 SSP-PR	Brasileira
6	Marcos Rogério André	Análise e processamento de material biológico	302.435.148-59	32655201-7 SSP-SP	Brasileira
7	Julia Maria Ribeiro	colheita de material biológico	380.710.898-00	463488283 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICABAL	SP	UNESP FCAV Campus de Jaboticabal-SP	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47959325



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49343-1	Data da Emissão: 27/05/2015 12:35	Data para Revalidação*: 25/06/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: karin werther	CPF: 532.920.309-00
Título do Projeto: Estudo da Patogenia e caracterização molecular do trematoda renal Paratanasia spp em diversas especies de aves selvagens	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Accipitriformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Anseriformes, Craciformes, Psittaciformes, Gruiformes, Cathartiformes, Piciformes, Galliformes, Cariamiformes, Strigiformes, Caprimulgiformes, Tinamiformes, Passeriformes, Columbiformes, Aves

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Outras amostras biológicas(urina), Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele
---	----------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47959325



Página 2/3

TREMATÓDEOS RENAIIS EM AVES SELVAGENS: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

RESUMO - Eucotíldeos digenéticos do gênero *Paratanaisia* são trematódeos, parasitos do sistema urinário de aves. Os efeitos da infecção por estes parasitos variam de alterações discretas até alterações macroscópicas e microscópicas moderadas a graves. Geralmente a parasitose é diagnosticada após a morte da ave, pela observação macro e microscópica dos parasitos e/ou de seus ovos no tecido renal. Diagnóstico *ante mortem* da infecção pode ser realizada pela observação dos ovos dos parasitos em avaliações coproparasitológicas. As três espécies do gênero: *Paratanaisia bragai*, *Paratanaisia robusta* e *Paratanaisia confusa*, apresentam características morfológicas muito similares entre si, gerando dificuldades na sua identificação. Assim, técnicas moleculares poderiam auxiliar na identificação dos trematódeos e na resolução das relações taxonômicas. Neste estudo, exames coproparasitológicos foram realizados em aves vivas objetivando a identificação de ovos dos parasitos nos excrementos. Além disso, amostras de parasitos e de tecido renal de aves selvagens infectadas por *Paratanaisia* foram avaliadas por meio de técnicas histopatológicas, morfológicas e moleculares, objetivando identificar os trematódeos e descrever os efeitos da infecção no sistema urinário. Vinte e duas aves foram submetidas à avaliação coproparasitológica, que resultou em negatividade em todos os casos. Histologicamente foram observados parasitos em 103 aves. As aves infectadas eram pertencentes a 24 espécies diferentes, o que representa 17 novos registros de hospedeiros susceptíveis. Os achados histológicos mais frequentes foram: ductos coletores distendidos (88%), além de compressão (72%) e descamação (64%) de seu epitélio. A análise morfológica dos parasitos, realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, revelou tratar-se de trematódeos do gênero *Paratanaisia*. Inferências filogenéticas baseadas no gene 18S rDNA separaram adequadamente os gêneros de trematódeos, entretanto, não foi possível realizar inferências a respeito da espécie. Os achados histopatológicos sugerem que *Paratanaisia* spp. possua potencial patogênico em uma ampla variedade de hospedeiros. Maiores estudos aliando técnicas morfológicas e moleculares são necessários para um melhor entendimento da taxonomia destes parasitos.

Palavras chave: Aves, Histopatologia, Digenea, Eucotylidae, Trematoda, *Paratanaisia*.

RENAL TREMATODE INFECTION IN WILD BIRDS: HISTOPATHOLOGICAL, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS

ABSTRACT- Eucotylidae digeneans of *Paratanaisia* genus are parasites of avian urinary tract. The effects of the infection by these parasites are variable, ranging from irrelevant alterations to significant macroscopic and microscopic changes. Usually the infection is diagnosed after the bird death, by means of macro and microscopic observation of parasites and eggs in the renal tissue. *Ante mortem* diagnose could be performed by observation of parasite eggs in coproparasitological evaluation. The three species of the genus: *Paratanaisia bragai*, *Paratanaisia robusta* e *Paratanaisia confusa*, present similar morphological features, causing difficulties in identification. Therefore, molecular techniques could help in trematodes identification and solve the taxonomic relations. In this study, coproparasitological exams were performed in live birds aimed the identification of parasite eggs in the excrements. Besides, renal and parasitological samples obtained from birds infected by *Paratanaisia* were evaluated by histological, morphological and molecular techniques, aiming to identify the trematodes and describe the effects of the infection in the urinary tissue. Twenty two alive birds were submitted to coproparasitological evaluation, which results negative in all the cases. Parasites were observed in 103 histological samples. The infected birds belonged to 24 different species, representing 17 new records of susceptible hosts. The most frequent histological alterations were: distended collecting ducts (88%), besides compression (72%) and destruction (64%) of the lining epithelial cells. The morphological evaluations from parasites, performed with stereoscope microscope, revealed *Paratanaisia* trematodes. Phylogenetic inferences based on 18S rDNA separated the trematodes genus, however, it was not possible to infer about the species. The histopathological finds suggest that *Paratanaisia* spp. may has pathogenic potential in a wide range of host. More studies allying morphological and molecular techniques are necessary to the better understanding of these parasites taxonomy.

Keywords: Birds, Histopathology, Digenea, Eucotylidae, Trematoda, *Paratanaisia*

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

°C - Celsius

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - deoxinucleotídeo trifosfato

G - gramas

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

MAFFT - multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences

mA - miliamper

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL - mililitro

mm - milímetros

mM - milimol

pb - pares de base

PBS - phosphate buffered saline

PCR - reação em cadeia da polimerase

P. bragai - *Paratanaisia bragai*

P. confusa - *Paratanaisia confusa*

P. robusta - *Paratanaisia robusta*

pH - potential of hydrogen

q.s.p. - quantidade suficiente para

rDNA - DNA ribossomal

TBE - Tris-borate-EDTA

V - Volts

U - Unidade

μL - microlitro

μm - micrômetro

μM - micromol

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Espécies de aves selvagens, provenientes de cativeiro e de vida livre, das quais foram obtidas amostras de excremento para a realização de técnicas coproparasitológicas visando a detecção de ovos de <i>Paratanaisia</i> spp.	22
Tabela 2	Ordens e espécies de aves necropsiadas pelo Serviço de Patologia Animais Selvagens (SEPAS) da FCAV/Unesp entre os anos de 2015 e 2016, nas quais foi identificada infecção por trematódeos renais.....	23
Tabela 3	Ordens e espécies de aves necropsiadas pelo Serviço de Patologia Animais Selvagens (SEPAS) da FCAV/Unesp entre os anos de 1994 a 2014 nas quais foram identificados histologicamente trematódeos renais.....	24
Tabela 4	Resultados das PCR convencionais dirigidas aos genes GAPDH, 18S rDNA e 28S rDNA em amostras de tecido renal parafinizado de aves parasitadas e pool de parasitos renais.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Foto de necropsia em perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>) evidenciando a localização do sistema renal. A: Rins encaixados nas depressões ventrais do sinsacro e na fossa renal de cada ílio (colchetes). B: Fossas vazias, depois da retirada dos rins (colchetes). Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.....	4
Figura 2	Esquema demonstrando a estrutura renal de uma ave. A- Rim trilobado. B- Conjunto de lóbulos de um lobo. C- Lóbulo renal demonstrando a localização de ductos coletores, néfrons tipo réptil, néfrons tipo mamífero e cone medular (Adaptado de SHERWOOD; KLANDORF; YANCEY, 2005)....	4
Figura 3	Fotomicrografia do rim de pombo doméstico (<i>Columba livia</i>), evidenciando os corpúsculos renais (1), túbulos contorcidos proximais (2) e túbulos contorcidos distais (3). Hematoxilina e eosina, escala 20µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.....	5
Figura 4	Fotomicrografia do detalhe da cutícula de trematódeos do gênero <i>Paratanaisia</i> . A- Cutícula espinhosa (seta). B- Cutícula escamosa (seta). Coloração Carmim clorídrico. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.....	7
Figura 5	Esquematização do ciclo dos trematódeos do gênero <i>Paratanaisia</i>	9
Figura 6	Recinto individual de periquito-do-encontro-amarelo (<i>Brotogeris chiriri</i>), evidenciando o fundo forrado com plástico descartável para colheita dos excrementos (seta). Fonte: Serviço de Medicina de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.....	13
Figura 7	Imagem de tecido renal de galinha d'Angola (<i>Numida meleagris</i>) observado em microscópio estereoscópico, demonstrando parasitos no interior de ductos coletores (setas). A- Escala 1mm. B- Escala 500µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.....	15
Figura 8	Fluxograma representando o material e métodos utilizado no presente estudo.....	21

- Figura 9** Fotomicrografia do tecido renal de pombo doméstico (*Columba livia*) evidenciando parasitos no interior de ductos coletores (setas), causando dilatação dos ductos parasitados e compressão do tecido adjacente. Hematoxilina e eosina, escala 100µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp..... 26
- Figura 10** Fotomicrografia do tecido renal de pombo doméstico (*Columba livia*) evidenciando compressão (cabeça de seta) e destruição (seta) das células epiteliais do ducto coletor. Hematoxilina e eosina, escala 50µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp..... 26
- Figura 11** Fotomicrografias do tecido renal de ave evidenciando parasitos no interior de ureter (setas). A- Perdiz (*Rhynchotus rufescens*), hematoxilina e eosina, escala 50µm. B- Jandaia coquinho (*Eupsittula aurea*). Hematoxilina e eosina, escala 50µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp..... 27
- Figura 12** Fotomicrografia de *Paratanaisia* spp., demonstrando posicionamento de ventosa oral (1), vitellaria (2), útero preenchido por ovos (3), ovário (4) e testículos (5). Coloração Carmim clorídrico, escala 200µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp..... 28
- Figura 13** Análise filogenética utilizando-se o método da Máxima Verossimilhança, com modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gamma e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), para um fragmento de aproximadamente 800pb do gene 18S rDNA. As sequências deste estudo estão em negrito. O posicionamento das sequências foi suportado por valores “bootstrap” (1000 réplicas). Valores de “bootstrap” acima de 50% são mostrados para cada clado. *Bothriocephalus* sp. e *Cleistobothrium* spp. foram utilizados como grupo externo..... 31
- Figura 14** Análise filogenética utilizando-se Inferência Bayesiana, com modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gamma e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), para um fragmento de aproximadamente 800pb do gene 18S rDNA. As sequências deste estudo estão em negrito. O posicionamento das sequências foi suportado por valores de probabilidade posterior (PP) (10^7). Valores de PP acima de 50% são mostrados para cada clado. *Bothriocephalus* sp. e *Cleistobothrium* spp. foram utilizados como grupo externo..... 32

1 INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias são frequentemente observadas em aves e seus efeitos podem ser muito variáveis. Muitos parasitos coexistem com seus hospedeiros em relações simbióticas, que são caracterizadas como infecções benignas, sem causar alterações patológicas. Entretanto, parasitos recentemente introduzidos em um novo hospedeiro podem causar doença crônica ou até mesmo morte aguda. Da mesma forma, parasitos relativamente apatogênicos podem provocar doença severa em aves imunossuprimidas ou com infecções concomitantes (GREINER; RITCHIE, 1994). Alguns parasitos são espécie específicos, enquanto outros podem infectar uma ampla variedade de espécies.

Os trematódeos do gênero *Paratanaisia* já foram descritos acometendo diversas espécies de aves (TAVELA et al., 2014; XAVIER et al., 2015; MOMO; GARRIDO; WERTHER, 2016). Os relatos acerca da patogenicidade destes trematódeos são controversos, variando de ausência de sinais clínicos e alterações macro ou microscópicas (GOMES et al., 2005), até graves alterações no sistema renal das aves infectadas (MENEZES et al., 2001; PINTO; MENEZES; TORTELLY, 2004; LUPPI et al., 2007; ABDO; SULTAN, 2013).

Apesar dos crescentes avanços da medicina veterinária, é senso comum entre pesquisadores da área, que as informações existentes a respeito da distribuição e incidência de enfermidades em populações selvagens ainda são insuficientes (CATÃO-DIAS, 2003).

Tendo em vista que o estudo das doenças parasitárias é importante para o desenvolvimento e progresso da medicina aviária e da preservação das espécies, o objetivo deste estudo foi investigar os achados histopatológicos associados à infecção por *Paratanaisia* spp. em diferentes espécies de aves selvagens e identificar as espécies dos trematódeos presentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Afecções parasitárias em aves selvagens

Historicamente, têm-se dado importância às enfermidades em animais selvagens, somente quando estas se tornam ameaças à saúde humana ou à atividade agropecuária. Entretanto, o surgimento de enfermidades em espécies ameaçadas e o interesse conservacionista desencadearam maior interesse no estudo destas enfermidades (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). Nas últimas décadas, diversos estudos têm sido realizados acerca das parasitoses em animais selvagens, entretanto, considerando-se a magnitude da vida selvagem, ainda sabe-se pouco sobre a diversidade dos parasitos e a susceptibilidade dos hospedeiros em vida livre (WATSON, 2013).

As enfermidades parasitárias são frequentemente observadas em aves, sendo as endoparasitoses as mais frequentes (GREINER; RITCHIE, 1994). Os efeitos destas infecções podem ser muito variáveis. Nas aves o elevado número de parasitos pode afetar o aproveitamento do alimento, interferir no comportamento, favorecer infecções secundárias e afetar o sucesso reprodutivo. Todos esses fatores exercem forte impacto na regulação das populações, levando a alteração e perda de biodiversidade (WATSON, 2013).

No cativeiro, as parasitoses ocorrem com maior frequência e causam quadros mais graves do que aqueles apresentados por aves em vida livre. Este cenário é influenciado por vários fatores, tais como alimentação inadequada, falta de higiene, estresse, elevada densidade populacional, presença de hospedeiros intermediários e contactantes externos, que podem contribuir na manutenção do ciclo de diversos parasitos (SNAK et al., 2014). Em um centro de triagem de animais silvestres na cidade de Aracruz (ES), as parasitoses foram descritas como o achado mais frequente, sendo que dentre 40 psitacídeos necropsiados 57% encontravam-se infectados por algum tipo de parasita (SOUZA et al., 2006). Visto que as enfermidades parasitárias estão intimamente relacionadas aos hábitos alimentares e comportamentais dos indivíduos, a veiculação hídrica, alimentar e o solo constituem importantes vias de disseminação de parasitos (SLIFKO; SMITH; ROSE, 2000). Uma

vez que as rotas de infecção estão diretamente relacionadas ao agente causal, o conhecimento sobre os meios de transmissão da enfermidade pode auxiliar no entendimento de como estes agentes afetam novos hospedeiros susceptíveis (MARVULO; CARVALHO, 2014).

Alguns parasitos podem infectar diversos tecidos e sistemas de uma grande variedade de espécies de aves, enquanto outros possuem especificidade para determinados tecidos, órgãos e/ou hospedeiros (GREINER; RITCHIE, 1994). O acometimento de sistemas com limitada habilidade regenerativa, tal como o trato urinário, pode ser uma causa significativa de mortalidade (UNWIN et al, 2013). A patogenia de muitos parasitos de aves ainda é pouco compreendida (GREINER; RITCHIE, 1994), o que demonstra a importância de estudos mais aprofundados na área, envolvendo animais em cativeiro e em vida livre.

2.2 Anatomia e histologia do sistema urinário em aves

O sistema urinário das aves é constituído por um par de rins e de ureteres, que se encarregam de produzir e transportar a urina até o urodeo, localizado no interior da cloaca (BACHA; BACHA, 2000; GOLDSTEIN; SKADHAUGE, 2000). Os rins ficam dispostos em depressões na superfície ventral do sinsacro e na fossa renal de cada ílio, estendendo-se da margem caudal dos pulmões até o final do sinsacro (Figura 1). São órgãos alongados (BACHA; BACHA, 2000), trilobados e sua coloração varia de acordo com a quantidade de sangue que contém (McLELLAND, 1990). Em passeriformes a divisão entre os lobos não é evidente (McLELLAND, 1990).

Cada lobo renal é dividido em porções menores denominadas lóbulos, os quais possuem uma região cortical e uma região medular (BACHA; BACHA, 2000). Na região cortical localizam-se néfrons e capilares peritubulares e na região medular, alguns néfrons e ductos coletores. Os componentes da medular renal encontram-se envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo formando uma estrutura denominada de cone medular (GOLDSTEIN; SKADHAUGE, 2000) (Figura 2).

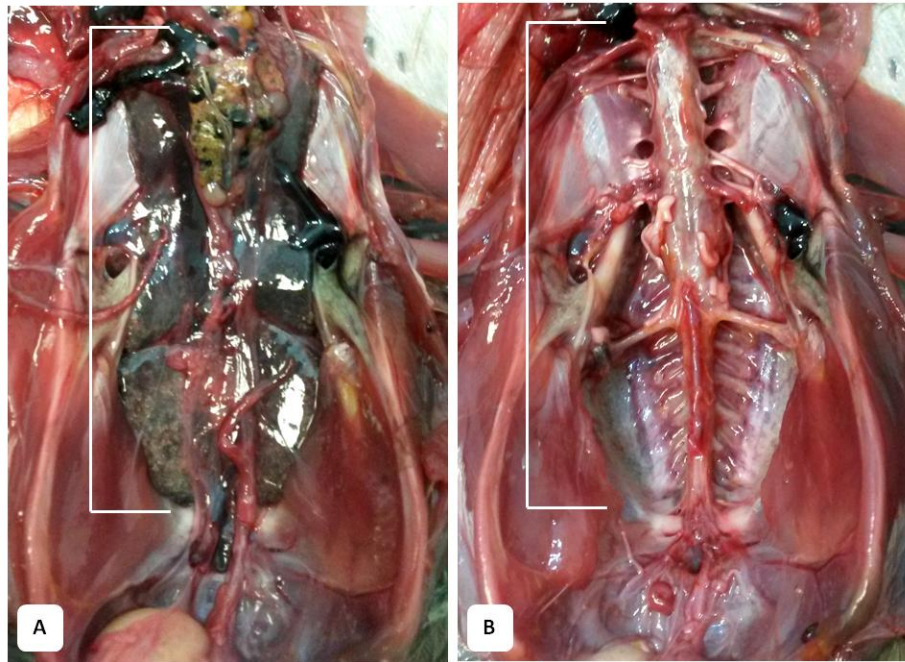


Figura 1. Foto de necropsia em perdiz (*Rhynchotus rufescens*) evidenciando a localização do sistema renal. A: Rins encaixados nas depressões ventrais do sinsacro e na fossa renal de cada ílio (colchetes). B: Fossas vazias, depois da retirada dos rins (colchetes). Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

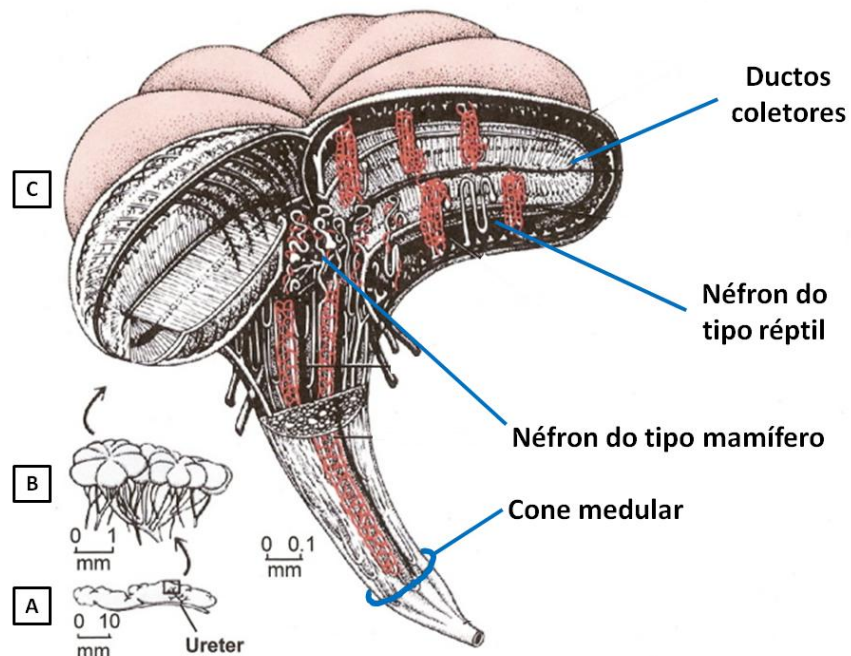


Figura 2. Esquema demonstrando a estrutura renal de uma ave. A- Rim trilobado. B- Conjunto de lóbulos de um lobo. C- Lóbulo renal demonstrando a localização de ductos coletores, néfrons tipo réptil, néfrons tipo mamífero e cone medular (Adaptado de SHERWOOD; KLANDORF; YANCEY, 2005).

A unidade funcional do rim é o néfron, o qual é constituído de um corpúsculo renal (glomérulo) e um sistema de túbulos (ROOS; PAWLINA, 2008), composto pelo túbulo contorcido proximal, a alça de Henle e o túbulo contorcido distal (NEWMAN; CONFER; PANCIERA, 2009) (Figura 3). As aves possuem dois tipos de néfrons. Os néfrons do tipo réptil, localizados na superfície do lóbulo, os quais possuem glomérulos mais simples e alça de Henle ausente, sendo menores do que os néfrons do tipo mamífero, os quais se localizam mais profundamente no lóbulo, possuem glomérulos maiores e mais complexos e alça de Henle (GOLDSTEIN; SKADHAUGE, 2000). Apenas uma pequena porção dos néfrons é do tipo mamífero (10-30%). Existem ainda os néfrons intermediários, que são uma transição entre os dois tipos, com características de ambos (BOYKIN; BRAUN, 1993).

O glomérulo é revestido por uma cápsula formada por dois folhetos: o folheto visceral, composto por podócitos que revestem os capilares glomerulares e o folheto parietal, composto por epitélio simples escamoso (BACHA; BACHA, 2000), formando assim o espaço urinário, ou espaço de Bowman, por onde o ultrafiltrado passa antes de ser conduzido para o túbulo contorcido proximal (ROOS; PAWLINA, 2008).

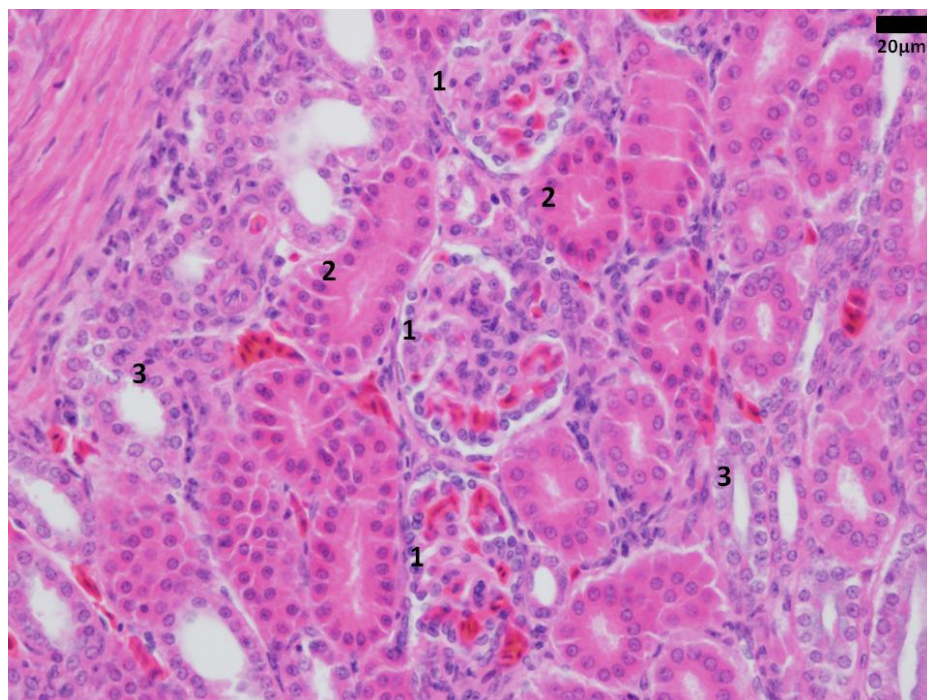


Figura 3. Fotomicrografia do rim de pombo doméstico (*Columba livia*), evidenciando os corpúsculos renais (1), túbulos contorcidos proximais (2) e túbulos contorcidos distais (3). Hematoxilina e eosina, escala 20µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Os túbulos contorcidos proximais são maiores do que os túbulos contorcidos distais em diâmetro e comprimento e suas células, de formato cuboide, possuem vilosidades apicais que aumentam a superfície de contato (BACHA; BACHA, 2000). Os túbulos contorcidos distais possuem células sem vilosidades, também de formato cuboide (BACHA; BACHA, 2000). Na periferia do lóbulo a união de diversos túbulos distais de néfrons do tipo réptil dá origem aos segmentos primários dos ductos coletores perilobulares. Segmentos primários fundem-se formando os segmentos secundários, os quais recebem túbulos distais de néfrons de transição. Segmentos secundários fundem-se formando os segmentos terciários, os quais recebem túbulos distais de néfrons do tipo mamífero (BOYKIN; BRAUN, 1993).

Os ductos coletores possuem células de formato cuboide com limites evidentes, as quais se tornam colunares à medida que os ductos tornam-se maiores, próximo à região final do cone medular (ROOS; PAWLINA, 2008). Vários ductos coletores dispostos paralelamente são mantidos juntos por uma cápsula de tecido conectivo, sendo este conjunto denominado de cone medular (BACHA; BACHA, 2000). Os segmentos continuam fusionando-se até que somente um ducto coletor é formado no término do cone medular (BOYKIN; BRAUN, 1993).

Os ductos coletores despejam seu conteúdo nos ureteres, que iniciam no lobo cranial e estendem-se caudalmente na borda ventromedial dos lobos medial e caudal, terminando na cloaca (McLELLAND, 1990). Os ureteres possuem epitélio de transição. Sua parede é composta por duas camadas de músculo liso (longitudinal interna e circular externa) (ROOS; PAWLINA, 2008). Os ureteres terminam na cloaca em um orifício denominado urodeo (McLELLAND, 1990).

2.3 *Paratanaisia* spp.

2.3.1 Taxonomia e morfologia

Helminhos do gênero *Paratanaisia* spp. são trematódeos digenéticos da família Eucotylidae, subfamília Tanaisiinae, (BRANDOLINI; AMATO, 2007), parasitos do sistema urinário de aves (LUPPI et al., 2007). O gênero *Paratanaisia* é composto por três espécies: *Paratanaisia bragai*, *Paratanaisia confusa* e *Paratanaisia robusta*,

as quais apresentam características morfológicas muito similares (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969). Os trematódeos deste gênero possuem corpo alongado e achatado, recoberto por cutícula. Cutícula escamosa é observada em *P. bragai* (BRANDOLINI; AMATO, 2007) e em *P. robusta* e cutícula espinhosa é observada em *P. confusa* (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969) (Figura 4). Escamas e espinhos representam características morfológicas importantes para a identificação das espécies deste gênero (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969).

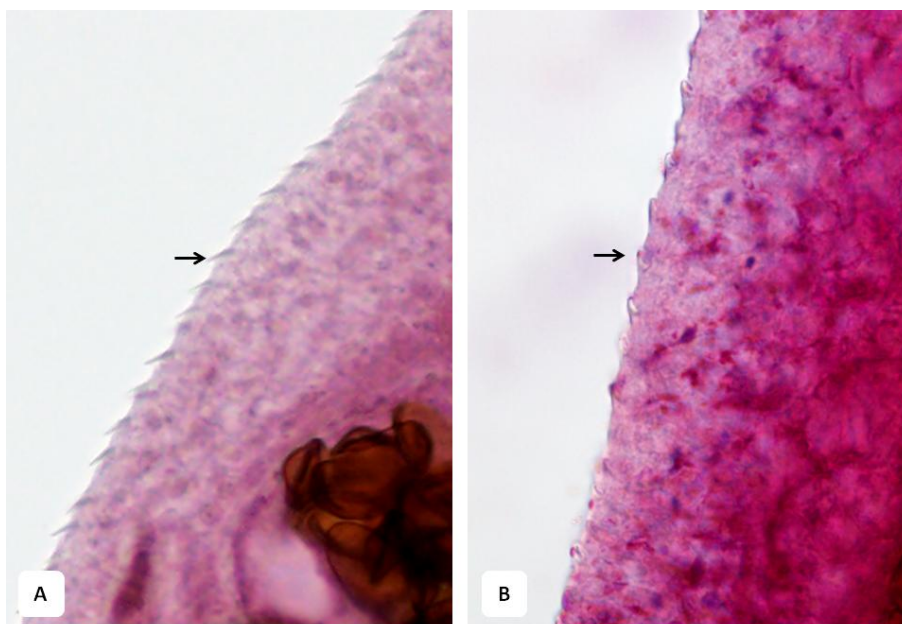


Figura 4. Fotomicrografia do detalhe da cutícula de trematódeos do gênero *Paratanaisia*. A- Cutícula espinhosa (seta). B- Cutícula escamosa (seta). Coloração Carmim clorídrico. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Os trematódeos deste gênero apresentam acetábulo e ventosa oral situados na porção anterior do corpo. Cecos levemente sinuosos e fusionados em sua porção posterior. Poro genital de localização pós-bifurcal, pré-ovariana e mediana. Bolsa do cirro de localização submediana e próxima ao ovário. Dois testículos de formato variável com bordos geralmente lobados e de localização pré-equatorial, pós-ovariana e em grande parte intercecais, sendo levemente oblíquos entre si no caso de *P. bragai*, enquanto em *P. confusa* e *P. robusta* se situam na mesma zona. Um ovário de formato irregular, geralmente lobado, de localização pré-testicular e deslocado lateralmente. Vitelinos quase totalmente extracecais estendendo-se da zona bifurcal do ceco até próximo à extremidade posterior do corpo. Útero de

localização em grande parte intercecal. Vesícula excretora de formato baciliforme. Poro excretor de localização terminal. Espermoteca e glândula de Mehlis presentes.

2.3.2 Biologia

Os trematódeos do gênero *Paratanaisia* foram primeiramente descritos por Santos em 1934, em pombos e posteriormente classificados como *Paratanaisia bragai* por Freitas (1959). Desde então, o parasitismo por trematódeos deste gênero têm sido descrito em diversas espécies de aves, incluindo Columbiformes (TARODA et al., 2013; UNWIN et al., 2013; XAVIER et al., 2015), Galliformes (MENEZES et al., 2001; GOMES et al., 2005), Passeriformes (UNWIN et al., 2013; TAVELA et al., 2014), Psittaciformes (LUPPI et al., 2007), Tinamiformes (MAPELI et al., 2003; MOMO; WERTHER, 2013; MOMO; GARRIDO; WERTHER, 2016) e Ciconiiformes (ABDO; SULTAN, 2013).

Estes trematódeos possuem ciclo heteróximo (Figura 5), tendo como hospedeiros intermediários moluscos gastrópodes (LUPPI et al., 2007). No território brasileiro, os moluscos das espécies *Leptinaria unilamellata* (KELLER; ARAÚJO, 1992) e *Subulina octona* (BRANDOLINI; AMATO, 2006), da família Subulinidae, foram descritos como os hospedeiros intermediários de *P. bragai*. Os moluscos são infectados ao ingerirem excretas de aves contendo ovos viáveis do parasito (KELLER; ARAÚJO, 1992).

Os ovos do trematódeo caracterizam-se por apresentar uma casca fina de coloração marrom, assim como um opérculo na extremidade anterior e uma pequena protuberância na posterior, medindo aproximadamente 30µm de comprimento e 15µm de largura (MALDONADO, 1945). No momento da oviposição um miracídio totalmente desenvolvido e infectante ocupa praticamente todo o interior do ovo.

A ave infectada libera nos seus excrementos os ovos do parasita contendo miracídios. Após a ingestão dos ovos pelo molusco, os miracídios são liberados no trato digestivo, migrando posteriormente para os tecidos onde continuam seu desenvolvimento. A partir do miracídio desenvolve-se o esporocisto primário, do qual se origina o esporocisto secundário, em seguida as cercárias e por fim as

metacercárias. Estas últimas apresentam-se envolvidas por um cisto resistente e representam a forma infectante para a ave (MALDONADO, 1945; KELLER; ARAÚJO, 1992). Estudos realizados por Maldonado (1945) demonstraram que o miracídio presente no ovo não é capaz de se desenvolver no meio ambiente, necessitando obrigatoriamente do hospedeiro intermediário.

A ave adquire o parasito por meio da ingestão dos moluscos contendo metacercárias encistadas (MALDONADO, 1945; KELLER; ARAÚJO, 1992). No intestino da ave os cistos se rompem, liberando as metacercárias imaturas. Ao atingir a cloaca as metacercárias adentram o urodeo e ascendem pelos ureteres, chegando aos ductos coletores renais (KELLER; ARAÚJO, 1992; BRANDOLINI; AMATO, 2006). Aproximadamente 25 dias após a ingestão do molusco infectado é possível encontrar ovos do parasita nas excretas das aves (MALDONADO, 1945; LUPPI et al., 2007; TAVELA et al., 2014). Em condições de umidade e oxigenação adequados os ovos podem manter-se viáveis no ambiente, podendo permanecer infectantes por até um mês na água limpa da chuva (MALDONADO, 1945).

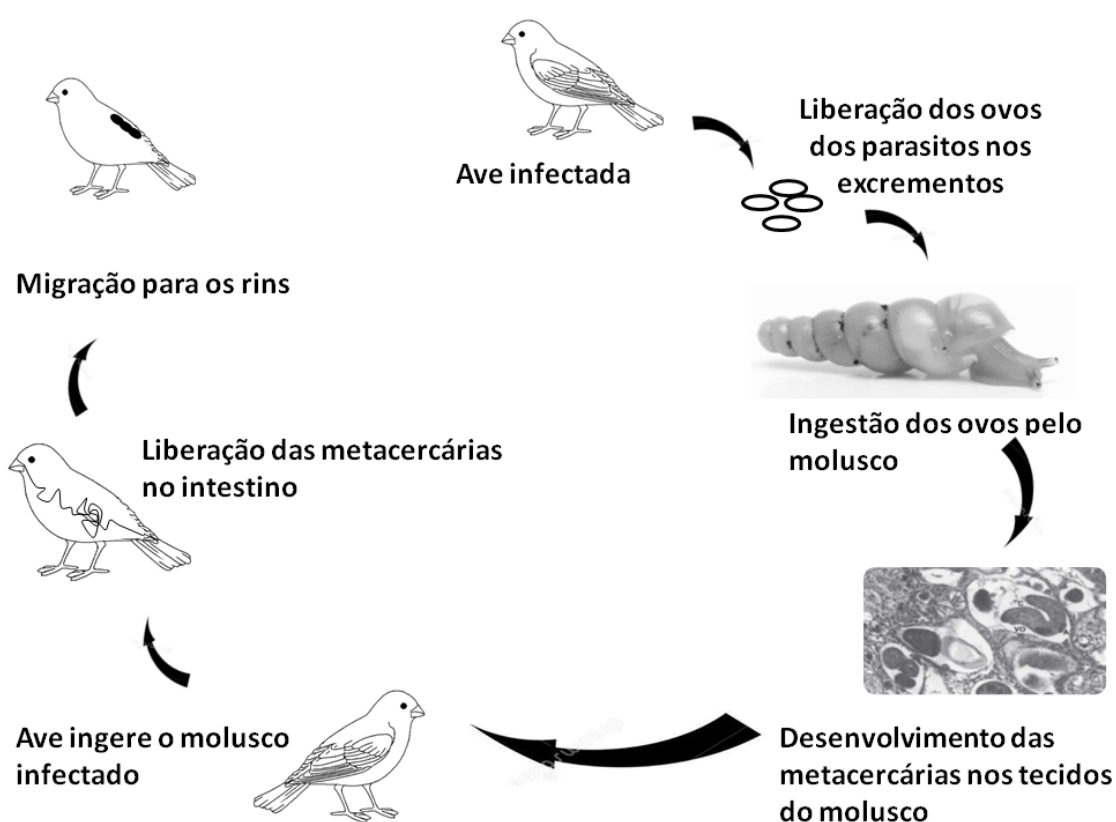


Figura 5. Esquematização do ciclo dos trematódeos do gênero *Paratanaisia*.

2.3.3 Patogenia

Os relatos acerca da patogenicidade destes trematódeos são controversos. Enquanto alguns autores descrevem sinais clínicos evidentes e lesões abundantes (MENEZES et al., 2001; PINTO; MENEZES; TORTELLY, 2004; LUPPI et al., 2007; ABDO; SULTAN, 2013) outros autores os consideram pouco patogênicos por não terem sido observadas alterações macro ou microscópicas de relevância no sistema renal das aves parasitadas (GOMES et al., 2005).

As alterações macroscópicas já descritas em aves infectadas compreendem aumento de volume e alteração na coloração dos rins (ABDO; SULTAN, 2013). Microscopicamente, alterações na morfologia dos ductos coletores renais e reações inflamatórias foram descritos (MENEZES et al., 2001; MAPELI et al., 2003; PINTO; MENEZES; TORTELLY, 2004). Infiltrado inflamatório circundando ovos livres no parênquima renal foi observado em garça-vaqueira (*Bulbucus ibis*) parasitada por *Paratanaisia* spp. (ABDO; SULTAN, 2013). Em pomba-socorro (*Zenaida graysoni*) e ave-do-paraíso (*Paradisaea rubra*), ambas parasitadas por *Paratanaisia* spp. foi observado infiltrado inflamatório e fibrose circundando os ductos coletores (UNWIN et al., 2013).

O diagnóstico da parasitose geralmente é realizado *post mortem*, por meio da observação macroscópica e microscópica de parasitos e/ou de seus ovos em rins e ureteres (MAPELI et al., 2003; LUPPI et al., 2007). O diagnóstico *in vivo* é influenciado principalmente pela intermitência na excreção dos ovos pelos parasitos (JOHANSEN et al., 2010), e pela dificuldade de obtenção de amostras isoladas de urina devido à eliminação conjunta com fezes (ECHOLS, 2006). Exames coproparasitológicos utilizando diversas técnicas podem ser empregados para observação dos ovos dos parasitos (BRANDOLINI; AMATO, 2007; XAVIER et al., 2015), porém, eles apresentam baixa sensibilidade, devido a mistura da urina com as fezes, podendo gerar resultados falso negativos (observação pessoal do autor).

A técnica da reação em cadeia pela polimerase (do inglês *polimerase chain reaction* - PCR) utilizando tecido renal fresco e/ou parafinado da ave infectada ou fragmentos dos moluscos infectados pode auxiliar no diagnóstico da parasitose (UNWIN et al., 2013), DNA de diversas espécies de trematódeos foi detectado m

tecido de caramujos infectados (ROUTTU et al., 2014), e os autores sugeriram a utilização desta técnica para avaliação de amostras fecais e de solo onde possam estar presentes ovos de parasitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

As aves vivas utilizadas eram inicialmente recebidas pelo Serviço de Medicina de Animais Selvagens (SEMAS) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), onde ficavam internadas. As aves de vida livre foram encaminhadas pela Polícia Militar Ambiental, e as aves de cativeiro, provenientes de zoológicos, criatórios ou proprietários particulares, foram encaminhadas por seus responsáveis ou proprietários. Durante a internação das aves, amostras de excrementos foram obtidas.

Em caso de óbito das aves internadas no SEMAS, estas eram encaminhadas ao Serviço de Patologia de Animais Selvagens (SEPAS) da mesma Instituição para exames necroscópicos. Também foram utilizadas aves mortas encaminhadas diretamente ao SEPAS nos anos de 2015 a 2016, pela Polícia Militar Ambiental quando de vida livre e pelos responsáveis ou proprietários quando de cativeiro.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA FCAV/Unesp nº 009414/15) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio nº 49343-1).

3.2 Material de arquivo

O material de arquivo foi composto por lâminas histológicas e blocos de parafina contendo tecido renal de aves selvagens parasitadas, necropsiadas pelo SEMAS entre os anos 1994 a 2014.

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Detecção de ovos de *Paratanaisia* spp. nos excrementos

Durante os anos de 2015 e 2016 foram obtidas amostras de excrementos das aves selvagens internadas. Para isso o fundo dos recintos individuais foi forrado com material plástico descartável (Figura 6). Os excrementos foram colhidos em sua totalidade (urina e fezes) e submetidos às técnicas de observação microscópica direta, flutuação em solução salina saturada e sedimentação simples, segundo protocolos previamente descritos (ZAJAC; CONBOY, 2012). Quando a quantidade de excrementos obtidos no dia não era suficiente para a realização das três técnicas, foi utilizado um pool de excrementos colhidos ao longo de dois a três dias, e armazenados em microtubo plástico sem conservantes sob refrigeração (4 a 8°C).



Figura 6. Recinto individual de periquito-do-encontro-amarelo (*Brotogeris chiriri*), evidenciando o fundo forrado com plástico descartável para colheita dos excrementos (seta). Fonte: Serviço de Medicina de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Para o exame direto uma pequena porção do excremento (aproximadamente 3mm³) foi homogeneizado em uma gota de água depositada em uma lâmina, coberto com lamínula e observado sob microscopia de luz utilizando-se objetiva de 10x.

No exame de flutuação foi utilizada uma amostra de excremento de 3 a 5g foi depositada em um cadinho juntamente com solução saturada de cloreto de sódio. Após maceração com pistilo, a mistura foi passada por um tamis e a solução resultante foi depositada em um recipiente até que se formasse um menisco, sobre o qual foi depositada uma lamínula. Após 8-10 minutos a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina de microscopia, para observação em microscópio de luz utilizando-se objetiva de 10x.

O exame de sedimentação foi realizado com aproximadamente 5g de fezes misturadas com 50mL de água em um tubo do tipo Falcon com uma gota de detergente. Após 20 minutos o sobrenadante foi descartado e mais água foi adicionada ao tubo até completar 50mL. Esse procedimento foi repetido de 3 a 5 vezes (até que a água estivesse límpida após o período de sedimentação de 20 minutos entre cada nova lavagem). O sobrenadante foi então descartado e 2 a 3 gotas do sedimento foram depositadas em uma lâmina, a qual foi coberta com lamínula e avaliada em microscopia de luz utilizando-se objetiva de 10x.

3.3.2 Avaliação histopatológica

As lâminas histológicas contendo tecido renal de aves selvagens parasitadas foram recuperadas a partir do material de arquivo do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp e de necropsias realizadas pelo SEPAS durante os anos de 2015 e 2016. Durante as necropsias, realizadas segundo Matushima (2007), fragmentos do tecido renal foram colhidos e conservados em formol tamponado 10%, numa relação líquido/material de 10:1, durante 24-48 horas. As amostras foram então embebidas em parafina, seccionadas em espessura de 4µm, coradas com hematoxilina e eosina e montadas em lâminas (JECKEL NETO, 2007).

Para a avaliação histopatológica as lâminas contendo tecido renal parasitado foram observadas em microscópio de luz e avaliadas quanto à presença de

alterações, tais como: congestão, hemorragias, infiltrados inflamatórios, necrose, edema, fibrose, degeneração celular e hiperplasia, em interstício, túbulos coletores e glomérulos. Em ductos coletores foram observadas características tais como: distensão, compressão do tecido adjacente, fibrose, infiltrados inflamatórios e necrose, bem como compressão, descamação, hipertrofia e hiperplasia de epitélio.

Imagens do exame histopatológico foram obtidas utilizando uma câmera Olympus DP73 acoplada a um microscópio de luz Olympus BX-43, utilizando-se o programa Image Pro Plus v. 4.0.

3.3.3 Identificação morfológica dos parasitos

Após a obtenção da amostra para processamento histológico, o restante do tecido renal a fresco foi depositado em placa de Petri contendo solução tampão fosfato-salino (do inglês “*phosphate buffered saline*” - PBS) pH 7,4 e avaliado sob microscópio estereoscópico para obtenção dos trematódeos (Figura 7). Os parasitos encontrados foram colhidos e armazenados em microtubos plásticos contendo solução de Railliet & Henry (92% de água destilada deionizada, 5% de formaldeído comercial e 3% de ácido acético glacial) para serem posteriormente processados de acordo com a metodologia proposta por Travassos (1950).

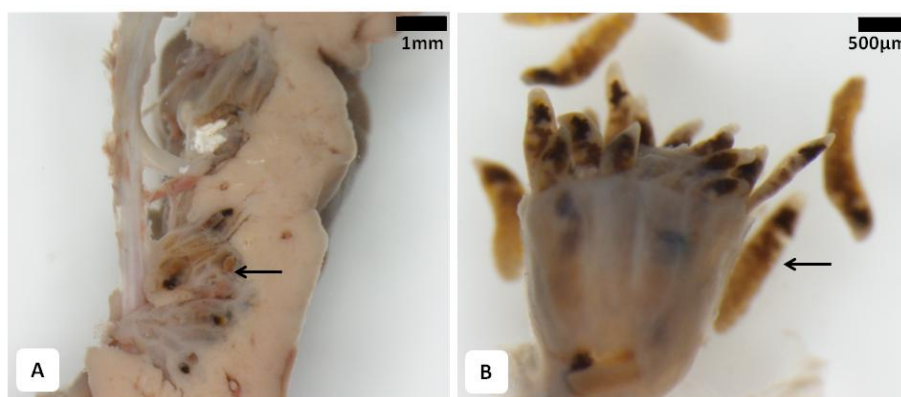


Figura 7. Imagem de tecido renal de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) observado em microscópio estereoscópico, demonstrando parasitos no interior de ductos coletores (setas). A- Escala 1mm. B- Escala 500µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Para processamento os espécimes foram depositados em placas de Petri contendo corante a base de Carmim clorídrico durante 20 minutos. Após isso se seguiram lavagens seriadas em álcool 70%, 90% e 95%. Os espécimes foram então imersos em solução Creosoto de Faia durante 20 minutos. Uma lâmina temporária foi confeccionada para cada um dos espécimes e estes foram avaliados em microscópio de luz para identificação morfológica segundo Travassos, Freitas e Kohn (1969). Os espécimes de cada ave foram processados separadamente. Imagens foram obtidas por meio de uma câmera Olympus DP73 acoplada a um microscópio de luz Olympus BX-43 e a um microscópio estereoscópico Olympus SZX7, utilizando-se o programa Image Pro Plus v. 4.0.

3.3.4 Análises moleculares

Extração do DNA dos parasitos

Alguns exemplares dos parasitos encontrados na observação a fresco dos rins das aves necropsiadas nos anos de 2015 e 2016 foram armazenados em microtubos plásticos e congelados a -20°C para posterior extração de DNA. A extração de DNA foi realizada a partir de um pool dos parasitos encontrados nos rins de cada ave utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN®) de acordo com o protocolo 1a do catálogo número 69504 (QIAGEN®, EUA).

Após extração o DNA teve sua concentração e qualidade aferidas em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific®), por meio da leitura da absorbância de cada amostra, sendo então armazenado a -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

Extração de DNA do tecido renal parafinizado

Para extração de DNA dos blocos de parafina foi utilizado o QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN®), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração o DNA teve sua concentração e qualidade aferidas em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific®), por meio da leitura da

absorbância de cada amostra, sendo então armazenado a -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

PCR convencional para o gene endógeno GAPDH

Para verificação da presença de inibidores nas 79 amostras de DNA extraídas a partir de amostras parafinizadas, foi realizada uma reação de PCR convencional para o gene endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003). As reações de amplificação foram realizadas utilizando uma reação de volume total final de 25µL contendo uma mistura composta de 5µL do DNA-amostra; 0,2mM de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA); 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador [GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3')] (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brazil); 3,0mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA); 1,25U de Taq Platinum DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA); tampão da PCR (10x concentrado) e água ultra-pura esterilizada (Promega) q.s.p., utilizando-se aparelho termociclador (T100 Thermal Cycler, BioRad). A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 37 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

PCR convencional para os genes 28S rDNA e 18S rDNA

O primeiro protocolo de PCR convencional foi modificado a partir do descrito por Unwin et al. (2013), objetivando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 310pb do gene 28S do DNA ribossomal (28S rDNA). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume final de 25µL, contendo uma mistura composta por 5µL do DNA-amostra; 0,2mM de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 3,0mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 1,25U de Taq Platinum

DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 0.25µL de 0.3µM de cada oligonucleotídeo iniciador (forward Para28S_F [5'-AAGCCTGTGTCCACTTGGTC-3'] e reverse Para28S_R [5'-CGTGCTGTTTACCCTCTCTTC-3']) (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil); tampão da PCR (10x concentrado) e água ultra-pura esterilizada (Promega) q.s.p., utilizando aparelho termociclador (T100 Thermal Cycler, BioRad). A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

O segundo protocolo de PCR convencional foi modificado a partir do descrito por Routtu et al. (2014), objetivando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 800pb do gene 18S rDNA. Neste protocolo foram utilizados os mesmos reagentes, nas mesmas concentrações descritas acima, exceto pelos oligonucleotídeos iniciadores [C for (5'-ATGGCTCATTAATCAGCTAT-3') e A rev (5'-TGCTTTGAGCACTCAAATTTG-3')] (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil). A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos, e extensão final a 72°C por 1 minuto.

Como controle negativo das reações de PCR convencional para ambos os genes, água ultra-pura esterilizada (Promega) foi adicionada às reações. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de uma das amostras de parasitos.

Eletróforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados por meio das reações de PCR convencional foram submetidos à eletróforese horizontal em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) em tampão de corrida TBE (Tris-borate-EDTA) pH 8,0 (44,58M Tris-base; 0,44M ácido bórico; 12,49mM EDTA). A eletróforese foi realizada a 90V/100mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visibilizados e analisados

utilizando-se um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (ChemiDoc Imaging System, BioRad®). Com o intuito de prevenir contaminações nas reações de PCR, a extração de DNA, preparação da reação, amplificação por PCR convencional e eletroforese em gel de agarose foram realizadas em salas separadas.

Purificação dos produtos amplificados na PCR convencional

Após a reação de amplificação por PCR convencional para os genes 28S rDNA e 18S rDNA, os produtos obtidos foram purificados utilizando-se o “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas®, São Paulo), de acordo com as recomendações do fabricante. Quantidade e qualidade do material genômico purificado foram aferidas em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos purificados foi realizado por meio de sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sequenciamento foram os mesmos da PCR convencional. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir do descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer/Applied Biosystems®). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), no Departamento de Tecnologia da FCAV/Unesp, Jaboticabal.

Análise das sequências

Inicialmente, foi realizada a análise dos eletroferogramas gerados no sequenciamento, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada

base sequenciada, utilizando o software Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Sequências consenso foram obtidas utilizando-se o programa *phred* (EWING et al., 1998). O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizada para obtenção de sequência homólogas, comparando-se as sequências obtidas no sequenciamento com aquelas depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). O programa MAFFT (KAZUTAKA et al., 2002) foi utilizado para alinhar as sequências obtidas com aquelas previamente depositadas no GenBank, a fim de se detectar polimorfismos.

Inferências filogenéticas pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foram conduzidas para os genes 28S rDNA e 18S rDNA. As inferências pelo método da Máxima Verossimilhança foram conduzidas com a ferramenta W-IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016), que inclui valores estimados de suporte de nó, por meio do servidor IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015), utilizando o modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gama e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), obtido por meio do servidor IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015). A Inferência Bayesiana foi realizada com o programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) por meio do CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), utilizando o modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gama e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), obtido por meio do servidor IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015). As árvores filogenéticas foram editadas com o programa Treegraph 2.0.56-381 beta (STÖVER; MÜLLER, 2010).

O material e métodos utilizado no presente estudo encontra-se esquematizado na Figura 8.

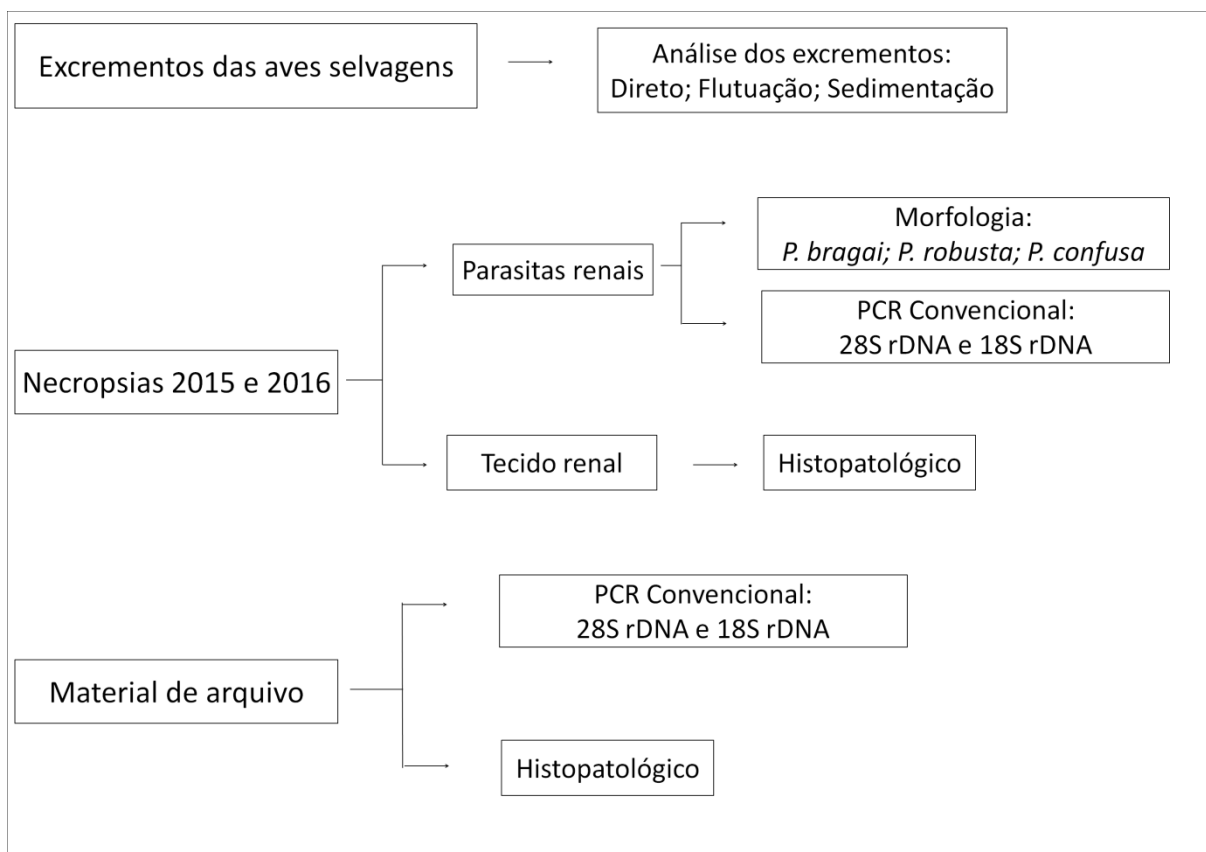


Figura 8. Fluxograma representando o material e métodos utilizado no presente estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de ovos de *Paratanaisia* spp. nos excrementos das aves vivas

No estudo prospectivo realizado durante os anos de 2015 e 2016, aproveitando a casuística do SEMAS foram obtidas amostras de excrementos de 22 aves selecionadas ao acaso, sendo 14 provenientes de cativeiro e oito de vida livre, cujas espécies estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de aves selvagens, provenientes de cativeiro e de vida livre, das quais foram obtidas amostras de excremento para a realização de técnicas coproparasitológicas visando a detecção de ovos de *Paratanaisia* spp.

Nome comum	Nome científico	Vida Livre	Cativeiro	Total
Bem-te-vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	-	1
Coruja suindara	<i>Tyto alba</i>	1	-	1
Pombo doméstico	<i>Columba livia</i>	2	-	2
Rolinha-roxa	<i>Columbina talpacoti</i>	1	-	1
Arara Canindé	<i>Ara ararauna</i>	-	3	3
Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	2	2
Maritaca	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	5	-	5
Ring-neck	<i>Psittacula krameri</i>	-	2	2
Carcará	<i>Caracara plancus</i>	1	-	1
Gavião-pernilongo	<i>Geranospiza caerulescens</i>	1	-	1
Tucano toco	<i>Rhamphastos toco</i>	2	1	3
TOTAL		14	8	22

Todas as amostras de excrementos obtidas foram avaliadas pelos métodos de observação direta, flutuação em solução salina saturada e sedimentação simples. Independentemente das técnicas utilizadas, em nenhuma foram observados ovos de trematódeos renais. Dentre as 22 aves avaliadas duas (ambas *Columba livia*) vieram a óbito dias após a avaliação e foram necropsiadas. Durante a necropsia foram observados diversos trematódeos parasitando os rins. As demais aves obtiveram alta clínica, retornando ao seu local de origem.

4.2 Necropsias realizadas em 2015 e 2016

No período considerado foram realizadas 111 necropsias de aves selvagens.

Em todas as necropsias o tecido renal foi observado sob microscópio estereoscópico para avaliação da presença e colheita de parasitos. Dentre todas as aves necropsiadas 15 (13,5%) estavam parasitadas, sendo 14 aves provenientes de vida livre e uma de cativeiro (Tabela 2).

Tabela 2. Ordens e espécies de aves necropsiadas pelo Serviço de Patologia Animais Selvagens (SEPAS) da FCAV/Unesp entre os anos de 2015 e 2016, nas quais foi identificada infecção por trematódeos renais.

Ordem	Nome comum	Nome científico	VL	Cat	N
Strigiformes	Coruja buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	1	0	1
	Corujinha-do-mato	<i>Megascops choliba</i>	1	-	1
Galliformes	Galinha d'Angola	<i>Numida meleagris</i>	-	1	1
Columbiformes	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	3	-	3
	Pombo doméstico	<i>Columba livia</i>	6	0	6
Cariamiformes	Seriema	<i>Cariama cristata</i>	1	-	1
Passeriformes	Sanhaço	<i>Thraupis sayaca</i>	1	-	1
Cuculiformes	Anu-branco	<i>Guira guira</i>	1	-	1
TOTAL			14	1	15

VL-Vida livre, Cat-Cativeiro, N-número de indivíduos amostrados.

Das aves parasitadas foram obtidas 15 amostras renais para avaliação macroscópica e histopatológica, 15 amostras de parasitos para avaliação molecular e 10 amostras de parasitos para identificação morfológica.

4.3 Material de arquivo: blocos de parafina e lâminas histológicas

Todas as lâminas histológicas contendo tecido renal das aves necropsiadas pelo SEPAS entre os anos de 1994 e 2014 foram avaliadas em microscópio de luz para verificação da presença de parasitos.

Foram obtidas 88 lâminas histológicas (cada lâmina correspondente a uma ave diferente), as quais foram avaliadas no exame histopatológico. Também foram obtidos 79 blocos de parafina contendo tecido renal de aves parasitadas, os quais

eram correspondentes às lâminas histológicas e foram utilizados nas avaliações moleculares. As espécies de aves das quais este material foi obtido estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Ordens e espécies de aves necropsiadas pelo Serviço de Patologia Animais Selvagens (SEPAS) da FCAV/Unesp entre os anos de 1994 a 2014 nas quais foram identificados histologicamente trematódeos renais.

Ordem	Nome comum	Nome científico	VL	Ca	N
Psittaciformes	Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	-	1	1
	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	-	2	2
	Maritaca	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	-	5	5
	Jandaia coquinho	<i>Eupsittula aurea</i>	-	1	1
	Periquito-do-encontro	<i>Brotogeris chiriri</i>	-	1	1
	Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	1	1
	Jandaia híbrida	<i>Psittacara</i> spp.	-	1	1
	Coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	4	3	7
Strigiformes	Coruja-suindara	<i>Tyto alba</i>	1	-	1
Galliformes	Pavão	<i>Pavo cristatus</i>	-	1	1
Tinamiformes	Perdiz	<i>Rhynchotus rufescens</i>	-	6	6
Columbiformes	Pomba-asa-branca	<i>Patagioenas picazuro</i>	-	1	1
	Rolinha-roxa	<i>Columbina talpacoti</i>	2	-	2
	Rolinha-fogo-apagou	<i>Columbina squammata</i>	1	-	1
	Pombo-doméstico	<i>Columba livia</i>	50	1	51
Cariamiformes	Seriema	<i>Cariama cristata</i>	1	-	1
Musophagiformes	Turaco*	-	-	1	1
Piciformes	Tucano-toco	<i>Rhamphastos toco</i>	-	3	3
	Pica-pau-do-campo	<i>Colaptes campestris</i>	-	1	1
TOTAL			59	29	88

VL-Vida livre, Ca-Cativeiro, N-número de indivíduos amostrados, * informação sobre a espécie não constava nos arquivos.

4.4 Avaliação necroscópica e histopatológica

No total, 103 lâminas histológicas contendo fragmentos do tecido renal de aves parasitadas foram avaliadas em microscópio de luz, totalizando 24 espécies distribuídas em dez ordens (Tabelas 2 e 3). Dentre as aves avaliadas, 73 (71%) foram provenientes de vida livre e 30 (29%) de cativeiro.

Quanto às alterações macroscópicas renais observadas nas necropsias, nas 15 aves parasitadas analisadas entre 2015 e 2016, não foram observadas quaisquer alterações. Dos 88 casos provenientes do material de arquivo, somente 31 (35%) possuíam descrição do sistema renal nas fichas de necropsia. Destas referências, 15 relatavam ausência de alterações macroscópicas renais, oito relatavam alterações em coloração dos rins, cinco relatavam alterações no tamanho dos rins (nefromegalia), duas relatavam hemorragia e em uma relatava material com aspecto de pó de giz recobrimdo os rins.

Dentre todas as aves avaliadas, a ordem Columbiformes foi a que apresentou o maior número de indivíduos parasitados (n= 64), seguida pelas ordens Psittaciformes (n= 12), Strigiformes (n= 10), Tinamiformes (n= 6), Piciformes (n= 4), Galliformes (n= 2), Cariamiformes (n= 2), Musophagiformes (n= 1), Cuculiformes (n= 1) e Passeriformes (n= 1).

As alterações histopatológicas mais proeminentes foram observadas nos ductos coletores e foram compostas por alterações em diâmetro dos ductos e por alterações epiteliais (Figuras 9 e 10). Também foram observadas alterações em interstício, glomérulos e restante do parênquima renal. As alterações histopatológicas observadas no tecido renal das aves parasitadas estão detalhadas no Apêndice A.



Figura 9. Fotomicrografia do tecido renal de pombo doméstico (*Columba livia*) evidenciando parasitos no interior de ductos coletores (setas), causando dilatação dos ductos parasitados e compressão do tecido adjacente. Hematoxilina e eosina, escala 100µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.



Figura 10. Fotomicrografia do tecido renal de pombo doméstico (*Columba livia*) evidenciando compressão (cabeça de seta) e destruição (seta) das células epiteliais do ducto coletor. Hematoxilina e eosina, escala 50µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Em 21/103 lâminas (20%) foi possível observar o ureter no corte histológico, entretanto, somente 7/21 (33%) apresentaram estruturas parasitárias em seu interior (Figura 11).

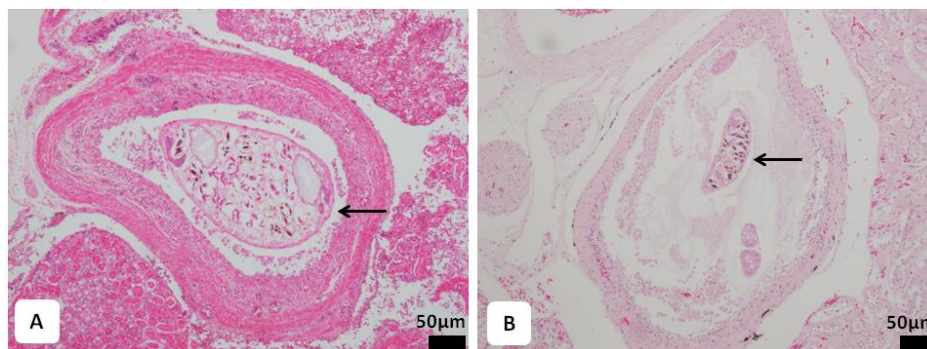


Figura 11. Fotomicrografias do tecido renal de ave evidenciando parasitos no interior de ureter (setas). A- Perdiz (*Rhynchotus rufescens*), hematoxilina e eosina, escala 50µm. B- Jandaia coquinho (*Eupsittula aurea*). Hematoxilina e eosina, escala 50µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

O maior número de estruturas parasitárias por corte de tecido renal foi observado em Strigiformes, com uma média de 18 estruturas parasitárias, seguidos pelos Columbiformes com uma média de 17 estruturas parasitárias.

O pequeno número de amostras renais de espécies das ordens Galliformes, Cariamiformes, Musophagiformes, Cuculiformes e Passeriformes impossibilitou uma avaliação mais detalhada com relação à infecção nestes grupos.

4.5 Identificação morfológica dos parasitos

A identificação morfológica foi realizada com parasitos colhidos dos rins de dez aves necropsiadas entre 2015 e 2016, sendo seis pombos domésticos (*Columba livia*), um anu-branco (*Guira guira*), uma pomba-de-bando (*Zenaida auriculata*), uma galinha d'Angola (*Numida meleagris*) e uma coruja buraqueira (*Athene cunicularia*). Pelo menos seis parasitos de cada ave foram morfolologicamente identificados.

Todos os parasitos observados apresentaram-se como estruturas alongadas e achatadas com ausência de cavidade corporal. Foi observada ventosa oral bem desenvolvida seguida de faringe muscular na extremidade anterior. Cecos

fusionados na porção distal, localizada na extremidade posterior do corpo do parasito. Testículos lobados, situados na região pré-equatorial e pós-ovariana, em sua maior parte intracecais. Ovário pré-testicular com formato irregular, deslocado lateralmente. Vitelaria estendia-se desde a zona bifurcal do ceco até a região caudal do corpo. Útero bem desenvolvido preenchido por ovos elipsoides de coloração marrom ocupava a maior parte do corpo (Figura 12).



Figura 12. Fotomicrografia de *Paratanaisia* spp., demonstrando posicionamento de ventosa oral (1), vitelaria (2), útero preenchido por ovos (3), ovário (4) e testículos (5). Coloração Carmim clorídrico, escala 200µm. Fonte: Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp.

Devido às características morfológicas descritas, todos os parasitos avaliados foram morfológicamente identificados como integrantes do gênero *Paratanaisia*. Os espécimes provenientes das aves 1 (*Guira guira*), 2 (*Numida meleagris*), 3 (*Columba livia*) e 4 (*Zenaida auriculata*), apresentaram estruturas espinhosas recobrimdo o

tegumento, sendo morfologicamente identificados como *Paratanaisia confusa* (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969). Os espécimes de parasitos provenientes das aves 5, 6 e 7 (todas *Columba livia*) apresentaram o tegumento recoberto por escamas, não sendo possível afirmar se se tratava de *P. bragai* ou *P. robusta* (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969; BRANDOLINI; AMATO, 2007), sendo portanto identificados como *Paratanaisia* sp. Dentre os espécimes obtidos dos rins das aves 8, 9 (ambas *Columba livia*) e 10 (*Athene cunicularia*) foram observados dois tipos morfológicos diferentes, um recoberto por espinhos e outro recoberto por escamas, sugerindo a ocorrência de coinfeção.

4.6 Análises moleculares

4.6.1 Detecção dos genes GAPDH, 28S rDNA e 18S rDNA

Dos 79 blocos de parafina do material de arquivo submetidas à PCR convencional para o gene endógeno (GAPDH), 73 amostras foram positivas, sendo posteriormente submetidas às PCR convencionais para os genes 28S rDNA e 18S rDNA. As seis amostras negativas foram desconsideradas para as análises subsequentes.

Das 73 amostras de tecido renal parafinizado submetidas à PCR convencional para o gene 28S rDNA, 52 amostras apresentaram positividade. Das 15 amostras de pool de parasitos submetidas à PCR convencional para o gene 28S rDNA, 14 apresentaram positividade. Após o sequenciamento dos fragmentos amplificados obtiveram-se 31 sequências provenientes de tecido renal parafinizado e 14 sequências provenientes de pool de parasitos, totalizando 45 sequências de aproximadamente 310pb.

As análises das sequências por meio do programa BLAST foram realizadas utilizando-se parâmetros pré-estabelecidos. Todas as sequências obtidas por meio do BLAST demonstraram cobertura de 100%. As sequências do gene 28S rDNA obtidas neste estudo demonstraram uma porcentagem de identidade variando de 98% a 100% com *Paratanaisia bragai* (GenBank JX231098) e de 97% a 99% com

Paratanaisia bragai (GenBank JX231099). Inferências filogenéticas não foram robustas utilizando-se este pequeno fragmento.

Das 73 amostras de tecido renal parafinizado submetidas à PCR convencional para o gene 18S rDNA, nenhuma apresentou positividade, enquanto que dentre as 15 amostras de pool de parasitos, 14 apresentaram-se positivas. Após o sequenciamento destes fragmentos obtiveram-se 14 sequências de aproximadamente 800pb.

Na análise das sequências por meio do programa BLAST, as sequências do gene 28S rDNA obtidas neste estudo demonstraram uma porcentagem de identidade variando de 98% a 99% com *Paratanaisia bragai* (GenBank JX231100).

Os resultados das PCR convencionais para o gene endógeno GAPDH, 18S rDNA e 28S rDNA bem como o número de sequências obtidas para cada um dos genes encontram-se sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados das PCR convencionais dirigidas aos genes GAPDH, 18S rDNA e 28S rDNA e número de sequências obtidas para cada um dos genes em amostras de tecido renal parafinizado de aves parasitadas e pool de parasitos renais.

Origem das amostras	Número de amostras testadas	GAPDH positivo	18S rDNA positivo	28S rDNA positivo
Tecido renal parafinizado	79	73	0	52
Pool de parasitos	15	-	14	14
Nº de sequências / nº de pares de bases			14/800	45/310

Nas análises filogenéticas realizadas para o gene 18S rDNA, 13 sequências posicionaram-se no mesmo clado de *P. bragai*, enquanto uma sequência se posicionou em um clado diferente, ainda assim filogeneticamente relacionado à *P. bragai*. O posicionamento das sequências nas árvores filogenéticas foram suportados por valores de “bootstrap” na Máxima Verossimilhança (Figura 13) e de Probabilidade Posterior na Análise Bayesiana (Figura 14). Valores de suporte de clado menores do que 50% foram omitidos em ambas as árvores. *Clestopothrium*

spp. e *Bothriocephalus* sp., da classe Cestoda e filo Platyhelminthes foram utilizados como grupo externo em ambas as análises.

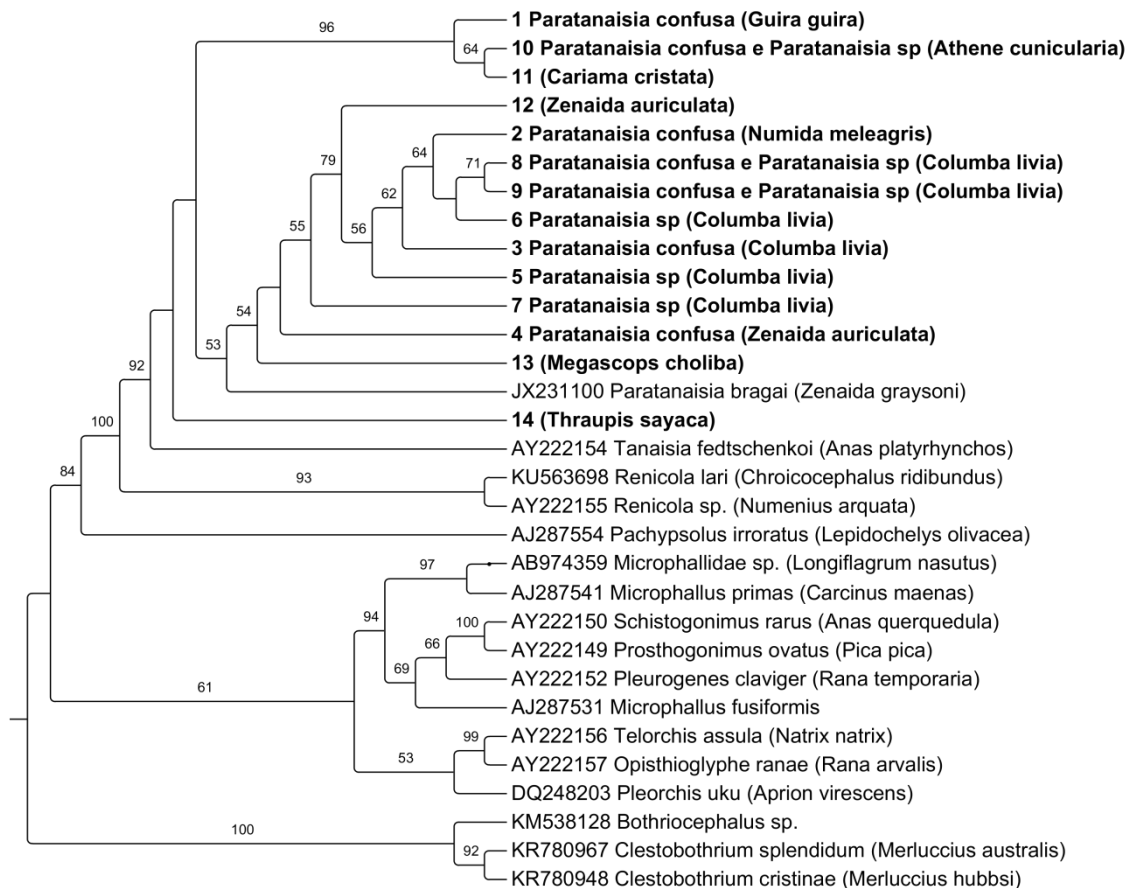


Figura 13. Análise filogenética utilizando-se o método da Máxima Verossimilhança, com modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gamma e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), para um fragmento de aproximadamente 800pb do gene 18S rDNA. As sequências deste estudo estão em negrito. O posicionamento das sequências foi suportado por valores “bootstrap” (1000 réplicas). Valores de “bootstrap” acima de 50% são mostrados para cada clado. *Bothriocephalus* sp. e *Clestobothrium* spp. foram utilizados como grupo externo.

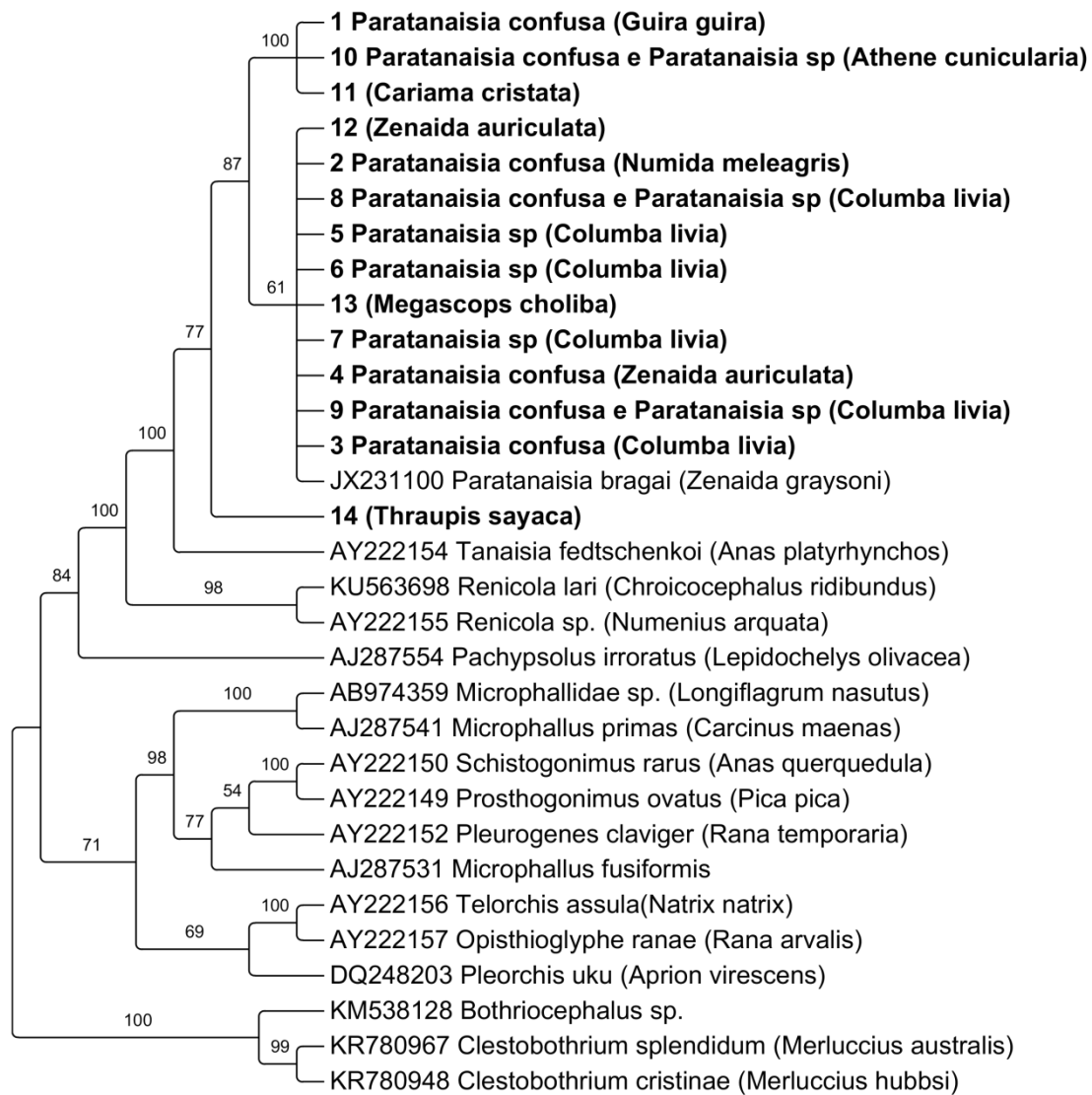


Figura 14. Análise filogenética utilizando-se Inferência Bayesiana, com modelo evolutivo tempo reversível generalizado com variação gamma e proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I), para um fragmento de aproximadamente 800pb do gene 18S rDNA. As sequências deste estudo estão em negrito. O posicionamento das sequências foi suportado por valores de probabilidade posterior (PP) (10^7). Valores de probabilidade posterior acima de 50% são mostrados para cada clado. *Bothriocephalus* sp. e *Clestobothrium* spp. foram utilizados como grupo externo.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo não foram detectados ovos de *Paratanaisia* nos excrementos das aves avaliadas. Fatores como a eliminação conjunta de fezes e urina pelas aves (ECHOLS, 2006) e eliminação intermitente dos ovos pelo parasita (JOHANSEN et al., 2010) podem ter prejudicado a detecção dos ovos do trematódeo. A influência destes dois fatores poderia explicar porque duas das aves parasitadas não apresentaram positividade em nenhum dos métodos coproparasitológicos empregados. Vinte das aves avaliadas receberam alta clínica, não sendo possível afirmar se os métodos coproparasitológicos empregados não foram eficientes na detecção de ovos do parasita ou se as aves de fato não estavam parasitadas.

Segundo a literatura, técnicas coproparasitológicas já foram anteriormente empregadas para a detecção de ovos destes trematódeos nos excrementos de aves infectadas, apresentando resultados diversos. *P. bragai* foi observada *post mortem* em *Paradisea rubra*, ave que havia sido negativa em três avaliações coproparasitológicas pelo método de McMaster modificado (UNWIN et al., 2013). Em contrapartida, ovos do trematódeo já foram detectados pelo método de sedimentação em excrementos de pombos domésticos (BRANDOLINI; AMATO, 2007) e de galinhas domésticas (XAVIER et al., 2015), demonstrando a eficácia desta técnica para detecção da parasitose renal.

Apesar da aplicabilidade destas técnicas, o diagnóstico da parasitose comumente é realizado *post mortem*, principalmente porque sinais clínicos sugestivos da infecção não são comuns. Infecção por *P. bragai* foi observada *post mortem* em 11 espécimes de *Phasianus colchicus* que não apresentavam sinais clínicos sugestivos da infecção (GOMES et al., 2005). Fato semelhante foi relatado em *Gallus gallus* (XAVIER et al., 2015). Em contrapartida, paresia de membro pélvico direito foi relatado em *Paradisaea rubra* parasitada por *P. bragai* (UNWIN et al., 2013).

No presente estudo, *Paratanaisia* foi observada em avaliação *post mortem* de 24 espécies de aves, pertencentes a dez diferentes ordens (Tabelas 2 e 3), algumas

das quais, sem relatos prévios de parasitismo por estes trematódeos. Assim, representam novos registros de hospedeiros as espécies *Guira guira* (Cuculiformes), *Ramphastos toco*, *Colaptes campestris* (Piciformes), *Athene cunicularia*, *Megascops choliba* (Strigiformes), *Cariama cristata* (Cariamiformes), *Thraupis sayaca* (Passeriformes), *Amazona amazonica*, *Amazona aestiva*, *Psittacara leucophthalmus*, *Eupsittula aurea*, *Brotogeris chiriri*, *Nymphicus hollandicus* (Psittaciformes), *Pavo cristatus* (Galliformes), *Patagioenas picazuro* e *Columbina squammata* (Columbiformes), além de uma ave da ordem Musophagiformes.

A ampla variedade de espécies já descritas como hospedeiros destes parasitos sugerem uma baixa especificidade parasitária. Entretanto, estudos acerca da relação do parasito com seus hospedeiros, bem como da classificação taxonômica destes parasitos são escassos, visto que a maior parte dos relatos se refere a descrições de casos em novos hospedeiros.

Das 103 aves incluídas na avaliação histopatológica, os Columbiformes representaram o maior número de indivíduos parasitados, possivelmente devido aos hábitos alimentares das espécies desta ordem. Aves das ordens Galliformes, Tinamiformes e Strigiformes, encontrados parasitados neste estudo, possuem hábitos alimentares que incluem grãos, sementes, insetos e pequenos invertebrados do solo (SICK, 1997), aumentando as chances de infecção pelo trematódeo, que possui moluscos gastrópodes como hospedeiros intermediários (KELLER; ARAÚJO, 1992). A ingestão acidental dos moluscos por aves que usualmente não se alimentam dos mesmos, como aves das ordens Columbiformes, Psittaciformes e Piciformes (SICK, 1997), deve ser considerada. Os caramujos das espécies *Leptinaria unilamellata* (KELLER; ARAÚJO, 1992) e *Subulina octona* (BRANDOLINI; AMATO, 2006), hospedeiros intermediários de *Paratanaisia* spp. no Brasil, medem aproximadamente 4-5mm (ARAÚJO; KELLER, 1993) e 13mm (ARAÚJO; BESSA, 1993), respectivamente.

Nenhuma das 15 aves necropsiadas nos anos de 2015 e 2016 demonstrou qualquer alteração macroscópica renal, a despeito da parasitose, observação esta que corrobora com observações realizadas por outros autores quanto à pequena frequência deste tipo de alteração nas aves parasitadas (MENEZES et al., 2001; MAPELI et al., 2003; TAVELA et al., 2014). Dentre as amostras obtidas do material

de arquivo, alterações macroscópicas renais foram descritas em 16 aves, embora seja importante salientar que somente 31 das 88 aves avaliadas possuía referência ao sistema renal nos respectivos arquivos de necropsia, podendo, portanto, ter havido mais casos onde alterações macroscópicas renais estivessem presentes. Trabalhar com material de arquivo pode representar certo prejuízo científico, devido a informações parciais ou dados ausentes ou incompletos.

Microscopicamente, as alterações observadas na morfologia de ductos coletores possivelmente foram causadas por ação direta dos parasitos. Seu tamanho relativamente grande pode resultar em compressão física, podendo alterar inclusive ductos coletores adjacentes não parasitados, provocando estreitamento destes ou mesmo a troca de tecido funcional por tecido conjuntivo fibroso, como observado no presente estudo e previamente descrito (UNWIN et al., 2013; TAVELA et al., 2014). A obstrução completa ou parcial dos ductos coletores pelos parasitos e/ou por debris celulares acompanhadas das alterações epiteliais, observadas no presente estudo, poderiam diminuir a formação e eliminação de urina, predispondo a ave a alterações renais secundárias, tais como a gota visceral, previamente descrita em *Rhynchotus rufescens* infectadas por *Paratanaisia confusa* (MOMO; WERTHER, 2013; MOMO; GARRIDO; WERTHER, 2016). Em contrapartida, Pinto et al. (2004) sugeriram que a dilatação dos ductos coletores pode ser compensatória para permitir o fluxo de urina.

Enquanto alguns relatos prévios sugerem infecções relativamente benignas, concentradas principalmente nos ductos coletores, estruturas diretamente afetadas pelos parasitos (PINTO et al., 2004; BRENER et al., 2006; TAVELA et al., 2014), no presente estudo foram observadas hemorragias, necrose e fibrose, além de alterações glomerulares e reações inflamatórias proeminentes em tecido renal intersticial. Infiltrados inflamatórios foram anteriormente observados próximos aos ductos coletores de *Numida meleagris*, *Meleagris gallopavo* e *Gallus gallus* e infectados por *P. bragai* (MENEZES et al., 2001; BRENER, et al., 2006; XAVIER et al., 2015) No entanto, como todas as aves do presente estudo eram naturalmente infectadas, sendo a maioria proveniente de vida livre, é possível que nem todas as alterações renais observadas estivessem diretamente relacionadas a presença dos parasitos, podendo ter sido provocadas por outros fatores prévios ou concomitantes,

infecciosos ou não. A quantidade de informações controversas relacionadas à patogenia da infecção por *Paratanaisia* spp. reflete a falta de estudos a respeito do potencial patogênico destes trematódeos em diferentes espécies de aves. Infecções experimentais controladas com *Paratanaisia* spp. em aves que fossem avaliadas histologicamente antes e após a infecção, poderiam auxiliar na mensuração da patogênese deste parasita.

A avaliação microscópica dos parasitos corados com Carmim clorídrico possibilitou a diferenciação de dois tipos morfológicos distintos com base na cobertura do tegumento, um com o tegumento recoberto por escamas e outro com o tegumento recoberto por espinhos. Escamas e espinhos representam características morfológicas importantes para a identificação de trematódeos eucotíldeos (FREITAS, 1951). Características relacionadas aos sistemas reprodutivo e digestório, assim como a morfometria, são muito semelhantes entre as espécies do gênero *Paratanaisia* (TRAVASSOS; FREITAS; KOHN, 1969), o que pode dificultar a identificação morfológica por meio de microscopia de luz. Desta forma, o uso de técnicas mais sofisticadas, como a microscopia eletrônica, pode proporcionar maior acurácia na identificação. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para descrição da morfologia externa de *P. bragai*, demonstrando um tegumento de textura irregular recoberto por escamas dos tipos simples e bífida, dispostas em fileiras transversais e voltadas para a extremidade posterior do corpo do trematódeo (BRANDOLINI; AMATO, 2007). Microscopia confocal de varredura a laser possibilitou a observação de estruturas reprodutivas, digestórias e musculares de *Tanaisia bragai* (*Paratanaisia bragai*), demonstrando tegumento recoberto por escamas, testículos de contorno irregular com localização pré-equatorial e pós ovariana e ovário lobado, lateralmente disposto (D'Ávila et al., 2010). *P. confusa* e *P. robusta*, no entanto, não possuem descrição morfológica com exceção àquela realizada por Travassos, Freitas e Kohn (1969), a qual é muito subjetiva, podendo gerar identificações equivocadas, principalmente com relação à *P. robusta* e *P. bragai*, já que as duas espécies possuem o tegumento recoberto por escamas.

A amplificação do material genético dos parasitos por meio da PCR, e posterior sequenciamento dos produtos amplificados pode auxiliar na identificação dos trematódeos e na resolução das relações taxonômicas (ROUTTU et al., 2014). A

amplificação por meio da PCR convencional de um fragmento de aproximadamente 310pb do gene 28S rDNA mostrou-se adequada para a expressão de positividade parasitária nas amostras renais avaliadas, entretanto, os fragmentos amplificados foram muito curtos e não conferiram robustez às inferências filogenéticas. Já as árvores filogenéticas geradas pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para o gene 18S rDNA de amostras de parasitas, demonstraram nítida separação entre os gêneros de trematódeos (Figuras 13 e 14), porém, algumas discrepâncias relacionadas à espécies foram observadas entre as avaliações morfológica e molecular. Como exemplo destas discrepâncias pode-se observar que os espécimes 2, 3 e 4, morfológicamente identificados como *Paratanaisia confusa* posicionaram-se no mesmo clado de *P. bragai*, ficando separados do espécime 1, o qual também foi morfológicamente identificado como *P. confusa*.

A árvore filogenética gerada por meio da Inferência Bayesiana demonstrou valores de suporte de clado mais elevados do que a árvore gerada pelo método da Máxima Verossimilhança, entretanto foram observadas politomias, sugerindo que o fragmento utilizado não possuía sinal filogenético suficiente para a separação das espécies de *Paratanaisia*. Visto que o gene 18S rDNA possui regiões polimórficas interespecíficas altamente conservadas (ROUTTU et al., 2013), possivelmente a utilização de somente um fragmento deste gene nas análises seja insuficiente para a discriminação das espécies deste gênero. Assim, múltiplos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores, desenhados para mais de um gene, poderiam ser utilizados para uma identificação mais acurada. Routtu et al. (2013) sugeriram a utilização de genes codificadores de proteínas em análises filogenéticas de trematódeos, afirmando que estes genes seriam mais discriminativos do que os genes ribossomais.

A extração de DNA em forma de *pool* dos parasitos encontrados no rim de cada ave, também pode ter prejudicado as avaliações, visto que a coinfeção foi observada em três aves (8, 9 e 10), podendo ainda ter ocorrido nas demais aves avaliadas, mesmo que não tenha sido observada. Coinfeção por *Paratanaisia* spp. foi anteriormente observada em *Procyrrhura maracana* e *Pyrrhura leucotis* concomitantemente infectadas por *P. bragai* e *P. robusta* (LUPPI et al., 2007). Ainda,

as amostras de DNA utilizadas nas avaliações moleculares não foram provenientes dos mesmos espécimes utilizados para identificação morfológica, visto que o uso de reagentes de coloração e diafanização danifica a estrutura genética, impossibilitando o uso dos mesmos espécimes processados para avaliações moleculares.

Outro fator importante a ser considerado é que até o presente momento *P. confusa* e *P. robusta* não possuem sequências de DNA descrita em bancos de dados internacionais (GenBank), estando acessíveis somente três sequências provenientes de *P. bragai*. Portanto, o gênero *Paratanaisia* se beneficiaria muito pelo incremento aos dados moleculares a cada uma das espécies que o constituem. Estudos moleculares mais aprofundados poderiam ajudar a elucidar as diferenças genéticas entre as espécies e melhorar a taxonomia do gênero, além de indicar a validade das três espécies ou o polimorfismo de uma única espécie.

No presente estudo a avaliação histopatológica foi utilizada como triagem para as avaliações moleculares, portanto, todas as amostras utilizadas nas análises moleculares eram comprovadamente positivas para trematódeos. Contudo, algumas amostras geraram resultados negativos nas análises moleculares. O insucesso na amplificação por meio da PCR convencional em algumas amostras renais parafinizadas pode ser atribuído ao fato de pouco ou nenhum DNA de parasita estar presente na amostra excisada do bloco de parafina, já que a fração de tecido utilizada nas reações foi pequena. Além disso, o processamento histológico do tecido renal, utilizando-se reagentes químicos como formol e xilol pode destruir as cadeias longas de DNA prejudicando a amplificação destes. Isto poderia explicar os resultados negativos na amplificação do fragmento de 800pb do gene 28S rDNA a partir de amostras parafinizadas, assim como observado em estudos anteriores (UNWIN et al., 2013). Apesar disto, os resultados do presente estudo confirmam a possibilidade de obtenção de resultados positivos em análises moleculares a partir de tecidos parafinizados utilizando-se pequenos fragmentos do gene 28S rDNA.

6 CONCLUSÃO

Os achados histopatológicos observados nos rins das aves infectadas sugerem que *Paratanaisia* spp. possua potencial patogênico em uma ampla variedade de hospedeiros. As espécies dos parasitos avaliadas neste estudo não puderam ser precisamente identificadas, entretanto, as inferências filogenéticas mostraram que todos os espécimes avaliados pertencem ao mesmo gênero. Portanto, estudos mais aprofundados da patogênese aliados as técnicas morfológicas e moleculares mais específicas, são necessários para um melhor entendimento da taxonomia destes parasitos.

7 REFERÊNCIAS

- ABDO, W.; SULTAN, K. Histopathological findings of the kidney Trematoda *Paratanaisia* spp. (Digenea: Eucotylidae) in cattle egret (*Bubulcus ibis*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 312-313. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000200050>>.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410. 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>>.
- ARAÚJO, J. L. B.; BESSA, E. C. A. Moluscos de importância econômica no Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 489-497. 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300016>>.
- ARAÚJO, J. L. B.; KELLER, D. G. Moluscos de importância econômica no Brasil. III Subulinidae, *Leptinaria unilamellata* (Orbigny) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 499-507. 1993.
- BACHA, W. J.; BACHA, L. M. Color Atlas of Veterinary Histology. 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 163-174
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4172-4177. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>>.
- BOYKIN, S. L. B.; BRAUN, E. J. Entry of nephrons into the collecting duct network of the avian kidney: a comparison of chickens and desert quail. **Journal of morphology**. New York, v. 216, n. 3, p. 259-269. 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1052160303>>.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 1097-1100. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>>.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Morfologia externa de espécimes adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Digenea: Eucotylidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 3, p. 129-132. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612007000300003>>.
- BRENER, B.; TORTELLY, R.; MENEZES, R. C.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode

Paratanaisia bragai, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 6, p. 677-681. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000600017>>.

CATÃO-DIAS, J. L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 32-34, 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Jan. 2017.

D'ÁVILA, S.; MANSO, P. P. A.; BESSA, E. C. A.; RODRIGUES, M. L. A.; DIAS, R. J. P. Gross anatomy of the musculature and a new description of the reproductive system of *Tanaisia bragai* and *Tanaisia inopina* (Trematoda: Eucotylidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 91, n. 2, p. 139-149, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00393.x>>.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A. Emerging infectious diseases: a key role for conservation medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.) **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 40-61.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats for biodiversity and human health. **Science**, New York, v. 287, n. 5452, p. 443-449. 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5452.443>>.

ECHOLS, M. S. Evaluating and treating kidneys. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. Florida: Spix Publishing, 2006. p. 451-492.

EPSTEIN, P. R. Biodiversity, Climate Change, and Emerging Infectious Diseases. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.) **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 27-39.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-185. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.175>>.

FREITAS, J. F. T. Revisão da família Eucotylidae Skrjabin, 1924 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 1, p. 33-123, 1951.

GIOVANNONI, M.; MALHEIRO, D. M. Incidência de parasitas em *Columba livia domestica*. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 595-598. 1952. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2318-5066.v4i4p595-598>>.

GOLDSTEIN, D. L.; SKADHAUGE, E. Renal and external regulation of body fluid composition. In: WHITTOW, G. C. (Ed.). **Sturkie's avian physiology**. 5th ed. San Diego: Elsevier, 2000. p. 265-297.

GOMES, D. C.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; PINTO, R. M. Pathology and first occurrence of the kidney trematode *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea: Eucotylidae) in *Phasianus colchicus* L., 1758, from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 3, p. 285-288. 2005.

GRACZYK, T. K. Zoonotic infections and conservation. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.) **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 220-228.

GREINER, E. C.; RITCHIE, B. W. Parasites. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 1007-1029.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford University Press, v. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2015.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 754-755. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>>.

JECKEL NETO, E. A. Técnicas de rotina em histologia. In: CARLI, A. A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 591-608.

JOHANSEN, M. V.; SITHITHAWORN, P.; BERGQUIST, R.; UTZINGER, J. Towards improved diagnosis of zoonotic trematode infections in southeast Asia. **Advances in Parasitology**, London, v. 73, p. 171-195, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(10\)73007-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(10)73007-4)>.

KAZUTAKA, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 3059-3066. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf436>>.

KELLER, D. G.; ARAUJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) com novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 1, n. 2, p. 89-92. 1992.

LEDERBERG, J. Emerging Infections: An Evolutionary Perspective. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 3, p. 366-371. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid0403.980306>>.

LUPPI, M. M.; MELO, A. L.; MOTTA, R. O. C.; MALTA, M. C. C.; GARDINER, C. H.; SANTOS, L. R. Granulomatous nephritis in psittacines associated with parasitism by the trematode *Paratanaisia* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 363-366. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.011>>.

MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 31, n. 5 p. 306–314, 1945. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/3273085>>.

MAPELI, E. B.; NASCIMENTO, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; TEBALDI, J. H. Infecções naturais por helmintos em perdizes (*Rhynchotus rufescens* Temminck, 1815) de cativeiro, no município de Jaboticabal, estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 70, n. 4, p. 415-418. 2003.

MARVULO, M. F. V.; CARVALHO, V. M. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens- medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 2194-2206.

MATUSHIMA, E. R. Técnicas Necroscópicas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 980-990.

McLELLAND, J. **A colour atlas of avian anatomy**. Aylesbury: Wolfe Publishing, 1990. p. 66- 84.

MENEZES, R. C.; JÚNIOR, D. G. M.; GOMES, D. C.; TORTELLY, R.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. Trematodes of free range reared guinea fowls (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) in the state of Rio de Janeiro, Brazil: Morphology and pathology. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 30, n. 3, p. 209-214. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450124448>>.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA, p. 01-08. 2010. Disponível em: <http://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf>. Acesso em: 21 out.2016.

MOMO, C; WERTHER, K. Parasitismo renal em perdizes (*Rynchotus rufescens*) criadas em cativeiro. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 16, Art. 1578. 2013.

MOMO, C.; GARRIDO, E.; WERTHER, K. Anatomopathological findings in captive-raised red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 227-234. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i3p227-234>>.

NEWMAN, S. J.; CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds), **Bases de Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 613-691.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 32, n.1, p. 268-274. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu300>>

PINTO, R. M.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R. Systematic and pathologic study of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) infestation in ruddy ground dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 4, p. 472-479. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000400008>>.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: Texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular**. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.C.F, 2008. p. 651-687.

ROUTTU, J.; GRUNBERG, D.; IZHAR, R.; DAGAN, Y.; GUTTEL, Y.; UCKO, M.; BEN-AMI, F. Selective and universal primers for trematode barcoding in freshwater snails. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 7, p. 2535–2540. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3903-z>>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467. 1977. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>>.

SANTOS, V. Monostomose renal das aves domésticas. **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2/4, p. 203-211. 1934.

SHERWOOD, L.; KLANDORF, H.; YANCEY, P. **Animal physiology - from genes to organisms**. Belmont: Brooks/Cole, 2005. p. 557-611.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 862 p.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1379-1393, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00128-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00128-4)>.

SNAK, A.; LENZI, P. F.; AGOSTINI, K. M.; DELGADO, L. E.; MONTANUCCI, C. R.; ZABOTI, M. V. Análises coproparasitológicas de aves silvestres cativas. **Ciência animal brasileira**. Goiânia, v. 15, n. 4, p. 502-507. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.590/1089-6891v15i425797>>.

SOUZA, T. D.; MOREIRA, M. S.; DA SILVA, S. C.; DIAS, R. G. E.; VIEIRA, F. T.; DIAS, C. V. B.; MAIA, N. L.; SILVA, V. R.; ANGELI, L. M.; PEISINO, L. B.; SANTOS, A. A; QUEIROZ, V. S.; CORTÊS, L. M. F.; SALGADO, A. L. Z. R. Patologia de

psitacídeos de centro de triagem de animais silvestres. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7., 2006, Ilhéus. **Resumos do VII Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina - Ilhéus, Brasil**, 2006 p. 470.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, n. 7, p. 01-09. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>>.

TARODA, A.; BARROS, L. D.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L.; PAIVA, M. C. D. C.; SAMMI, A. S.; SANTOS, J. R.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 415-419. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>>.

TAVELA, A. O.; JUNIOR, M. C.; OLIVEIRA, A. R.; CARNEIRO, F. T.; SILVA, V. H. D.; BRAGA, F. R.; PEIXOTO, J. V.; CARVALHO, G. D.; ARAÚJO, J. V.; PAULA, T. A. R. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 4, p. 1276-1280. 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-7136>>.

TRAVASSOS, L. Introdução ao estudo da helmintologia. **Revista brasileira de biologia**. Rio de Janeiro. 1950. 173 p.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. **Trematódeos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz. 1969. 886 p.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L.; HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, p. 232-235. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw256>>

UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology. Parasites and wildlife**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 32-41. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.001>>.

XAVIER, V. B.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; SANTOS, M. A. J.; AMATO, S. B.; TORRES, E. J. L.; PINHEIRO, J.; BRANDOLINI, S. V. P. B. Histopathological changes in the kidneys of vertebrate hosts infected naturally and experimentally with *Paratanaisia bragai* (Trematoda, Digenea). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 241-246. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015017>>.

WATSON, M. What drives population-level effects of parasites? Meta-analysis meets life-history. **International Journal for Parasitology. Parasites and wildlife**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 190–196. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.05.001>>.

ZAJAC, A. M.; CONBOY, G. A. Fecal examination for the diagnosis of parasitism. In: _____. **Veterinary clinical parasitology**. 8th. ed, Ames: Wiley- Blackwell, 2012. p. 3-170.

APÊNDICE

Apêndice A. Alterações microscópicas observadas no tecido renal de aves infectadas por *Paratanaisia* spp. As aves foram agrupadas de acordo com a ordem a que pertencem.

Alterações histológicas	Columbiformes (n=64) % (n)	Psittaciformes (n=12) % (n)	Tinamiformes (n=6) % (n)	Strigiformes (n=10) % (n)	Piciformes (n=4) % (n)	Outros (n=7) % (n)	Total de acometidos (n=103)
Interstício							
Congestão	4,6 (n=3)	16,6 (n=2)	16,6 (n=1)	10 (n=1)	0	14,2 (n=1)	8
Hemorragia	42,1 (n=27)	41,6 (n=5)	16,6 (n=1)	30 (n=3)	25 (n=1)	28,5 (n=2)	39
Infiltrados inflamatórios	90,6 (n=58)	59 (n=6)	33,3 (n=2)	40 (n=4)	25 (n=1)	14,2 (n=1)	72
Necrose	12,5 (n=8)	25 (n=3)	66,6 (n=4)	30 (n=3)	25 (n=1)	28,5 (n=2)	21
Edema	3,1 (n=2)	16,2 (n=2)	0	0	25 (n=1)	0	5
Fibrose	9,3 (n=6)	25(n=3)	66,6 (n=4)	20 (n=2)	0	28,5 (n=2)	17
Túbulos coletores							
Degeneração celular	39 (n=25)	91,6 (n=11)	83,3 (n=5)	90 (n=9)	75 (n=3)	100 (n=7)	60
Necrose	14 (n=9)	33,3 (n=4)	83,3 (n=5)	40 (n=4)	25 (n=1)	28,5 (n=2)	25
Ductos coletores							
Descamação de epitélio	60,9 (n=39)	91,6 (n=11)	83,3 (n=5)	50 (n=5)	75 (n=3)	42,8 (n=3)	66
Compressão de epitélio	76,5 (n=49)	83,3 (n=10)	50 (n=3)	50 (n=5)	50 (n=2)	71,4 (n=5)	74
Hipertrofia de epitélio	62,2 (n=40)	25 (n=3)	33,3 (n=2)	30 (n=3)	0	42,8 (n=3)	51
Hiperplasia de epitélio	56,2(n=36)	33,3 (n=4)	0	0	0	28,5 (n=2)	42
Infiltrados inflamatórios	46,8 (n=30)	16,6 (n=2)	59 (n=3)	10 (n=1)	0	0	36
Necrose	25 (n=16)	0	33,3 (n=2)	20 (n=2)	50 (n=2)	0	22
Distensão	89 (n=57)	91,6 (n=11)	100 (n=6)	70 (n=7)	100 (n=4)	85,7 (n=6)	91
Compressão tecido adjacente	87,5 (n=56)	91,6 (n=11)	83,3 (n=5)	70 (n=7)	100 (n=4)	71,4 (n=5)	88
Fibrose	23,4 (n=15)	41,6 (n=5)	16,6 (n=1)	20 (n=2)	50 (n=2)	0	25
Parasitas média	17,93	8,5	5,8	18,2	100 (n=4)	15,7	
Glomérulos							
Edema	7,8 (n=5)	25 (n=3)	0	20 (n=2)	25 (n=1)	28,5 (n=2)	13
Necrose	12,5 (n=8)	16,6 (n=2)	66,6 (n=4)	20 (n=2)	0	0	16
Congestão	6,2 (n=4)	16,6 (n=2)	0	10 (n=1)	0	28,5 (n=2)	9
Ureter no corte histológico	n=21	n=6	n=3	n=3	n=1	n=1	n=35
Parasitas em ureter	n=7	n=3	n=2	n=2	n=1	n=0	n=15