VALERIA RUOPPOLO

**Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune
e inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)
mantidos em cativeiro**

São Paulo
2016

VALERIA RUOPPOLO

**Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e
inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)
mantidos em cativeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3353
FMVZ

Ruoppolo, Valéria
Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro / Valéria Ruoppolo. -- 2016.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Fagocitose. 2. Fenotipagem. 3. Fitohemaglutinina. 4. Citometria de fluxo. 5. Ciclo da muda. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da resposta inflamatória cutânea após a aplicação de fitohemaglutinina em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)", protocolado sob o CEUA nº 5173210514, sob a responsabilidade de **José Luiz Catão-dias e equipe; Valeria Ruoppolo; Jéssica Ribeiro Domato; Ralph Eric Thijl Vanstreels; Sílvia Renata Gaido Cortopassi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 12/11/2014.

We certify that the proposal "Study of the cutaneous inflammatory response following phytohemagglutinin injection in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*)", utilizing 21 Brazilian wild species (10 males and 11 females), protocol number CEUA 5173210514, under the responsibility of **José Luiz Catão-dias and team; Valeria Ruoppolo; Jéssica Ribeiro Domato; Ralph Eric Thijl Vanstreels; Sílvia Renata Gaido Cortopassi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 11/12/2014.

Vigência da Proposta: de 05/2014 a 12/2014

Área: Depto. Patologia

Procedência: Os pinguins a serem utilizados no estudo fazem parte do plantel permanente do Sabina Parque Escola Do Conhecimento.

Espécie: *Espécie silvestre brasileira*

Gênero: Machos

idade: adulto

N: 10

Linhagem: *Spheniscus magellanicus*

Peso: 3-5kg

Procedência: Os pinguins a serem utilizados no estudo fazem parte do plantel permanente do Sabina Parque Escola Do Conhecimento.

Espécie: *Espécie silvestre brasileira*

Gênero: Fêmeas

idade: juvenil

N: 11

Linhagem: *Spheniscus magellanicus*

Peso: 3-5kg

Dados complementares para animais silvestres: Os pinguins são capturados e contidos fisicamente com uso de luvas de proteção.

São Paulo, 30 de setembro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e inflamatória de pinguins-d-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro.", protocolado sob o CEUA nº 3421170316, sob a responsabilidade de **José Luiz Catão Dias e equipe; Valeria Ruoppolo; Cristina Massoco Salles Gomes; Jessica Domato Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 12/04/2016.

We certify that the proposal "Influence of the moulting cycle on the immune and inflammatory responses in captive Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*).", utilizing 13 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 3421170316, under the responsibility of **José Luiz Catão Dias and team; Valeria Ruoppolo; Cristina Massoco Salles Gomes; Jessica Domato Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 04/12/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2016](#) a [07/2016](#)

Área: [Patologia Experimental E Comparada](#)

Procedência: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Espécies silvestres brasileiras](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [2 a 10 anos](#)

N: [13](#)

Linhagem: [Spheniscus magellanicus](#)

Peso: [3 a 8 kg](#)

Dados complementares para animais silvestres: [Os pinguins são capturados manualmente e contidos fisicamente com uso de luvas de proteção Autorização SISBIO nº 20825-7](#)

Resumo: Este projeto tem o objetivo de complementar a amostragem dos estudos das variáveis imunológicas de pinguins-d-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) iniciados através do Protocolo CEUAVET 5173210514.

Será realizada a amostragem de sangue de 13 dos 21 indivíduos utilizados no estudo anterior, de acordo com seu momento em relação à muda anual de penas. O experimento adicionará novas técnicas laboratoriais para o estudo do perfil imunológico através da citometria de fluxo na análise do ensaio de burst oxidativo e de fagocitose, linfoproliferação e imunofenotipagem.

Local do experimento: Sabina Parque Escola Do Conhecimento □ Santo André, SP

São Paulo, 18 de abril de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

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: 20825-8	Data da Emissão: 03/05/2016 13:31	Data para Revalidação*: 02/06/2017
* 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: José Luiz Catão Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e envio de amostras biológicas	07/2009	12/2013
2	Coleta e envio de amostras biológicas	01/2014	01/2018

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, posseiro 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, 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.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	A quantidade de sangue a ser coletada não deve ultrapassar 1% da massa corporal da ave, sendo este quantitativo suficiente para os objetivos pretendidos.
2	A quantidade de sangue a ser coletada não deve ultrapassar 1% da massa corporal da ave, sendo este quantitativo suficiente para os objetivos pretendidos.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	CLAUDIA NIEMEYER	Doutoranda	282.611.748-32	264406576 SSP-SP	Brasileira
2	JULIANA YURI SAVIOLLI	Coleta de amostras biológicas	301.023.498-86	327703994 SAOPAULO-SP	Brasileira

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: 59794664

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: 20825-8	Data da Emissão: 03/05/2016 13:31	Data para Revalidação*: 02/06/2017
* 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: José Luiz Catão Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

3	PATRICIA PEREIRA SERAFINI	Coleta de amostras biológicas	027.472.819-22	66214524 SESP-PR	Brasileira
4	RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO	Coleta de amostras biológicas	401.790.010-00	6006891052 SSP-RS-RS	Brasileira
5	Sabrina Epiphany	Coordenadora adjunta	141.007.908-21	15570072 SSP-SP	Brasileira
6	CLAUDIA CARVALHO DO NASCIMENTO	Coleta de amostras biológicas	269.215.078-31	28220355-2 SSP/SP-SP	Brasileira
7	CRISTIANE KIYOMI MIYAJI KOLESNIKOVAS	Coleta de amostras biológicas	176.142.858-67	15481877 SSP-SP	Brasileira
8	RALPH ERIC THIUL DEL VAL ONORO VANSTREELS	Doutorando	332.714.958-58	44041896-3 SSP-SP	Brasileira
9	VANESSA MARQUES PEDROSO	Coleta de amostras biológicas	004.001.200-03	3061884271 SSP-RS	Brasileira
10	PAULA LIMA CANABARRO	Coleta de amostras biológicas	981.135.420-00	2076352885 SJS-RS	Brasileira
11	ANDRÉA CORRADO ADORNES	Coleta de amostras biológicas	535.371.810-00	2029731111 SSP-RS	Brasileira
12	SILVIA BAINY GASTAL	Coleta de amostras biológicas	018.444.810-77	8080081981 SJS-RS	Brasileira
13	ARYSE MARTINS MELO	Coleta de amostras biológicas	012.549.910-85	2111714693 SSP-RS	Brasileira
14	Cristiane Lassálvia Nascimento	Coleta de amostras biológicas	014.792.837-03	209539938 ssp-SP	Brasileira
15	GUSTAVO HENRIQUE PEREIRA DUTRA	Coleta de amostras biológicas	273.007.978-57	246793260 SSP-SP	Brasileira
16	THIAGO AUGUSTO DO NASCIMENTO	Coleta de amostras biológicas	304.758.368-47	243317372 SSP/SP-SP	Brasileira
17	Raphael Nogueira Ramos	Coleta de amostras biológicas	283.204.358-54	33254836-3 ssp-SP	Brasileira
18	Priscilla Maracini	Coleta de amostras biológicas	169.546.928-32	243245579 SSP-SP	Brasileira
19	Martha Lima Brandão	Coleta de amostras biológicas	029.282.627-33	101388106 IFP-RJ	Brasileira
20	ÂNGELA LEITZKE CABANA	Coleta de amostras biológicas	006.086.010-39	1073310301 SSP-RS	Brasileira
21	Melissa Orzechowski Xavier	Coleta de amostras biológicas	984.912.530-68	6069748678 SJS-RS	Brasileira
22	RENATA FERREIRA HURTADO	Coleta de amostras biológicas	323.144.298-26	439268898 SSP-SP	Brasileira
23	Juliana Marigo	Pós-doutoranda	255.015.058-94	28136736x SSP-SP	Brasileira
24	KATIA REGINA GROCH	Doutoranda	739.751.419-72	9080491955 SSPPOA-RS	Brasileira
25	Eliana Faquim de Lima Mauro	Coordenadora adjunta	134.270.528-93	21583159-7 SSP-SP	Brasileira
26	Jéssica Domato Ribeiro	Coleta de amostras biológicas	364.651.708-50	430047770 SSP-SP	Brasileira

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: 59794664

Página 2/5

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: 20825-8	Data da Emissão: 03/05/2016 13:31	Data para Revalidação*: 02/06/2017
* 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: José Luiz Catão Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

2	VALERIA RUOPPOLO	Coordenadora adjunta e doutoranda	195.315.808-04	21416884-0 SSP-SP	Brasileira
2	ANA CAROLINA EWBANK	Mestranda	317.712.058-73	307903163 SSP-SP	Brasileira
2	marina von atzingen dos reis	Coleta e processamento de amostras biológicas	299.527.228-18	289611970 ssp/sp-SP	Brasileira
3	PEDRO RENATO GONÇALVES FILHO	Coleta de amostras biológicas	027.050.320-02	5101642808 SJS-RS	Brasileira
3	Laura Chrispim Reisfeld	Coleta de amostras biológicas e mestranda	338.691.748-89	460923833 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	Centro de Recuperação de Animais Marinhos, FURG (Rio Grande)	Fora de UC Federal
2		SC	CETAS do Núcleo de Fauna do IBAMA (Florianópolis)	Fora de UC Federal
3		SP	CETAS do Centro Universitário Monte Serrat (Santos)	Fora de UC Federal
4		SP	Aquário Municipal de Santos (Santos)	Fora de UC Federal
5		SP	Aquário de Guarujá (Guarujá)	Fora de UC Federal
6		SP	Aquário de Peruibe (Peruibe)	Fora de UC Federal
7		SP	Aquário de São Paulo (São Paulo)	Fora de UC Federal
8		SP	Fund. Museu de História, Pesq. e Arq. do Mar (São Sebastião)	Fora de UC Federal
9		SP	Sabina Escola Parque do Conhecimento (Santo André)	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Spheniscidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Spheniscidae

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Penas, Outras amostras biológicas (Swabs orais e cloacais)
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta (cativeiro)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	coleção

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: 59794664

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUOPPOLO, Valeria

Título: Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Toda a minha dedicação e amor à
possibilidade de, com o meu trabalho,
melhorar a saúde dos animais.*

*À minha mãe, Teresa Farré Bosch,
por seu apoio incondicional
desde o primeiro dia da minha vida.*

*To Jay Holcomb and Eric Woehler,
for your love and constant support,
and for teaching me so much
through your love for birds.*

AGRADECIMENTOS

Ao nosso sábio e respeitado orientador, Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias, o meu mais profundo reconhecimento pela orientação, confiança, compreensão, paciência, amizade, estímulo e críticas sempre construtivas. Seu exemplo de dignidade e serenidade sempre foram motivo para nossa admiração. Obrigada por aceitar o desafio, mais uma vez.

À Prof. Dra. Cristina O. Massoco Salles Gomes, sua dedicação, direcionamento e ensinamentos me trouxeram até o final deste trabalho, não tenho palavras para descrever meu agradecimento e respeito pela profissional que é.

A toda minha pequena família, especialmente à minha mãe, La Teresa Bosch, por ter apoiado incansavelmente minhas decisões. Aos meus tios/padrinhos, agradeço a possibilidade que me deram de estudar e o apoio familiar ao longo da vida.

To my forever supporter and partner in life, Eric Woehler. Thank you for your encouragement, help and timely words. For your constant presence, never afar. I could not have done it without you.

A todos os colegas e amigos da Aiuká Consultoria em Soluções Ambientais, com agradecimentos especiais àqueles que seguraram as minhas ausências e me apoiaram sempre que necessário: Claudia Nascimento e Camila Mayumi. Obrigada pelo auxílio na tese, tanto no início quanto no final: Viviane Barquete; Emerson T. Eto; Pedro Renato Gonçalves Filho. Agradeço a equipe inteira, um a um, pelo apoio e torcida durante todo o processo, vocês são parte desta vitória.

Ao Rodolfo Pinho da Silva Filho (Neneco); Sergio R. Heredia (Pappo); Gastón Delgado; Julio Reynoso; J. M. Barredo (Chema); Flavia Miranda; Laura Reisfeld; Juliana Yuri Saviolli, colegas e amigos de tantas aventuras. Seu apoio e amizade sempre me deram coragem e alegria. Obrigada por tudo.

To my English speaking friends and colleagues. Life has been an incredible ride and I thank you for all the opportunities and adventures. Thank you for your support throughout my career: Jay Holcomb, Barbara Callahan, Curt Clumpner, Ian Robinson, Gail A'Brunzo, Katie Moore, Josey Sharrad. Words cannot explain my admiration and how grateful and fortunate I am to have you all in my life.

À Jessica Domato Ribeiro, obrigada pela confiança e colaboração desde o início, sem seu apoio e parceria este trabalho não teria se concretizado. Agradecimentos sem fim à equipe do Sabina Parque Escola do Conhecimento pelo auxílio e viabilização das coletas e informações sobre os animais: Catherina Monteiro Bartalini; Rafael Torres; Felipe Domingos e Diana Becker.

Prof. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi, Bruno Pedrón e Renata Hurtado, agradeço seu apoio na anestesia dos indivíduos e colheita das amostras para o teste da fitohemaglutinina.

Aos colegas do CRAM-FURG (Aryse Martins; Andrea C. Adornes; Paula L. Canabarro, Silvia Gastal, Vanessa Pedroso) pela alegria, amizade e auxílio no desenvolvimento do projeto piloto da fitohemaglutinina.

Ao colega Ralph Vanstreels, muito obrigada pela parceria de sucesso ao longo dos anos, fizemos coisas incríveis. Obrigada por me convencer a encarar o doutorado e pelo apoio desde o desenvolvimento do projeto até a qualificação, passando pelo delineamento e estatística do experimento com a fitohemaglutinina.

À Maria Fernanda Gonçalves, agradeço seu apoio e ensinamentos na patologia clínica.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT (LADTOX): Nicolle Queiroz Hazarbassanov, Vagner Gonçalves Júnior e Herculano Pinho Pereira. Obrigada pela paciência, ensinamentos e auxílio no processamento das amostras. Nicolle, agradeço pelo auxílio com a estatística do experimento da muda.

Aos colegas e amigos contemporâneos do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM): Jorge Oyakawa e Sândara Sguario (obrigada pelo auxílio com o material para as coletas e processamento laboratorial); Angélica Sarmiento; Ana Carolina Ewbank; Carlos Sacristan; Catia Dejuste de Paula; Fabíola Prioste (obrigada pelo auxílio inicial com os diferenciais!); Juliana Marigo; Kátia Groch; Laura Reisfeld; Pedro Navas; Marco Gattamorta; Samira Costa; Silmara Rossi.

Aos técnicos do Laboratório de Histopatologia do VPT: Cláudio Arroyo, Luciano Antas Bugalho pelo processamento das amostras de histopatologia.

À Sra. Elza Faquim da biblioteca Virginie Buff D'Apice pelo auxílio e ensinamentos para a normalização correta desta tese. E à Cristina Aurichi e Milena Oliveira, da secretaria de pós-graduação pela ajuda nos momentos de dúvida.

“A gratidão é o tesouro dos humildes”

(William Shakespeare)

RESUMO

RUOPPOLO, V. **Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro**. [Influence of the moulting cycle on the immune and inflammatory responses in captive Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*)]. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A mudança anual de penas é um componente crítico do ciclo biológico de todas as espécies de aves e pode modificar as respostas imunológicas individuais, sendo que suas consequências são pouco estudadas. Neste contexto, uma vez que são escassos os estudos acerca do perfil clínico e parâmetros imunológicos de pinguins-de-Magalhães em diferentes fases da muda, este estudo propôs avaliar determinados aspectos relacionados a esses perfis, em animais mantidos em ambiente controlado. Foram estudados 21 indivíduos adultos (dez machos e 11 fêmeas) e os parâmetros avaliados foram: teste de hipersensibilidade cutânea tardia à fitohemaglutinina (FHA) com a avaliação histopatológica de biópsias que incluíram a análise qualitativa e quantitativa dos tipos celulares presentes na reação e no controle às 6, 24 e 48 horas; parâmetros clínicos (massa corpórea e hematologia); fagocitose e *burst* oxidativo; fenotipagem e resposta linfoproliferativa. O teste de FHA demonstrou diferença significativa na espessura da membrana interdigital de ambas as patas inoculadas com FHA e com o controle (PBS) quando comparadas antes da inoculação e antes da biópsia às 24 e 48 horas. A análise histomorfométrica revelou não haver diferenças significativas na frequência relativa de granulócitos (heterófilos/ eosinófilos), linfócitos, macrófagos ou trombócitos entre as patas inoculadas com FHA e PBS em nenhum dos momentos analisados. Este resultado sugere que a diferença na espessura da membrana interdigital das patas inoculadas seja em decorrência do edema e não do infiltrado inflamatório. Para analisar os efeitos do ciclo da muda nos parâmetros clínicos e hematológicos, os animais foram divididos em três grupos: pré-muda (-5 a 0 dias da muda), muda (10º ao 21º dia da muda) e padrão basal (>120 dias da muda). Os resultados mostraram que em relação ao momento basal: houve aumento significativo na massa corpórea dos animais no momento da pré-muda; diminuição significativa de proteínas totais, hematócrito, eritrócitos totais e leucócitos totais na pré-muda e muda. Não houve

diferença no número total de monócitos e heterófilos, contudo, houve eosinofilia e linfopenia na pré-muda e muda, respectivamente. Com relação aos parâmetros imunológicos, houve aumento no *burst* oxidativo gerado pelo estímulo biológico (*Staphylococcus aureus*) na pré-muda em relação à muda e ao padrão basal; ocorreu aumento do *burst* oxidativo gerado pelo estímulo químico (éster de forbol) na pré-muda em relação à muda. Em relação à fagocitose, houve diminuição desta capacidade dos leucócitos dos animais na pré-muda e muda em relação ao padrão basal quando o agente foi bacteriano; entretanto, o mesmo não foi observado para a fagocitose de leveduras (Zymosan A); houve diminuição de linfócitos T CD4⁺ circulantes na pré-muda e muda em relação ao padrão basal e o índice de proliferação de linfócitos aumentou durante o período de muda em relação ao basal. Esses resultados tomados em conjunto sugerem que as mudanças fisiológicas observadas durante o ciclo da muda interferem na modulação de parâmetros imunológicos e são sugestivas de serem consequência do prejuízo energético sofrido, mesmo em animais mantidos em ambientes controlados.

Palavras-chave: Fagocitose. Fenotipagem. Fitohemaglutinina. Citometria de fluxo. Ciclo da muda.

ABSTRACT

RUOPPOLO, V. **Influence of the moulting cycle on the immune and inflammatory responses in captive Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*)**. [Influência do ciclo da muda de penas nas respostas imune e inflamatória de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro]. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The annual replacement of feathers is a critical component of the biological cycle of all bird species. Molt can modify their individual immune response, and the consequences of this are not well known. Within this context, and the few studies on the clinical profile and immunological parameters of Magellanic penguins at different stages of their molt, this study aimed to evaluate certain aspects related to the clinical profiles of animals kept in a controlled environment. A total of 21 adult individuals (ten males and 11 females) was analyzed and the parameters evaluated in this study were: delayed-type hypersensitivity test to phytohemagglutinin (PHA) based on the histopathological evaluation of foot web biopsies that included qualitative and quantitative analysis of cell types present in the essay and control at 6, 24 and 48 hours; clinical parameters (body mass and hematology); phagocytosis and oxidative burst; phenotyping and lymphoproliferative response. The PHA test showed significant differences in the thickness of the webbing of both feet inoculated with PHA and control (PBS), when compared before inoculation and before biopsy at 24 and 48 hours. Histomorphometric analysis revealed no significant differences in the relative frequencies of granulocytes (heterophils/ eosinophils), lymphocytes, macrophages, thrombocytes, or between the feet inoculated with PHA and with PBS in any of the samples. This result suggests that the difference in thickness of the foot webbing is due to edema and not an inflammatory infiltrate. To analyze the effects of the molting cycle on clinical and hematological parameters, the birds were divided into three groups: pre-molt (from -5 days to the start of the molt, day 0), molt (10th to 21st days of molt) and baseline (>120 days after the completion of the molt). The results showed that in comparison with baseline values: a significant increase in body mass occurred during pre-molt; and a significant decrease in total protein, hematocrit, total erythrocytes and total leukocytes occurred during pre-molt and molt. There was no difference in the total numbers of monocytes and heterophils, however, there were eosinophilia and lymphopenia during pre-molt and molt, respectively.

There was an increase in the oxidative burst generated by the biological stimulus (*Staphylococcus aureus*) in the pre-molt compared to molt and baseline levels; and there was an increased oxidative burst generated by the chemical stimuli (phorbol esters) in the pre-molt in relation to the molt. There was a decreased capacity of phagocytosis for the leukocytes in animals during pre-molt and molt compared to baseline when the agent was bacterial; however, this was not observed for the phagocytosis of yeast (Zymosan A). There was a decrease of circulating CD4⁺ T lymphocytes in the pre-molt and molt compared to baseline, and the lymphocyte proliferation index increased during the molt compared to baseline. The results suggest that the physiological changes observed during the molt cycle does interfere with the modulation of immune parameters, and are suggestive of resulting as a consequence of from the high energy demands of molt, even for birds kept in controlled environments.

Keywords: Phagocytosis. Phenotyping. Phytohemagglutinin. Flow cytometry. Molt cycle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adultos de pinguins-de-Magalhães em volta de um único juvenil. Notar a diferença na coloração acinzentada da cabeça do juvenil, sem o padrão preto e branco presente nos adultos	25
Figura 2 - Distribuição geográfica do pinguim-de-Magalhães	26
Figura 3 - Ciclo biológico anual do pinguim-de-Magalhães	27
Figura 4 - Representação do sistema imunológico, seus componentes e exemplos de técnicas possíveis de serem utilizadas na avaliação de sua função. Adaptado de.....	33
Figura 5 - Piscina do recinto de exposição do Sabina Parque Escola do Conhecimento, em Santo André, SP.....	43
Figura 6 - Classificação da condição corpórea de 1 a 4, de acordo com Silva e Ruoppolo (2014).....	45
Figura 7 - Documentação individual do momento da muda: A- pré-muda; B- pós-muda e C- padrão basal e da presença/ ausência de pododermatites nos mesmos momentos (D, E, F).....	46
Figura 8 - Colheita de sangue através da veia braquial sob anestesia.....	47
Figura 9 - Colheita de sangue por meio de punção da veia jugular direita	48
Figura 10 - Colheita de sangue por meio de punção de veia metatársica	48
Figura 11 - Posicionamento e medição da membrana interdigital pré-inoculação utilizando o espessímetro.....	51
Figura 12 - Antissepsia e inoculação intradérmica da solução na membrana interdigital, na distância média entre os dígitos.....	52
Figura 13 - A anestesia dos pinguins foi induzida na máscara, utilizando isofluorano	53
Figura 14 - Após a indução da anestesia foram realizadas as medidas com o espessímetro digital e o resfriamento das patas, em auxílio à hemostasia	53
Figura 15 - Realização da biópsia utilizando <i>punch</i> cirúrgico.....	53
Figura 16 - Apresentação das patas após a sutura e os fragmentos em tubos Falcon® identificados e com tampas de cores diferentes, de acordo com a amostra: FHA tampa laranja e PBS tampa azul	54

Figura 17 - Fotomicrografias compondo o fragmento inteiro da biópsia (H.E., 40x) com suas áreas de interesse delimitadas pelo programa ImagePro Plus para o cálculo da proporção de <i>pixels</i> das células inflamatórias (PPCI).....	56
Figura 18 - Identificação das células quantificadas no infiltrado inflamatório dos fragmentos de biópsia (H.E., 1000x).....	57
Figura 19 - Amostras em preparação para o ensaio do <i>burst</i> oxidativo e de fagocitose	59
Figura 20 - Citômetro de fluxo do LADTOX-VPT. 1- local de inserção do tubo das amostras; 2- painel de controle; 3- gráficos de aquisição e análise.....	59
Figura 21 - Demonstração da seleção das populações de heterófilos obtidas após <i>burst</i> de fagocitose e seus respectivos histogramas	60
Figura 22 - Preparação e coleta de células mononucleares para a imunofenotipagem	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mudanças no fotoperíodo do recinto dos pinguins do Sabina Parque ao longo do ano.....	44
Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem e proliferação de linfócitos	61

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Demonstração da progressão da espessura das patas ao longo do tempo, Proporção de Pixels das Células Inflamatórias (PPCI) e contagens diferenciais na histopatologia de patas de pinguins-de-Magalhães inoculadas com PBS e FHA. As barras verticais representam o desvio padrão dos dados 67
- Gráfico 2 - Comparação do Índice de Contribuição Relativa ao Infiltrado (ICRI) para cada tipo celular entre os grupos e entre as patas inoculadas com PBS e FHA 68
- Gráfico 3 - Resultados obtidos na pesagem dos indivíduos (massa) e os valores de proteínas plasmáticas totais na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães 70
- Gráfico 4 - Resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos de hematócrito, eritrócitos totais, trombócitos, e volume corpuscular médio (VCM) na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães 71
- Gráfico 5 - Resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos de leucócitos totais e as porcentagens obtidas de linfócitos, heterófilos, eosinófilos e monócitos após contagens diferenciais no esfregaço sanguíneo na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães 72
- Gráfico 6 - Resultados obtidos no *burst* oxidativo basal (A), *burst* com SAPI (B) e *burst* com PMA (C) durante a pré-muda, muda e padrão basal..... 73
- Gráfico 7 - Resultados obtidos para os índices de fagocitose com SAPI (A) e com Zymosan A (B) na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães 74
- Gráfico 8 - Resultados obtidos na imunofenotipagem de linfócitos T circulantes CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), gama-delta (C) e capacidade linfoproliferativa na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães 75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	ASPECTOS DA HISTORIA NATURAL DO PINGUIM-DE-MAGALHÃES	24
2.2	ESTRESSE DO CICLO BIOLÓGICO E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	29
2.2.1	Manejo em cativeiro	37
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	LICENÇAS	42
4.2	ANIMAIS.....	42
4.3	MANEJO	43
4.4	CLASSIFICAÇÃO DO PERÍODO DA MUDA	44
4.5	EXAME CLÍNICO E COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
4.5.1	Exame Clínico	45
4.5.2	Colheita de sangue	46
4.5.3	Biópsia tecidual	48
4.6	PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO.....	49
4.7	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	49
4.7.1	Hematócrito, proteínas totais, eritrograma, leucograma e contagem diferencial de leucócitos	49
4.8	ENSAIO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA À FITOHEMAGLUTININA (FHA).....	50
4.8.1	Preparo da solução de FHA e descrição das fases do ensaio.....	50
4.8.2	Análise histopatológica.....	55
4.9	DETERMINAÇÃO DO "BURST" OXIDATIVO E FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	58
4.9.1	Avaliação de <i>burst</i> oxidativo e fagocitose	58
4.10	AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM.....	60
4.10.1	Avaliação da imunofenotipagem (análise de marcadores fenotípicos de membrana)	60

4.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS POR MITÓGENOS - ENSAIO <i>IN VITRO</i>	61
4.11.1 Obtenção de linfócitos sanguíneos.....	61
4.11.2 Ensaio de linfoproliferação por citometria de fluxo	62
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4.12.1 Análise estatística dos parâmetros inflamatórios e imunes	63
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	64
5.1 EXPERIMENTO 1 - TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA À FITOHEMAGLUTININA (FHA) EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES	64
5.1.1 Resultados	64
5.2 EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DO CICLO DA MUDA ANUAL DE PENAS EM PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES MANTIDOS EM CATIVEIRO.....	68
5.2.1 Resultados	69
6 DISCUSSÃO	76
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES.....	102

1 INTRODUÇÃO

O pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é uma das espécies mais resilientes de pinguins, realizando os trajetos mais longos entre as diversas espécies. Suas colônias reprodutivas mais próximas da costa brasileira estão localizadas aos 42°S na Patagônia argentina, e todos os anos migram para o norte em direção ao nosso litoral, em busca de alimento (WILLIAMS, 1995). Esta espécie tem a capacidade de viajar até 170 km em um só dia (BOERSMA et al., 2009; SKEWGAR; BOERSMA; SIMEONE, 2014) e durante sua migração pode fazer mais de 4.000 km, somando sua viagem de ida e volta entre o Brasil e Ilhas Falkland/Malvinas, por exemplo (RUOPPOLO et al., 2012).

Assim como para outras espécies de aves migratórias, o seu deslocamento invernal é um dos momentos desafiadores de sua existência (WILLIAMS, 1995; BOERSMA et al., 2013). Ao longo do trajeto, estão expostos às inclemências do clima, falta de alimento, predadores, competição com as atividades de pesca industrial, contaminantes ambientais (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). Seu período migratório anual inicia-se logo após o término da troca de penas, que está relacionada ao término do período reprodutivo (BOERSMA et al., 2013). Ao final destes dois eventos (reprodução e muda) de grande desgaste físico, acredita-se que o indivíduo encontra-se em um dos momentos mais frágeis no que concerne a sua condição geral.

A substituição anual das penas é um processo fisiológico que demanda grandes quantidades de energia. Na maioria das espécies de aves a troca é parcial e feita ao longo do ano, porém nos pinguins é feita em terra de uma só vez, ao longo de algumas semanas, acompanhada de um período de jejum. A maneira como os pinguins lidam com a preparação para a muda, por meio do ganho prévio de massa corpórea considerável, de 40 a 70% de seu peso normal, demonstra a adaptabilidade metabólica destas espécies ante um evento fisiológico extremo, como é a muda “catastrófica”.

Frente às dificuldades de seu ciclo biológico, somados aos seus hábitos terrestres e marinhos, os pinguins apresentam desafios diferenciados, quando comparados às outras aves (TEULIER et al., 2012). O mesmo é possível ser inferido

para seu sistema imunológico, porém o conhecimento atual sobre a imunidade das espécies de pinguins é limitado. Neste sentido, este trabalho pretendeu estudar a influência do ciclo da muda anual de penas em determinados aspectos dos perfis inflamatório e imunológico de pinguins-de-Magalhães. Para tal, foram utilizadas ferramentas clássicas no estudo da imunologia como o teste de hipersensibilidade cutânea tardia à fitohemaglutinina, a avaliação da resposta imune inata, bem como parâmetros clínicos e hematológicos.

Nossa expectativa é de que este estudo contribua para a compreensão de parcela dos fatores que modulam o *status* imunológico destas aves durante sua manutenção em cativeiro, seja ela permanente em coleções zoológicas ou temporária, durante o processo de reabilitação de indivíduos encalhados na costa brasileira. A compreensão do perfil imunológico e dos fatores que o influenciam permitirão a adaptação e melhoria das abordagens clínicas, aumentando as taxas de sobrevivência e o número de animais liberados à natureza após sua reabilitação, assim como favorecem o seu bem-estar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS DA HISTORIA NATURAL DO PINGUIM-DE-MAGALHÃES

Pinguins são aves aquáticas pertencentes à Ordem dos Sphenisciformes. Esta Ordem é constituída por uma única família, a Spheniscidae, que é composta por 18 espécies distribuídas somente no hemisfério Sul. O pinguim-de-Magalhães é uma das quatro espécies do gênero *Spheniscus*, três delas distribuídas pela América do Sul e uma na África (WILLIAMS, 1995). A espécie é classificada como “Quase Ameaçada” pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), com uma população total estimada em 1,3 milhões de casais (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). Sendo também listada no Apêndice II da Convenção Internacional sobre o Comércio Internacional das Espécies de Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES).

O pinguim-de-Magalhães é uma espécie de médio porte, com 50 cm de altura (de pé) em média e peso de 4,5 a 5 kg (WILLIAMS, 1995). Não apresenta dimorfismo sexual acentuado, porém os sexos podem ser diferenciados por conta do tamanho e peso ligeiramente maior dos machos, permitindo a sexagem biométrica (SCOLARO; HALL; XIMÉNEZ, 1983). Os filhotes podem ser facilmente diferenciados em seu primeiro ano de vida devido à coloração cinzenta e homogênea da plumagem, sem a presença do característico anel branco na cabeça (Figura 1) (WILLIAMS, 1995; BOERSMA et al., 2013). Pinguins-de-Magalhães são aves de grande longevidade, que atingem a maturidade sexual entre os quatro e oito anos de vida, dependendo do sexo. Ao redor de 50% dos machos iniciam sua atividade reprodutiva entre sete e oito anos de idade, enquanto que 50% das fêmeas se reproduzem por primeira vez aos seis anos (BOERSMA et al., 2013). Em cativeiro há espécimes com mais de 30 anos, e estima-se que a longevidade do pinguim-de-Magalhães na natureza seja de 25 a 30 anos, sendo que os dois primeiros anos de vida são o período de maior mortalidade destas aves (WILLIAMS, 1995; BOERSMA et al., 2013).

Figura 1 - Adultos de pinguins-de-Magalhães em volta de um único juvenil. Notar a diferença na coloração acinzentada da cabeça do juvenil, sem o padrão preto e branco presente nos adultos

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

As colônias reprodutivas do pinguim-de-Magalhães estão distribuídas ao longo do litoral da Argentina, Chile e Ilhas Falkland/ Malvinas, desde a Terra do Fogo 55°S até as latitudes 41°S no Atlântico; e 33°S no Pacífico (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012; BOERSMA et al., 2013). A espécie não se reproduz em território brasileiro, porém é considerada integrante da fauna nativa e migrante sazonal, vindo ao litoral brasileiro em busca da abundância alimentar utilizando a plataforma continental durante o inverno (STOKES; BOERSMA, 1999; SICK, 2001; CEMAVE, 2011). Em seu deslocamento invernal, no entanto, atingem regiões mais ao norte, até as províncias de La Serena e Vallenar no Chile e os estados de São Paulo e Rio de Janeiro no Brasil (Figura 2) (WILLIAMS, 1995; SICK, 2001; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). Mais raramente avançam ainda mais ao norte, até o Peru na costa do Pacífico ou o nordeste brasileiro, do lado Atlântico (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010). Há ainda relatos isolados de animais encontrados na costa Antártica (registro máximo a 67°S) e até mesmo na Austrália e Nova Zelândia (BARBOSA et al., 2007). Entretanto, a distância média de deslocamento, só do trajeto de ida, desde suas colônias reprodutivas ao norte, gira ao redor de 2.000 km (STOKES et al., 2014).

Figura 2 - Distribuição geográfica do pinguim-de-Magalhães

Fonte: (IUCN Red List - BirdLife International, 2008).

As atividades cotidianas da espécie estão intimamente ligadas à sazonalidade, sendo que permanecem de finais de setembro a março/ abril em suas colônias reprodutivas, enquanto que de março/ abril a setembro se afastam da costa e se deslocam em direção ao norte. Seu deslocamento invernal inicia-se logo após a fase de muda, que pode ocorrer desde o final do mês de fevereiro até o meio de abril (Figura 3). Suas presas preferenciais consistem em anchóitas e sardinhas, entre outras espécies de peixes, além de moluscos cefalópodes e crustáceos

(WILLIAMS, 1995; SCOLARO et al., 1999; FONSECA; PETRY; JOST, 2001; PINTO; SICILIANO; BENEDITTO, 2007).

Figura 3 - Ciclo biológico anual do pinguim-de-Magalhães

Fonte: (BOERSMA et al., 2013).

Durante seu deslocamento invernal para forrageio, as aves permanecem em alto-mar à margem da plataforma continental do norte da Argentina, Uruguai e Brasil. Sua distância da costa varia entre 50 e 250 km, deslocando-se em função da disponibilidade de suas presas e em profundidades inferiores à isóbata de 200 m (WILLIAMS, 1995; STOKES; BOERSMA, 1998; PUTZ et al., 2000, 2007; STOKES et al., 2014). Durante este período, as aves permanecem dia e noite no mar, repousando em mar aberto. Seu comportamento social durante o período migratório é variável, havendo a ocorrência de indivíduos solitários, de grupos pequenos compostos de dez a 30 animais ou de grandes grupos com mais de uma centena de indivíduos (STOKES; BOERSMA, 1999).

Durante seu deslocamento em direção ao norte, diversos desafios de origens distintas são enfrentados pelos pinguins. Alguns fatores têm sido apontados como

particularmente importantes na debilidade e mortalidade dos pinguins-de-Magalhães durante seu deslocamento invernal, entre eles a contaminação crônica do oceano com petróleo e derivados (LUNA et al., 2002; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006), os acidentes com redes de pesca (TASKER et al., 2000; LUNA et al., 2002; CARDOSO et al., 2011), a ingestão de itens sintéticos (PETRY; FONSECA, 2002) e parasitoses gastrointestinais (FONSECA; PETRY; JOST, 2001). Embora ainda exista em quantidade significativa, a espécie é particularmente sensível à presença humana, e a maioria das populações monitoradas mostrou declínio nas últimas décadas (YORIO et al., 1999; SCHIAVINI et al., 2005; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012; BOERSMA et al., 2013).

Sua sensibilidade particular aos impactos ambientais antropogênicos torna os pinguins importantes sentinelas para a saúde dos sistemas costeiros, que por questões logísticas são difíceis de monitorar frequentemente (STOKES; BOERSMA, 1999; YORIO et al., 1999; LUNA et al., 2002; BOERSMA, 2008). Desta forma, as principais ameaças à conservação da espécie em vida livre são a competição por recursos alimentares com a pesca comercial, a captura acidental em redes de pesca, a poluição crônica por petróleo e as mudanças climáticas (YORIO et al., 1999; TASKER et al., 2000; LUNA et al., 2002; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010; BOERSMA, 2008; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012).

Em decorrência das ameaças acima descritas, centenas a milhares de encalhes são registrados anualmente em praias brasileiras, sugerindo que o nosso litoral seja uma importante área de ocorrência e de mortalidade da espécie (PETRY; FONSECA, 2002; CEMAVE, 2010). A ampla maioria dos indivíduos registrados na costa brasileira são juvenis (SICK, 2001; PETRY; FONSECA, 2002; CEMAVE, 2010; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010; STOKES et al., 2014). Em anos recentes há uma tendência aparente do aumento no recebimento destes animais em centros de reabilitação ao longo da costa, com um número de registros cada vez maior no litoral nordestino (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010). Os registros de encalhes no Brasil indicam que há maior mortalidade de fêmeas do que de machos (REIS et al., 2011; VANSTREELS, et al., 2013), tanto dos indivíduos encontrados mortos na praia, quanto daqueles que morreram durante o processo de reabilitação (VANSTREELS et al., 2013).

2.2 ESTRESSE DO CICLO BIOLÓGICO E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Os eventos sazonais mais complexos enfrentados pelos pinguins durante sua vida são o período reprodutivo, a mudança de penas e a migração. O pinguim-de-Magalhães realiza sua muda no período pós-reprodutivo, na sequência do retorno de sua primeira viagem de alimentação após o abandono do ninho, que pode ocorrer desde o final do mês de fevereiro até abril (Figura 3).

Os pinguins são as aves aquáticas mais bem adaptadas de todas, porém sua eficiência hidrodinâmica depende, em parte, da condição de suas penas. As penas são distribuídas uniformemente por todo o corpo, têm comprimento curto e apresentam densidade elevada por centímetro quadrado (WILLIAMS; HAGELIN; KOOYMAN, 2015). Não há região aptérica no pescoço, no tórax ou abdômen, entretanto apresentam uma fenda para incubação. As nadadeiras são cobertas por penas curtas, também em alta densidade. A plumagem ininterrupta é impermeável e retém uma camada de ar entre as filoplumas e a pele, com função termoisolante (WILLIAMS; HAGELIN; KOOYMAN, 2015). Apresentam musculatura bem desenvolvida associada à base das penas, dando habilidade para controlar a altura desta camada de ar, mantendo-a ampla enquanto em terra, maximizando o isolamento térmico ou comprimida durante os mergulhos, evitando prejudicar sua flutuabilidade (KOOYMAN et al., 1976). As penas são mantidas em um arranjo perfeito pelo frequente comportamento de alinhamento, em que o bico é utilizado para obter a secreção da glândula uropígea e espalhá-la sobre as penas, mantendo-as sempre condicionadas e arranjadas em sua posição ideal (KOOYMAN et al., 1976; DAWSON et al., 1999).

A plumagem se desgasta e envelhece ao longo do ano, sendo necessária a sua substituição (ADAMS; BROWN, 1990). Ao contrário de outras aves, os pinguins passam anualmente por um fenômeno conhecido como “muda catastrófica”, isto é, realizam a troca de todas as suas penas de uma única vez, ao invés de trocá-las aos poucos (BROWN, 1986). As penas antigas vão sendo empurradas pelas penas novas que emergem sob a pele, até sua perda mecânica pela remoção com o bico, movimento ou fricção (PENNEY, 1967; BROWN, 1986). No pinguim-de-Magalhães a troca completa ocorre entre duas e três semanas, quando os indivíduos concentram-se em grandes grupos na praia, ou distribuídos pela colônia em seus ninhos. Em

vida livre, este processo está associado a um período de jejum (BOERSMA et al., 2013). Os indivíduos deixam de ir ao mar para alimentar-se provavelmente devido à perda de impermeabilidade das penas, ao atrito aumentado com a água e à diminuição do isolamento térmico, em consequência do emagrecimento (ADAMS; BROWN, 1990). Em cativeiro reconhece-se a anorexia durante a fase de troca das penas, sendo que alguns pinguins atravessam o período sem alimentar-se e outros aceitam alimento em quantidades mínimas - um a dois peixes por dia (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005). A ocorrência de enfermidades crônicas, dermatites, ectoparasitoses, distúrbios nutricionais e outras enfermidades poderão levar ao atraso ou a ocorrência de um processo anormal ou incompleto de muda (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

A mudança anual de penas é reconhecidamente um processo de alto custo energético para os pinguins (PENNEY, 1967; ADAMS; BROWN, 1990). O processo envolve um período de preparação caracterizado por hiperfagia, aumento significativo da massa corpórea (40-70%) e aumento de volume das nadadeiras (PENNEY, 1967). A muda das penas é desencadeada pela melatonina, associada ao fotoperíodo (COCKREM, 1991; BARCELOS et al., 2015), e também por processos hormonais tireoidianos. Em pinguins-rei (*Aptenodytes patagonicus*); pinguins-imperadores (*A. forsteri*) e pinguins-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*), há aumento dos níveis séricos de tiroxina (T_4) durante o período de síntese de novas penas e níveis elevados de triiodotironina (T_3) enquanto perdem as penas antigas (GROSCOLAS; LELOUP, 1986; GROSCOLAS; CHEREL, 1992), com indicações de aumento na termogênese até a substituição total das penas (BOURGEON et al., 2007). A troca das penas está acompanhada pela perda gradual de peso, com grande catabolismo proteico devido ao jejum prolongado, a produção de plumagem nova e o custo energético adicional para manutenção da temperatura corpórea (39-41°C), devido à perda de calor aumentada em consequência da alta vascularização da pele (ADAMS; BROWN, 1990; BOURGEON et al., 2007).

A fisiologia do jejum de pinguins foi extensivamente estudada no pinguim-imperador e no pinguim-rei (GROSCOLAS, 1986; CHEREL et al., 1988a,b; ROBIN et al., 1988b; CHEREL et al., 1994; CHEREL et al., 2005; BOURGEON et al., 2007), sendo também estudada no pinguim-papua (*Pygoscelis papua*) e macaroni (*Eudyptes chrysolopus*) (GHEBREMESKEL et al., 1992; CHEREL et al., 1993; ALONSO-ALVAREZ et al., 2003). A duração do período de jejum durante o período

reprodutivo é amplamente variável entre as espécies de pinguins. Os imperadores tem a habilidade de jejuar por longos períodos que podem variar de um a quatro meses, pinguins-rei por até 54 dias e pinguins-macaroni ao redor de 40 dias (WILLIAMS, 1995). O pinguim-de-Adélia consegue jejuar de dez a 40 dias (ULBRICHT; ZIPPEL, 1994), enquanto que pinguins-papua jejuam por períodos curtos de dois a três dias (CHEREL et al., 1993; ALONSO-ALVAREZ et al., 2003). A alta variabilidade na fisiologia do jejum sugere que existem diferenças espécie-específicas. Para passar por estes longos períodos sem alimentar-se, as aves possuem grande flexibilidade metabólica, consumindo unicamente ácidos graxos voláteis e corpos cetônicos produzidos a partir de triglicerídios. Ao longo do jejum há também elevação gradual de metabólitos proteicos circulantes, por exemplo aminoácidos, uréia e ácido úrico. Esta elevação atinge seu pico no período final da muda, quando os estoques adiposos foram quase totalmente consumidos e o catabolismo proteico acelera-se (GHEBREMESKEL et al., 1992; BOURGEON et al., 2007).

Demas et al. (2011) citam que o sistema imunológico influencia as respostas fisiológicas e comportamentais de vertebrados em seu meio. Parâmetros imunológicos têm sido cada vez mais utilizados na compreensão de aspectos da fisiologia e estratégias ecológicas da fauna selvagem (VINEY; RILEY, 2014). Neste sentido, o estudo da imunidade em um contexto ecológico e evolutivo transformou o campo da biologia dos organismos e criou a disciplina reconhecida atualmente como "imunologia ecológica", ou "ecoimunologia". Essencialmente, a ecoimunologia preocupa-se em estudar por que há variação entre organismos de uma mesma espécie e entre espécies diferentes (MARTIN; HAWLEY; ARDIA, 2011). Hegemann et al. (2012a) citam que a hipótese central da ecoimunologia propõe que as defesas imunológicas sofrem variações ao competir com processos fisiológicos e comportamentais durante as fases e também entre os diferentes estágios do ciclo biológico. A matéria concentra-se em como a função imunológica varia de acordo com parâmetros ecológicos, tais como a presença de parasitas ou de variáveis ambientais, e como as relações ecológicas e evolutivas influenciam genótipos, fenótipos e comportamentos, por meio da aptidão reprodutiva e da capacidade de sobrevivência (BOUGHTON; JOOP; ARMITAGE, 2011; MARTIN; HAWLEY; ARDIA, 2011).

Diversos ecoimunologistas propõem que existe uma variação de compensação entre a função imunológica e os processos que demandam grandes quantidades de energia; por exemplo, a reprodução, a muda ou o crescimento, pois estes processos críticos muitas vezes competem por recursos energéticos. São diversos os estudos que documentam estas variações em diversas espécies animais (MARTIN et al., 2003, 2006a; MARTIN, 2005; FRENCH; DeNARDO; MOORE, 2007), inclusive em pinguins (MORENO et al., 1998, 2002; TELLA et al., 2001; EVANS; DANN; FRANKEL, 2015). Bourgeon et al. (2007) sugerem que os pinguins são um modelo útil de estudo desse tipo de compensação, pois não executam essas atividades de maneira concomitante. A complexidade da combinação de todos esses processos sugere que o período da muda é também um momento de vulnerabilidade imunológica devido à grande demanda energética para a síntese de novas penas (DEMAS; DRAZEN; NELSON, 2003; MARTIN, 2005). E ao mesmo tempo que estas compensações fisiológicas entre a reprodução, a muda e a função imunológica têm sido documentadas (MORENO et al., 2002; HEGEMANN et al., 2012a), os seus mecanismos reguladores precisam ser melhor esclarecidos (FRENCH; DeNARDO; MOORE, 2007; MARTIN, 2009; HEGEMANN et al., 2012b), já que são diversos os fatores que podem contribuir nas variações imunológicas, inclusive as condições ambientais (HEGEMANN et al., 2012a).

Há uma ampla disponibilidade de ferramentas imunodiagnósticas que podem ser aplicadas no estudo detalhado desse prejuízo imunológico em animais selvagens, porém uma gama limitada é utilizada a campo. Devido à complexidade do sistema imune, Salvante (2006) critica os estudos que utilizam medidas únicas para a avaliação da função imunológica das aves, sugerindo que medidas combinadas sempre devem ser utilizadas e em diferentes momentos do ciclo biológico anual. Salvante (2006), Boughton et al. (2011) e Demas et al. (2011), discorrem sobre as técnicas disponíveis para utilização nas diversas espécies de vertebrados selvagens a campo. Neste sentido, os estudos na área de ecoimunologia tradicionalmente utilizam, muitas vezes como método único para a avaliação da imunidade, os ensaios de hipersensibilidade cutânea tardia, como por exemplo, o teste da fitohemaglutinina (FHA). Por mais que este ensaio seja informativo e ocupe um lugar importante, é imprescindível que a função imunológica seja avaliada lançando mão de diversas técnicas imunológicas com o objetivo de estudar os diferentes aspectos da resposta imune, para que a representação da

imunocompetência individual seja mais abrangente (DEMAS et al., 2011). A avaliação da resposta imune de mamíferos geralmente é feita por meio do estudo da resposta humoral e celular. Contudo, em geral, nas aves existe uma maior compreensão da resposta imune celular do que humoral devido a limitações técnicas, relacionadas à disponibilidade de reagentes no mercado. Por esse motivo, no presente projeto, visamos a análise da resposta imune celular, tanto da resposta imune inata como da adaptativa. A figura 4 ilustra os componentes do sistema imune e algumas das técnicas viáveis para análise da resposta imunitária inata e adaptativa de vertebrados.

Figura 4 - Representação do sistema imunológico, seus componentes e exemplos de técnicas possíveis de serem utilizadas na avaliação de sua função

Fonte: (Criado e modificado à partir de BOUGHTON et al., 2007).

O *burst* oxidativo é uma ferramenta utilizada para a avaliação da resposta imune inata de indivíduos (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989). O "*burst*" oxidativo ou "explosão" oxidativa de leucócitos é um fenômeno metabólico decorrente da transferência de elétrons do complexo NADPH oxidase (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato reduzido oxidase) intracelular formando radicais

livres reativos em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos. Este fenômeno é desencadeado nos fagócitos (monócitos/ macrófagos; neutrófilos/ heterófilos) após a fagocitose de microorganismos ou por ativação direta da proteína cinase C (PKC) (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989). O complexo NADPH é um sistema enzimático que catalisa a doação de um elétron ao oxigênio molecular transformando-o em superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio (BJORKMAN et al., 2008). A NADPH oxidase pode ser ativada tanto por meio de receptores, pelo reconhecimento de fragmentos microbianos, como por mecanismos independentes de receptores como o diacilglicerol (DAG) e ativadores de PKC análogos ao DAG, como por exemplo, o acetato de forbol miristato (PMA) (BOKOCH, 1995; CHIURCHIU; MACCARONE, 2011). A ativação dos fagócitos leva à fosforilação, ativação e associação dos componentes deste complexo enzimático. Os componentes fosforilados migram para a membrana plasmática e associam-se aos citocromos, que iniciam o funcionamento do sistema (DANG; CROSS; BABIOR, 2001), formando uma rede de transporte de elétrons transmembrana, resultando na oxidação do NADPH e na geração de superóxido na superfície externa da membrana. A formação de espécies reativas do oxigênio atuam na oxidação de componentes presentes nos microorganismos, gerando compostos tóxicos e atuando na morte dos patógenos (WINTERBOURN; KETTLE, 2012).

O fenômeno de reconhecimento, ligação à superfície das células e englobamento de microorganismos ou partículas, conhecido como fagocitose, é um processo que desencadeia a digestão destas partículas por meio da formação do fagolisossomo e da produção de espécies reativas de oxigênio (*burst* oxidativo) (BABIOR, 2000). A avaliação da fagocitose pode ser utilizada como um meio analítico direto da função celular, assim como a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio por fagócitos (STUART; EZEKOWITZ, 2008).

A imunofenotipagem é uma técnica que pode ser definida como um processo utilizado para diferenciar e classificar células semelhantes, baseado nos tipos de antígenos ou marcadores presentes na superfície celular (FAIR et al., 2012). A técnica é amplamente utilizada para humanos e roedores e mais recentemente está sendo utilizada na avaliação da função imunológica de galinhas (FAIR et al., 2008). A utilização da citometria de fluxo para a imunofenotipagem, ou seja, a identificação de subpopulações de linfócitos no sangue, aumentou tanto a sofisticação quanto a precisão das avaliações de imunocompetência das aves. Por meio da obtenção de

sangue periférico e da citometria de fluxo, populações de linfócitos T podem ser subdivididas com base na expressão de proteínas na superfície celular (FAIR et al., 2008). Linfócitos expressam variedades distintas de moléculas em sua superfície celular, estas refletem diferentes fases de diferenciação de sua linhagem específica ou diferentes estados de ativação ou inativação. Estas moléculas são rotineiramente detectadas por meio da utilização de anticorpos monoclonais anti-leucócitos. Anticorpos monoclonais específicos são ferramentas críticas para a imunofenotipagem e podem ser marcados à partir da conjugação com fluoróforos. Por meio da utilização de diferentes combinações de anticorpos monoclonais é possível identificar os imunofenótipos da superfície celular de subpopulações de leucócitos com funções imunológicas distintas, incluindo os linfócitos B, T auxiliares, T citotóxicos e *natural killer* (NK) (FAIR et al., 2008, 2012).

As moléculas dos Grupos de Diferenciação (*clusters of differentiation* - CD) são marcadores de superfície celular utilizados na identificação do tipo, estágio de diferenciação e atividade de um linfócito T. As moléculas CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ são as mais comuns de serem referenciadas e marcam linfócitos pan-T, T auxiliares, e T citotóxicos, respectivamente (FAIR et al., 2012). Nos últimos anos, as células T de mamíferos têm sido estudadas intensamente, resultando na melhor compreensão da sua especialização funcional, comunicação com as citocinas e sua diferenciação em subpopulações. Apesar disso, as funções e características das células T $\gamma\delta$, bem como seus mecanismos de reconhecimento de antígenos, ainda são controversos e não totalmente compreendidos (PIEPER; METHNER; BERNDT, 2008). Assume-se que estejam envolvidos na defesa imunitária aos agentes infecciosos, devido ao aumento de seu número em pontos de infecção bacteriana, viral ou parasitária, devido às suas atividades citolíticas e capacidade de produção de citocinas (PIEPER; METHNER; BERNDT, 2008). Linfócitos T são críticos no controle de patógenos, e devido à sua importância na resposta a microrganismos em vertebrados, são considerados cruciais na avaliação do sistema imunológico das aves (BOUGHTON; JOUP; ARMITAGE, 2011; FAIR et al., 2012).

Muito provavelmente devido às dificuldades logísticas e ao curto período de tempo necessário para a análise de amostras utilizando a técnica da citometria de fluxo, não foram identificados trabalhos que tenham realizado estudos com a imunofenotipagem ou a citometria de fluxo com pinguins.

Além da avaliação da frequência de linfócitos T circulantes por meio da técnica de imunofenotipagem, uma outra abordagem utilizada na avaliação da função celular de linfócitos especificamente, é o ensaio de linfoproliferação a mitógenos (SITZ; BIRX, 1999). Este ensaio tem sido utilizado na avaliação de imunodeficiências congênitas e adquiridas. Em termos comparativos, quando *in vitro* utiliza-se a linfoproliferação na avaliação da qualidade da resposta de linfócitos, enquanto *in vivo* utiliza-se o ensaio de hipersensibilidade tardia. Este ensaio avalia a habilidade de proliferação dos linfócitos circulantes ou daqueles presentes nos órgãos linfoides secundários, em resposta a mitógenos inespecíficos ou estímulos antigênicos. Estes estímulos desencadeiam uma resposta linfoproliferativa que pode ser mensurada pela incorporação de timidina radiomarcada ou por técnicas mais modernas por exemplo, as técnicas citométricas (SITZ; BIRX, 1999).

O estresse em animais é claramente um fator importante a ser considerado ao avaliar o bem-estar de indivíduos cativos ou selvagens. Na definição integrada de Dhabhar e McEwen (1997), estes autores sugerem que o estresse é uma constelação de eventos que consiste de: um estímulo (estressor), que precipita uma reação no cérebro (percepção do estresse), que aciona os sistemas fisiológicos de luta-ou-fuga (resposta ao estresse). Embora uma grande diversidade de fatores estejam envolvidos, os principais mediadores dos efeitos de estresse são a liberação de adrenalina e noradrenalina pelo sistema nervoso simpático; e hormônio liberador da corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e o cortisol, que surgem após a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DHABHAR, 2014). Porém o estresse agudo, que dura desde alguns minutos até algumas horas, tem efeitos distintos daqueles do estresse crônico, de longa duração que persiste por diversas várias horas ao dia, por semanas ou meses. Há também diferenças individuais significativas na percepção do estresse, seu processamento e tolerância, sendo que estas podem ter ligação com fatores tanto genéticos quanto ambientais. A magnitude e a duração do aumento das catecolaminas e hormônios glicocorticóides induzidos pelo estresse podem ter efeitos significativos na distribuição de células imunológicas e sua função (DHABHAR, 2002, 2014).

Um dos métodos mais comuns para a avaliação do estresse fisiológico é a medição dos níveis plasmáticos de glicocorticóides, como a corticosterona (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). Os níveis de corticosterona aumentam rapidamente após a captura de animais selvagens, sendo que autores sugerem que a colheita de sangue

para sua análise deva ser realizada em menos de três minutos (ROMERO; REED, 2005). Assim como indicado pelo estudo de Dhabhar et al. (1995) utilizando camundongos, o estresse e o tratamento com glicocorticóides provocam alterações na distribuição de células do sistema imunológico, especificamente no aumento do número de neutrófilos (neutrofilia) e na diminuição no número de linfócitos (linfopenia), influenciando na habilidade do sistema a responder aos desafios imunológicos potenciais. Para as aves também foi demonstrado que o mesmo fenômeno ocorre, havendo alterações nos perfis leucocitários, com heterofilia e linfopenia (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). Diversos autores (VLECK et al., 2000; DAVIS et al., 2008; DEHNHARD et al., 2010, 2011) apresentam a hipótese de que as contagens relativas de leucócitos são um método relevante para medir o estresse, de acordo com a relação heterófilo: linfócito. Vleck et al. (2000) e Davis et al. (2008) sugerem que este pode ser um método alternativo às medições plasmáticas de corticosterona em animais selvagens, pois esta causa mudanças características nos componentes leucocitários que podem ser quantificados e relacionados com os níveis hormonais.

2.2.1 Manejo em cativeiro

O sucesso na manutenção de coleções zoológicas compostas por pinguins está intimamente ligado às condições ambientais oferecidas. Assim como para qualquer espécie mantida em cativeiro, é necessário considerar suas características biológicas e necessidades ambientais para manutenção tanto de sua saúde, quanto de seu comportamento natural e de sua integridade física e mental (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005).

Os requisitos fundamentais para o êxito na manutenção dessas espécies em cativeiro são: disponibilidade de área seca com substrato adequado para o descanso e construção de ninhos, disponibilidade de piscina, manutenção da temperatura ambiente estável (para a maioria das espécies em recintos fechados) e ventilação adequada. A única espécie de pinguim atualmente mantida em cativeiro no Brasil é o pinguim-de-Magalhães e sua manutenção deve seguir os

procedimentos indicados pela Instrução Normativa Nº 4, de 4 de março de 2002, do IBAMA (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Citando características específicas das necessidades das instalações, estas devem proporcionar área coberta para abrigo, protegida do vento, frio e sol excessivos. A piscina poderá ser de água salgada ou doce e ter sistema de filtragem e limpeza constantes. Os recintos podem ser ao ar livre ou fechados, dependendo das espécies a serem mantidas. Os ambientes devem ter piso liso, de material não-abrasivo e de fácil higienização, para a prevenção de pododermatites (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2014). A exposição a um fotoperíodo consistente é essencial para a promoção do comportamento reprodutivo e estimular o ciclo natural da muda (DAWSON et al., 2001). A Associação Americana de Zoológicos e Aquários (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2014) relata melhora no êxito reprodutivo ao variar a extensão do ciclo de luz do dia ao longo do ano, por meio do aumento e diminuição da intensidade da iluminação artificial em recintos fechados. Este procedimento pode ser empregado pela utilização de um sistema de *timers*, reproduzindo assim o ciclo circadiano que ocorreria no hábitat natural da espécie em questão.

Pinguins são aves pesadas e não possuem características anatômicas para permanecer longos períodos exercendo pressão com seu peso sobre as patas. As pododermatites, também conhecidas como *bumblefoot*, são dos problemas clínicos mais prevalentes e debilitantes em pinguins mantidos em cativeiro, seja tanto durante seu período de reabilitação, quanto na manutenção permanente. As pododermatites são lesões plantares de origem bacteriana decorrentes de microvesículas formadas pela pressão do peso corpóreo sobre os pontos de apoio das patas. O processo inicia-se por meio de edema local e sensibilidade dolorosa, que gradualmente evoluirá para ulceraração da pele e uma massa de consistência firme e coloração amarelada. Suas consequências incluem tendossinovite ou osteomielite, algumas vezes com anquilose do membro; quando não tratada pode evoluir para septicemia, levando à morte (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014). Alguns autores sugerem que a etiologia aparenta estar relacionada à invasão por coccobacilos Gram positivos anaeróbios facultativos (*Staphylococcus aureus* e, secundariamente, *Corynebacterium* sp., sendo que em quadros septicêmicos evidenciou-se o envolvimento de *Streptococcus* spp.) (OSORIO et al., 2013). Nos casos crônicos, a resposta inflamatória prolongada poderá levar ao quadro de

amiloidose, com o acúmulo de substância amilóide em fígado, rins e articulações, tornando-os pálidos e de consistência firme e prejudicando suas funções (CRANFIELD, 2003). Para a prevenção da ocorrência de lesões por pressão é recomendável a utilização de pedras arredondadas e de tamanho médio, pois forçam o indivíduo a apoiar-se em diferentes posições. Capachos macios de látex também são amplamente utilizados para diminuir a pressão do peso corpóreo sobre as patas, sendo o estímulo à natação, pelo enriquecimento ambiental e criação de correntezas artificiais, o melhor método na prevenção deste tipo de lesões (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Os pinguins são aves extremamente sensíveis à aspergilose e os seus locais de manutenção devem ser muito bem ventilados. A aspergilose é uma doença associada à mortalidade de pinguins quando em cativeiro, seja em zoológicos ou aquários quanto em reabilitação (AINSWORTH; NEWELL, 1949; SILVA-FILHO et al., 2015). É causada por fungos do gênero *Aspergillus* spp., sendo a *A. fumigatus* o mais patogênico para pinguins. Ubiquitário, oportunista e de distribuição mundial, o fungo costuma estar presente em material orgânico em decomposição ou úmido. A doença ocorre após a inalação de conídios, que se alojam primariamente no sistema respiratório. Em aves suscetíveis, como por exemplo filhotes, animais debilitados ou imunossuprimidos, a progressão da doença pode ser rápida, resultando em alta morbidade e mortalidade (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005). Os sintomas da doença, apesar de inespecíficos, incluem dispnéia, tosse, respiração com mau cheiro, perda da vocalização, anorexia, letargia, perda de peso e isolamento do grupo. Estertores são raramente detectados, e exames complementares como a radiografia e hematologia podem auxiliar no diagnóstico. A presença de heterófilos tóxicos pode ser considerada altamente sugestiva de infecção por *Aspergillus* spp., podendo ocorrer heterofilia e monocitose. Lesões *post mortem* incluem aerossaculite e pneumonias de aspecto granulomatoso com a formação de colônias fúngicas no trato respiratório (CACCIUTTOLO et al., 2009; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Outra afecção de morbidade e mortalidade importantes que acomete pinguins mantidos em cativeiro é a malária aviária. Diferente da aspergilose, que está associada a recintos fechados, a malária aviária está diretamente relacionada com animais mantidos em recintos abertos. Esta hemoparasitose é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. que necessitam de vetores para sua

transmissão, o mais comum são os mosquitos do gênero *Culex* (VANSTREELS; BRAGA; CATÃO-DIAS, 2016). A malária tem distribuição mundial e ocorre de acordo com a disponibilidade de vetores, sendo o agente de maior prevalência e mortalidade é o *Plasmodium relictum*, enquanto o *P. elongatum* também pode estar envolvido (VANSTREELS; BRAGA; CATÃO-DIAS, 2016). A doença tem progressão rápida muitas vezes levando à morte súbita. Entre os sinais clínicos estão anorexia, letargia, dispneia e mucosas hipocoradas. O diagnóstico pode ser realizado por meio de esfregaço sanguíneo com a presença do parasita, entretanto a hemoparasitemia pode ser baixa mesmo com a presença do agente. As lesões frequentemente encontradas em necropsias são hepatomegalia, esplenomegalia, intensa congestão pulmonar e hidropericárdio (AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência do ciclo da muda anual de penas em aspectos dos perfis inflamatório e imunológico de pinguins-de-Magalhães mantidos em cativeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da resposta inflamatória cutânea após a inoculação intradérmica de fitohemaglutinina (FHA);
- Análise histopatológica qualitativa e quantitativa na avaliação do infiltrado inflamatório celular que se desenvolveu após a inoculação intradérmica de FHA;

Avaliar os parâmetros clínicos e laboratoriais descritos à seguir nos diferentes momentos (pré-muda, muda e padrão basal) do ciclo biológico anual do pinguim-de-Magalhães:

- O perfil hematológico (hemograma e leucograma), proteínas totais e contagem diferencial de leucócitos;
- Análise da variação da massa corpórea;
- A capacidade de *burst* oxidativo e fagocitose de leucócitos circulantes;
- A imunofenotipagem de leucócitos circulantes;
- A capacidade de proliferação de linfócitos sanguíneos por mitógenos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LICENÇAS

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram realizados de acordo com as normas ditadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por meio dos protocolos CEUA nº 5173210514 e 3421170316.

A “Autorização para atividades com finalidade científica” do Ministério do Meio Ambiente, foi obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o nº 20825.

4.2 ANIMAIS

Foram estudados 21 pinguins-de-Magalhães adultos (10 machos e 11 fêmeas) que compõem a população em cativeiro permanente do Sabina Parque Escola do Conhecimento, localizado em Santo André, São Paulo (23°40'55" S 46°31'52" W). Todos os pinguins estudados foram reabilitados após seu encalhe no litoral paulista, ainda como juvenis (<1 ano de idade) e foram transferidos ao Sabina por centros de reabilitação mais de cinco anos antes de início deste estudo.

Os critérios de exclusão para o presente estudo foram considerados após exame clínico para a avaliação da condição corpórea, graduação de pododermatites, presença de picadas de mosquito e o momento individual em relação à muda anual de penas. Indivíduos que participaram ativamente da temporada reprodutiva, com seleção de parceiro, ocupação de ninho e nascimento de filhotes não foram incluídos neste estudo para não interferir no cuidado parental. Foram excluídos os indivíduos que já haviam iniciado a muda, aqueles com pododermatites graves e em fase de cuidados de filhotes.

4.3 MANEJO

O recinto de exposição dos animais no Sabina Parque Escola do Conhecimento, em Santo André – SP, possui uma área total de 144 m², incluindo área seca de 33 m² e piscina de água salgada de 81 m², com 110.000 L (Figura 5). A área seca apresenta dois ninhos fixos na cenografia e quatro ninhos móveis, que foram adicionados posteriormente, devido às necessidades de ocupação dos casais que se formaram ao longo dos anos. O piso é liso, sendo algumas áreas cobertas por capacho de vinil ou grama sintética, com o objetivo de prevenir a ocorrência de pododermatites. Os protocolos de manutenção dos animais são compatíveis com os descritos por Silva-Filho e Ruoppolo (2014), com os pinguins sendo alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia. Sua alimentação é composta por sardinha, chicharro e manjuba, sendo suplementada diariamente com multivitamínicos e tiamina, tendo acesso à piscina em tempo integral.

Figura 5 - Piscina do recinto de exposição do Sabina Parque Escola do Conhecimento, em Santo André, SP

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

O fotoperíodo de manutenção é compatível com o paralelo 45°S de latitude. O fotoperíodo é mantido pela combinação de luz natural durante todo o ano, com a adição de lâmpadas de descarga de alta intensidade (iodeto de quartzo *hydrargyrum* - HQI) no verão, controladas por um cronômetro. Os períodos de luz variam de 9:30 a 15 horas de luz, sendo alterados quinzenalmente. A tabela 1 apresenta o manejo do fotoperíodo utilizado durante o ano no recinto.

Tabela 1 - Mudanças no fotoperíodo do recinto dos pinguins do Sabina Parque ao longo do ano

Data	Fotoperíodo	Total de horas de luz
31/jan	5:00 - 19:30	14 h 30'
10/fev	5:30 - 19:30	14 h
24/fev	6:00 - 19:30	13 h 30'
3/mar	6:15 - 19:00	12 h 45'
17/mar	6:30 - 18:30	12 h
1/abr	7:00 - 18:15	11 h 15'
14/abr	7:30 - 18:00	10 h 30'
1/mai	8:00 - 18:00	10 h 30'
15/mai	8:30 - 18:00	9 h 30'
1/ago	8:00 - 18:00	10 h
15/ago	8:00 - 18:00	10 h
1/set	7:30 - 18:15	10 h 45'
15/set	7:00 - 18:30	11 h 30'
1/out	6:30 - 18:45	12 h 15'
13/out	6:00 - 19:00	13 h
3/nov	5:30 - 19:15	13 h 45'
17/nov	5:00 - 19:30	14 h 30'
1/dez	5:00 - 20:00	15 h

Fonte: (Sabina Parque Escola do Conhecimento – DOMATO-RIBEIRO, J., 2015).

4.4 CLASSIFICAÇÃO DO PERÍODO DA MUDA

Com a finalidade de padronizar os momentos para a colheita de material biológico, fez-se a seguinte classificação do momento individual em relação à muda anual de penas: 1. Pré-muda (PM): -5 a 0 dias da muda. Momento caracterizado

pela presença de hiperfagia, aumento significativo da massa corpórea, aumento do volume das nadadeiras e presença de penas eriçadas; 2. Muda (M): 10º ao 21º dia da muda. O princípio da muda foi considerado a partir do início da queda de penas; 3. Padrão basal (B): mais de 120 dias após o início da muda.

4.5 EXAME CLÍNICO E COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO

4.5.1 Exame Clínico

A avaliação do estado clínico geral dos indivíduos utilizados neste estudo foi feita por meio dos seguintes critérios: massa, condição corpórea, grau de pododermatite, presença de picadas de mosquito e a classificação do momento em relação à muda anual de penas.

Os animais foram pesados utilizando-se uma balança digital de plataforma (Filizola® com precisão de 5 g; mínimo 100 g - máximo 15 kg). A condição corpórea foi classificada de 1 a 4, de acordo com Silva e Ruoppolo (2014), sendo o escore 1 considerado o mais magro e o escore 4 como condição corpórea ótima, assim como ilustrado pela figura 6.

Figura 6 - Classificação da condição corpórea de 1 a 4, de acordo com Silva e Ruoppolo (2014)

Fonte: (SILVA; RUOPPOLO, 2014).

O grau das pododermatites, quando presentes, foi classificado como discreto, moderado ou grave, seguindo o critério sugerido por Silva e Ruoppolo (2014). Fez-se a inspeção visual na busca de picadas de mosquitos em regiões de plumagem menos densa ou ausente (periocular, peribucal, nadadeiras e patas). E por último, os indivíduos foram fotografados individualmente com o intuito de documentar sua condição geral, o momento em relação à muda e o grau de pododermatites (Figura 7 – A a F).

Figura 7 - Documentação individual do momento da muda: A- pré-muda; B- pós-muda e C- padrão basal e da presença/ ausência de pododermatites nos mesmos momentos (D, E, F)

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2015).

4.5.2 Colheita de sangue

Devido aos delineamentos experimentais distintos, detalhados no item 5, foram realizados diferentes acessos para as colheitas de sangue, a saber: 1- após obtida a hipnose com anestesia inalatória com isoflurano fez-se a punção

sanguínea da veia braquial (Figura 8) com auxílio de agulha 23G e seringa, sendo retirado o volume entre 1 e 5 mL; 2- sob contenção física, sem anestesia, com auxílio de agulha 21G e seringa o sangue foi colhido da veia jugular direita (Figura 9) ou da metatársica média (Figura 10), no volume entre 2 e 6 mL. As diferenças relacionadas ao acesso venoso se devem ao procedimento da anestesia, uma vez que emprego da máscara no animal sob anestesia inalatória torna o acesso a veia jugular mais difícil. Já na colheita de sangue após a contenção física, sem anestesia, a primeira tentativa de coleta foi sempre a veia jugular direita, devido a maior agilidade no procedimento. Em caso de dificuldades para colher o sangue da veia jugular, como alternativa utilizou-se a veia metatársica média.

O sangue foi acondicionado em tubos do tipo Vacutainer® com heparina e sem reagente para a separação do soro. O sangue foi transportado em isopor sob refrigeração com gelo reutilizável.

Figura 8 - Colheita de sangue através da veia braquial sob anestesia

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2014).

Figura 9 - Colheita de sangue por meio de punção da veia jugular direita

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

Figura 10 - Colheita de sangue por meio de punção de veia metatársica

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

4.5.3 Biópsia tecidual

As biópsias da membrana interdigital das patas direita e esquerda foram necessárias devido ao modelo experimental do teste de hipersensibilidade cutânea tardia à fitohemaglutinina, que será descrito detalhadamente no item 5.1.

Com o animal sob anestesia inalatória, após a assepsia local com álcool iodado, um fragmento de cada pata foi colhido com auxílio de um *punch* descartável de 4 mm (Kolplast CI®). Os bordos da lesão foram aproximados por meio de sutura utilizando fio de nylon 4-0.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

O procedimento histopatológico dos fragmentos colhidos durante a biópsia tecidual foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT-FMVZ-USP), seguindo o protocolo rotineiro de inclusão em parafina, obtenção de cortes de aproximadamente 5 μ m, seguidos de coloração com hematoxilina e eosina (PROPHET et al., 1992).

4.7 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

4.7.1 Hematócrito, proteínas totais, eritrograma, leucograma e contagem diferencial de leucócitos

No laboratório, dois capilares heparinizados foram preenchidos com sangue e vedados para a centrifugação a 16.000 G por cinco minutos. A leitura do hematócrito foi realizada por meio da estimativa visual com régua do percentual de células vermelhas e de células brancas. Após a leitura do hematócrito, extraiu-se uma gota do plasma do capilar, que foi utilizada na determinação da proteína plasmática total por meio de leitura em refratômetro clínico. As amostras de sangue heparinado foram utilizadas para a realização da contagem total de eritrócitos e leucócitos em câmara de Neubauer por meio da técnica de Natt-Herrick (NATT; HERRICK, 1952).

Esfregaços sanguíneos delgados foram preparados colocando-se uma gota de sangue sobre uma lâmina histológica de vidro, imediatamente após a colheita. Com auxílio de uma lâmina de extensão sanguínea, realizou-se o esfregaço deixando uma película de sangue sobre a lâmina. Após a secagem dos esfregaços, já no laboratório, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto e coradas por meio do método de Wright-Rosenfeld (ROSENFELD, 1947), sendo estocadas para a posterior contagem diferencial de leucócitos. A contagem diferencial de leucócitos nos esfregaços foi feita ao microscópio óptico sob magnificação de 1000x, com a contagem de 100 a 200 leucócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos) por esfregaço (CAMPBELL; ELLIS, 2007). O excedente das amostras foi centrifugado e os eritrócitos e o plasma foram congelados para análises posteriores.

4.8 ENSAIO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA À FITOHEMAGLUTININA (FHA)

4.8.1 Preparo da solução de FHA e descrição das fases do ensaio

O ensaio da resposta de hipersensibilidade cutânea tardia à (fitohemaglutinina) FHA baseia-se no fato desta substância ser dotada de propriedades que atraem e proliferam linfócitos, sendo frequentemente utilizada para induzir a resposta imune celular de vertebrados (DEMAS et al., 2011). A FHA é uma proteína (lectina) derivada do feijão *Phaseolus vulgaris*. Dentre as características desta lectina está sua capacidade de ligação a carboidratos, atraindo células sanguíneas, de onde provém sua nomenclatura (KENNEDY; NAGER, 2006). É comumente utilizada como antígeno em ensaios experimentais com o objetivo de mensurar a resposta imune celular de animais, inclusive de pinguins (MARTIN et al., 2006; MORENO et al., 2001; 2002).

No preparo da solução, 5 mg de FHA liofilizada (PHA-P L8754, SIGMA) foram diluídas em 5 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) estéril, alcançando a concentração de 1 mg/ mL, e mantidas sob refrigeração, até o momento do uso. A solução tampão fosfato salina (PBS) foi composta por: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl;

1,44 g de Na_2HPO_4 ; 0,24 g de KH_2PO_4 diluídos em 1 L de água destilada; ajustou-se o pH para 7,4 com HCl e NaOH (0,1M). Após o preparo, a solução tampão foi esterilizada em auto-clave e mantida sob refrigeração (4°C), até o momento do uso.

O procedimento foi realizado em duas fases:

○ **FASE 1**

Previamente à inoculação realizou-se a medição da espessura da região central da membrana interdigital lateral, entre o segundo e terceiro dígitos de ambas patas, utilizando-se um espessímetro digital de pressão constante (Mitutoyo 547-500, com resolução de 0,01 mm) (Figura 11). Foram feitas três medições do local de inoculação e registrados os três valores, tanto na pata direita quanto na esquerda, para cálculo do valor médio diminuindo assim a probabilidade de erro na leitura.

Após as medições das duas patas, a pata direita foi higienizada com algodão embebido em álcool e após a sua evaporação foi inoculada 0,1 mL da solução de FHA. O mesmo procedimento foi realizado na pata esquerda, onde foi inoculada a solução controle constituída de PBS (Figura 12). As medições foram repetidas às 6, 24 e 48 horas.

Figura 11 - Posicionamento e medição da membrana interdigital pré-inoculação utilizando o espessímetro

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

Figura 12 - Antissepsia e inoculação intradérmica da solução na membrana interdigital, na distância média entre os dígitos

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

○ **FASE 2**

Após 6, 24 e 48 horas da aplicação da FHA e do PBS (controle negativo) os animais do estudo, em jejum entre 15 e 24 horas, foram submetidos à anestesia inalatória com auxílio de uma máscara (sem intubação), utilizando isofluorano (Figura 13). Durante o procedimento anestésico foram realizadas as três medições das membranas interdigitais nos locais de aplicação (Figura 14), para determinação dos resultados do teste. Foram obtidas fotografias da superfície ventral de ambas as patas para documentação da presença ou ausência de pododermatites. Após a medição, imediatamente antes da biópsia, visando auxiliar a hemostasia do ponto de amostragem, foram aplicadas compressas frias por meio de bolsas de gelo ou gel (Figura 14) mantidas em freezer (-20°C). As compressas foram aplicadas por 1 a 5 minutos. Durante o resfriamento das patas realizou-se a colheita de sangue e o esfregaço sanguíneo conforme descrito no item 4.7.1.

Figura 13 - A anestesia dos pinguins foi induzida na máscara, utilizando isofluorano

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2014).

Figura 14 - Após a indução da anestesia foram realizadas as medidas com o espessímetro digital e o resfriamento das patas, em auxílio à hemostasia

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

Figura 15 - Realização da biópsia utilizando *punch* cirúrgico

Fonte: (BARTALINI, C., 2014).

Após o registro das medidas, das fotografias das patas e seu resfriamento, foi feita a higienização local com algodão embebido em álcool-iodado e realizada a biópsia de 4 mm do local de aplicação (Figura 15), primeiro da pata direita e depois da pata esquerda, conforme descrito no item 4.5.3, seguidas da sutura (Figura 16). Registrou-se a hora exata da biópsia e o procedimento anestésico durou entre 30 e 60 minutos.

O fragmento de pele foi acondicionado individualmente em tubo Falcon® de 15 mL, identificado com o número do indivíduo, a data e a pata amostrada (direita FHA – tampa laranja/ esquerda PBS – tampa azul) (Figura 16). Os fragmentos ficaram imersos em formol 10% tamponado por 18 horas, sendo transferidos ao etanol 70° para posterior confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H.E.), processadas de acordo com os procedimentos descritos sob o item 4.7 para posterior interpretação histopatológica.

Figura 16 - Apresentação das patas após a sutura e os fragmentos em tubos Falcon® identificados e com tampas de cores diferentes, de acordo com a amostra: FHA tampa laranja e PBS tampa azul

Fonte: (VANSTREELS, R. E. T. V., 2014)

4.8.2 Análise histopatológica

Fotomicrografias dos cortes histopatológicos foram obtidas com um microscópio de luz trinocular (BX50, Olympus - Melville, EUA), equipado com uma câmera digital (Evolution MP Color, Media Cybernetics – Silver Spring, EUA). Uma série de quatro a oito fotomicrografias de alta resolução foram feitas de cada fragmento de biópsia, sob a lente objetiva de 4x. As fotografias foram fundidas em uma única imagem usando o programa AutoStitch (BROWN; LOWE, 2006). A imagem resultante foi avaliada utilizando-se um programa de análise de imagens computadorizado (ImagePro Plus 5.1.2.59, Media Cybernetics), pela determinação da soma de *pixels* contidos em áreas de interesse, definidas manualmente (Figura 17).

Os cortes histopatológicos foram examinados sob aumento de 1000x, em imersão, com o objetivo de qualificar e quantificar os tipos de celulares no infiltrado inflamatório. Para a análise das fotomicrografias dos fragmentos cutâneos, devido ao fato de que os cortes histológicos são compostos por um mosaico de estruturas e células, foram avaliadas quatro categorias de áreas de interesse: (A) aglomerados (*clusters*) de células inflamatórias no fragmento, (B) áreas "vazias" (isto é, o lúmen de vasos sanguíneos e linfáticos) dentro dos aglomerados de células inflamatórias, (C) áreas "vazias" fora dos aglomerados de células inflamatórias, e (D) a totalidade de tecido contido no fragmento (incluindo as áreas ocupadas pelas categorias anteriores). A Proporção de *Pixels* das Células Inflamatórias (PPCI) foi calculada como " $(A-B)/(D-B-C)$ ", isto é, a porcentagem de *pixels* do fragmento cutâneo que foi ocupada por aglomerados de células inflamatórias. Deve-se notar porém, que em PPCI pode estar incluída alguma proporção de tecido conjuntivo e vascular.

Figura 17 - Fotomicrografias compondo o fragmento inteiro da biópsia (H.E., 40x) com suas áreas de interesse delimitadas pelo programa ImagePro Plus para o cálculo da proporção de *pixels* das células inflamatórias (PPCI)

Fonte: (RUOPPOLO, V.; VANSTREELS, R. E. T. V., 2014).

Legenda: A - *Clusters* de células inflamatórias no fragmento; B - áreas "vazias" no lúmen de vasos sanguíneos e linfáticos dentro dos aglomerados de células inflamatórias; C - áreas "vazias" fora dos aglomerados de células inflamatórias; D - a totalidade de tecido contido no fragmento, incluindo as áreas ocupadas por todas as categorias anteriores.

Na análise histopatológica do fragmento cutâneo que quantificou a proporção dos tipos celulares do infiltrado inflamatório, um total de 630 pontos de amostragem foram estabelecidos para cada lâmina (biópsia inteira). Estes pontos de amostragem corresponderam a transectos de 2 μm de comprimento distribuídos uniformemente, sendo que a soma de pontos de amostragem corresponderam a 1.260 μm lineares por lâmina. Todas as células inflamatórias cujo citoplasma ou núcleo tocou esses pontos foram contadas e classificadas em quatro categorias: granulócitos, linfócitos, macrófagos e trombócitos (Figura 18). Os granulócitos foram identificados como sendo células contendo grânulos citoplasmáticos de coloração avermelhada/alaranjada e núcleos multissegmentados. Esta categoria incluiu heterófilos e eosinófilos, uma vez que estas células não exibiram diferenças morfológicas ou de coloração suficientes para serem diferenciadas de maneira segura. Os linfócitos foram identificados como células agranulares circulares, de núcleos grandes e basofílicos que preenchiam praticamente toda a célula. Os

macrófagos foram identificados como células grandes, agranulares e de formato irregular, contendo núcleo basofílico heterogêneo, muitas vezes em “forma de rim”. Os trombócitos foram identificadas como células pequenas, agranulares e densas, contendo pouco citoplasma e apresentando um grande núcleo, fortemente basofílico e homogêneo (HAWKEY; DENNET, 1989; MARTIN et al., 2006; CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009). Os resultados foram considerados como contagens diferenciais e não como contagens absolutas, isto é, como a porcentagem de cada tipo celular em relação ao total de células contadas.

Figura 18 - Identificação das células quantificadas no infiltrado inflamatório dos fragmentos de biópsia (H.E., 1000x)

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2014).

Legenda: G - granulócito (=heterófilo e/ou eosinófilo); L - linfócito; M - macrófago; T - trombócito.

"Delta" foi utilizado referindo-se à subtração do valor do parâmetro da pata inoculada por FHA para a pata que recebeu a inoculação de PBS do mesmo indivíduo. Para cada indivíduo, a contagem histopatológica diferencial de um determinado tipo de célula [granulócitos (=heterófilos e/ou eosinófilos), linfócitos, macrófagos, plaquetas] foi multiplicada pela Proporção de *Pixels* das Células

Inflamatórias (PPCI) da mesma pata, produzindo um Índice de Contribuição Relativa ao Infiltrado (ICRI) para esse tipo específico de célula.

4.9 DETERMINAÇÃO DO "BURST" OXIDATIVO E FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.9.1 Avaliação de *burst* oxidativo e fagocitose

O ensaio de *burst* oxidativo e de fagocitose empregado no atual estudo foi adaptado de Hasui et al. (1989), utilizando-se como estímulos biológicos a bactéria *Staphylococcus aureus*, marcada com o fluoróforo vermelho iodeto de propídeo (SAPI) e a levedura denominada Zymosan marcada com o fluoróforo verde CFSE. Como estímulo químico utilizou-se o éster de forbol (PMA), que é um ativador de PKC. O reagente DCFH-DA se liga às espécies reativas de oxigênio e a leitura da fluorescência verde é positivamente correlacionada com o *burst* oxidativo gerado por meio da fagocitose ou ativação de PKC. A leitura da fluorescência vermelha significa a capacidade das células em realizar a fagocitose da bactéria e a verde da fagocitose de levedura (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989).

Uma bateria de seis tubos foi identificada de A até F para cada animal e cada tubo recebeu uma substância diferente, conforme: **A**= sangue+PBS; **B**= sangue+DCFH; **C**= sangue+ SAPI; **D**= sangue+ DCFH+SAPI; **E**= sangue+PMA e **F**= sangue + Zymosan (*S. cerevisiae*) e foram incubados sob agitação por 40 minutos em estufa a 40°C (Figura 19).

Figura 19 - Amostras em preparação para o ensaio do *burst* oxidativo e de fagocitose

Fonte: (LADTOX-VPT; RUOPPOLO, V., 2015).

A reação foi interrompida com a adição de EDTA (3 mM) gelado e lavagem das células em PBS. Estas foram então submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, Figura 20). Pelo menos 10.000 eventos foram adquiridos.

Figura 20 - Citômetro de fluxo do LADTOX-VPT. 1- local de inserção do tubo das amostras; 2- painel de controle; 3- gráficos de aquisição e análise

Fonte: (LADTOX-VPT; ALVES, G. J., 2011)

Foram consideradas a porcentagem de células que realizaram a fagocitose, bem como a média da intensidade de fluorescência do SAPI nas células positivas (IMF), que significa quantas bactérias foram fagocitadas. Destas análises foi

estabelecido um índice, dividindo-se a IMF pela porcentagem de células que realizaram a fagocitose. Para a aquisição dos resultados utilizou-se o programa Cellquest Pro (BD). Para a análise dos resultados utilizou-se o programa Flowjo versão 7.6.1 (TreeStar). Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD.

A figura 21, ilustra a estratégia de *gates* utilizada para a seleção das populações obtidas para as análises bem como seus histogramas e demonstra o índice de fagocitose de *Staphylococcus aureus* nos diferentes momentos da muda.

Figura 21 - Demonstração da seleção das populações de heterófilos obtidas após *burst* de fagocitose e seus respectivos histogramas

Fonte: (LADTOX-VPT, 2015).

4.10 AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM

4.10.1 Avaliação da imunofenotipagem (análise de marcadores fenotípicos de membrana)

Para avaliação da frequência de linfócitos T circulantes por meio da citometria de fluxo, as células obtidas conforme descrito no item 4.11.2 foram incubadas e marcadas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-linfócito $\gamma\delta$ (Tabela 2). A cada tubo contendo 1×10^5 células em 100 μ L foram adicionados 1 μ L do respectivo anticorpo, mantido no gelo e protegido da luz por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas duas vezes em solução tampão fosfato, ressuspensas em

PBS e submetidas à leitura em citômetro de fluxo. Pelo menos 10.000 eventos foram obtidos de cada amostra. Para a aquisição dos resultados utilizou-se o software Cellquest Pro (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o programa Flowjo versão 7.6.1 (TreeStar). Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD.

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem e proliferação de linfócitos

Especificidade	Isotipo	Clone	Marcação	Fabricante
Mouse anti - <i>chicken</i> CD4	IgG1	CT-4	PE (fluoróforo vermelho)	<i>Southern Biotech</i>
Mouse anti – <i>chicken</i> CD8- α	IgG2b	3-298	Biotinilado	<i>Southern Biotech</i>
Mouse anti – <i>chicken</i> $\gamma\delta$	IgG1	TCR-1	Biotinilado	<i>Southern Biotech</i>
Anticorpo secundário			Streptavidin-APC (fluoróforo azul)	<i>Southern Biotech</i>

Fonte: (LADTOX, 2015).

4.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS POR MITÓGENOS - ENSAIO *IN VITRO*

4.11.1 Obtenção de linfócitos sanguíneos

O sangue periférico total foi diluído em tampão HBSS (Gibco) na proporção 1:1 sendo, em seguida, cuidadosamente transferido sobre a solução de Percoll 58% (Amersham) na proporção 1:1 e submetido à centrifugação de 1280xG, sem freio durante 5 minutos a 23°C para a separação das células mononucleares. Após a centrifugação, as células mononucleares foram coletadas na interfase (entre o plasma e o Percoll) – figura 22 - e lavadas por duas vezes, pela diluição em 10mL de HBBS, seguida de centrifugação a 300xG, por 5 minutos a 4°C com freio. O botão leucocitário foi ressuscitado em 1 mL de RPMI estéril (Gibco) e uma alíquota de 10 μ L foi retirada para realizar a contagem do número de células. A essa alíquota foram adicionados 10 μ L de Azul de Tripán procedido de contagem em câmara de Neubauer para o ajuste celular em cada ensaio.

Figura 22 - Preparação e coleta de células mononucleares para a imunofenotipagem

Fonte: (LADTOX-VPT; RUOPPOLO, V., 2016)

Legenda: As setas indicam a banda de leucócitos

4.11.2 Ensaio de linfoproliferação por citometria de fluxo

O ensaio de linfoproliferação usando o fluoróforo CFSE (carboxifluoresceína) foi baseado no protocolo descrito por Quah e Parish (2010). Este fluoróforo se liga de forma covalente a moléculas intracelulares, portanto, quando uma célula marcada com CFSE entra em divisão, a sua progênie carrega metade do número de moléculas marcadas com este fluoróforo. Desta forma, cada divisão celular consegue ser avaliada medindo-se a diminuição correspondente da fluorescência celular por citometria de fluxo. A entrada do corante na célula é mediada pela forma diacetilada do corante, o diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA, SE). O acetato faz com que o corante fique altamente permeável às membranas, permitindo seu fluxo rápido através da mesma. As esterases presentes na célula clivam os acetatos do CFDA, e, portanto levam à formação do CFSE, que é muito menos permeável e consequentemente fica concentrado no interior célula. Os linfócitos sanguíneos marcados com o fluoróforo CFSE-DA foram semeados em triplicata na concentração de 5×10^4 células/ poço, em placas de 96 poços de fundo

em "U" com ou sem concanavalina A, que é uma substância com potencial mitogênico; as placas foram incubadas em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ e mantidas a 40°C, por 48 horas. Ao final de dois dias as células foram avaliadas por citometria de fluxo. A análise do índice de proliferação foi realizada pelo algoritmo empregado pelo programa Flowjo versão 7.6.1 (TreeStar).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.12.1 Análise estatística dos parâmetros inflamatórios e imunes

Os valores obtidos após a análise dos diferentes ensaios foram transferidos para o programa GraphPad Prism versão 5 para Windows, para análise estatística e confecção de gráficos. Inicialmente, verificou-se o tipo de distribuição dos dados por meio do teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Em seguida, ao terem sido feitas amostragens pareadas ao longo do tempo, variáveis cujo teste demonstrou serem paramétricas, foram analisadas por meio de ANOVA de medidas repetidas, seguido de pós-teste de Tukey. Já as variáveis não-paramétricas foram avaliadas por meio do teste Friedman, seguido de pós-teste de Dunn. Análises de regressão linear foram utilizadas apenas para o ensaio da fitohemaglutinina, com o objetivo de avaliar se as variáveis quantitativas estavam correlacionadas para cada grupo separadamente ou para todos os indivíduos combinados.

Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor que 0,05 em todos os testes.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 - TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA À FITOHEMAGLUTININA (FHA) EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES

O ensaio de FHA foi baseado e adaptado naquele descrito por Martin et al. (2006). Foram utilizados 21 pinguins-de-Magalhães e a amostragem foi realizada entre meados de abril e meados de maio de 2014, quando todos os pinguins selecionados para o estudo haviam completado sua muda anual de penas, com exceção de um indivíduo, que ainda não havia iniciado a muda.

O objetivo deste ensaio foi avaliar a resposta dos pinguins ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia da FHA por meio da análise histopatológica qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório celular. Os 21 animais foram divididos em três grupos para que a colheita da biópsia tecidual e a anestesia ocorressem uma única vez por indivíduo, constituindo-se então os seguintes grupos: grupo 6 h (n= 7 animais); grupo 24 h (n= 7 animais) e grupo 48 h (n= 7 animais). Esses indivíduos foram submetidos ao ensaio de FHA conforme descrito no item 4.8. A colheita e processamento do material biológico (sangue e biópsia), avaliação hematológica, descrição da mensuração das patas e análise histopatológica foram realizadas conforme descrito nos itens 4.5.2, 4.5.3, 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente.

5.1.1 Resultados

O valor da resposta ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia à FHA foi calculado como a diferença na espessura da membrana interdigital, antes e depois de receber a inoculação de FHA às 6, 24 e 48 horas. A tabela apresentada no apêndice A e o gráfico 1 resumem os resultados das medições de espessura da membrana interdigital das patas dos indivíduos estudados, a PPCI e as contagens diferenciais da histopatologia. Houve diferença significativa na espessura de ambas as patas inoculadas com FHA e com PBS, quando comparadas antes da inoculação

e antes da biópsia ($P < 0,015$). As patas inoculadas com PBS e FHA diferiram em espessura após a inoculação no grupo 24 h ($P = 0,002$) e no grupo 48 h ($P < 0,001$), porém não no grupo 6 h ($P = 0,065$). A espessura delta foi diferente entre os grupos ($S = 0,371$; $P = 0,011$; $R^2 = 0,326$), sendo que o Grupo 6 h apresentou o delta significativamente diferente (mais baixo) do que a espessura nos Grupos 24 h e 48 h, enquanto que a comparação não diferiu entre os dois últimos.

A PPCI foi diferente entre as patas inoculadas com PBS e FHA no Grupo 24 h ($P = 0,047$) e aproximou-se de significância no Grupo 6 h ($P = 0,054$), porém não no Grupo 48 h ($P = 0,179$). Delta PPCI não diferiu entre os grupos ($P = 0,40$). As contagens histológicas diferenciais não revelaram diferenças significativas na frequência relativa de granulócitos, linfócitos, macrófagos ou trombócitos entre as patas inoculadas com PBS e FHA em nenhum dos momentos ($P > 0,05$), nem tampouco houve qualquer diferença observada no delta destes tipos celulares entre os grupos ($P = 0,40$).

Para todos os tipos celulares estudados, o ICRI não foi diferente entre as patas inoculadas com PBS e FHA em nenhum dos grupos de estudo; a única exceção foi dos macrófagos, para os quais o ICRI diferiu entre as patas inoculadas com PBS e FHA dos indivíduos do Grupo 24 h ($P = 0,04$; Apêndice A). O delta ICRI não diferiu entre os grupos de estudo para nenhum dos tipos celulares estudados ($P > 0,2$). O gráfico 2 compara o ICRI para cada tipo celular entre os grupos e entre as patas que foram inoculadas com PBS e FHA. Apesar dos basófilos terem sido avaliados em estudos semelhantes (MARTIN et al., 2006), neste estudo não foram observadas quaisquer células que se assemelhassem a basófilos nos cortes histológicos analisados.

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados hematológicos entre os grupos (hematócrito, heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos); com exceção para as proteínas plasmáticas totais ($S = 0,5225$; $P = 0,011$), que foram diferentes (inferiores) no Grupo 6 h do que no Grupo 48 h, enquanto que as proteínas plasmáticas totais do Grupo 24 h não diferiram das dos Grupos 6 h e 48 h. As informações clínicas e resultados da hematologia são apresentadas no Apêndice B.

Não observou-se correlação significativa na análise de regressão linear entre a espessura delta e cada um dos seguintes parâmetros: massa corpórea, hematócrito, proteínas plasmáticas totais, contagem de heterófilos no esfregaço

sanguíneo, contagem de linfócitos no esfregaço sanguíneo, proporção de heterófilos-linfócitos no esfregaço sanguíneo, PPCI da pata inoculada com PBS, PPCI da pata inoculada com FHA, delta PPCI. Da mesma forma, não observou-se nenhuma correlação significativa entre as contagens diferenciais hematológicas e as contagens de células na histopatologia da pata inoculada com FHA para os mesmos tipos celulares (linfócitos), ou os seus tipos celulares correspondentes (heterófilos + eosinófilos em comparação com granulócitos e monócitos em comparação com macrófagos).

Gráfico 1 - Demonstração da progressão da espessura das patas ao longo do tempo, Proporção de Pixels das Células Inflamatórias (PPCI) e contagens diferenciais na histopatologia das patas inoculadas com PBS e FHA. As barras verticais representam o desvio padrão

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016)

Gráfico 2 - Comparação do Índice de Contribuição Relativa ao Infiltrado (ICRI) para cada tipo celular entre os grupos e entre as patas inoculadas com PBS e FHA

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016)

Legenda: FHA – Fito hemaglutinina; PBS - solução tampão fosfato salina.

5.2 EXPERIMENTO 2. INFLUÊNCIA DO CICLO DA MUDA ANUAL DE PENAS EM PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES MANTIDOS EM CATIVEIRO

Partindo-se do pressuposto de que o ciclo anual da muda de penas em pinguins pode modular a resposta imunológica e uma vez que os resultados do ensaio da FHA não permitiram uma análise abrangente de parâmetros imunes, o foco no Experimento 2 foi avaliar parâmetros imunológicos específicos ligados tanto à resposta imune inata quanto à atividade de linfócitos à mitógenos em diferentes fases do ciclo da muda.

Para isto, foram obtidas amostras de sangue de 13 pinguins-de-Magalhães pré-selecionados de acordo com seu momento em relação à muda anual de penas.

As amostras de sangue foram colhidas dos mesmos animais em três momentos, na pré-muda (PM: -5 a 0 dias), muda (M: 10° ao 21° dia do início da muda) e padrão basal (B: mais de 120 dias após o início da muda). PM foi determinado por meio do aumento de volume das nadadeiras, penas eriçadas e hiperfagia. O início da muda foi considerado a partir do início da queda de penas; M foi determinado a partir da contagem do primeiro ao décimo quinto dia da muda. O momento basal foi considerado após o período de descanso pós-muda, ou seja, mais de 120 dias após o início da muda. A descrição das características que indicaram a classificação do momento da muda estão descritas no item 4.4. A massa corpórea e fotografias individuais de corpo inteiro e da face ventral das patas dos animais foram obtidas nos três momentos.

Imediatamente após a contenção física, amostras de sangue foram colhidas para o hemograma, leucograma, burst oxidativo, fagocitose, imunofenotipagem e proliferação de linfócitos, conforme os itens 4.5.2, 4.7, 4.9, 4.10 e 4.11.

5.2.1 Resultados

Dentre os parâmetros clínicos avaliados, com relação à massa corpórea verifica-se no gráfico 3 o aumento da massa corpórea no período da pré-muda ($P < 0,0001$). Quanto aos valores das proteínas plasmáticas totais ($P < 0,007$) e hematócrito ($P < 0,001$) verificou-se uma diminuição significativa na pré-muda e muda em relação ao período basal. Nos resultados obtidos para as contagens hematológicas de eritrócitos totais, houve uma diminuição significativa da muda em relação à pré-muda e o basal e da pré-muda em relação ao padrão basal ($P < 0,001$). Para os trombócitos não houve diferenças significativas entre os momentos analisados, assim como para o volume corpuscular médio (VCM). Em relação aos leucócitos totais, verificou-se uma diminuição da pré-muda e da muda em relação ao momento basal ($P < 0,05$) (Gráfico 4 e Apêndice C).

Já nos resultados obtidos nas contagens diferenciais realizadas nos esfregaços (Gráfico 5), para os linfócitos observou-se uma diminuição na porcentagem dessas células no momento da muda em relação ao padrão basal. Em relação à porcentagem de heterófilos e de monócitos não foram verificadas

diferenças significativas. Em relação à porcentagem de eosinófilos verificou-se o aumento ($P<0,0006$) dessas células no período de pré-muda em relação ao momento da muda e padrão basal.

Gráfico 3 - Resultados obtidos na pesagem dos indivíduos (massa) e os valores de proteínas plasmáticas totais na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: Massa em gramas – teste RM-ANOVA-Tukey, *** $P<0,0001$; Proteínas plasmáticas totais – teste teste RM-ANOVA-Tukey, * $P<0,0007$; *** $P<0,001$.

Gráfico 4 - Resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos de hematócrito, eritrócitos totais, trombócitos, e volume corpuscular médio (VCM) na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: Ht% (Hematócrito) - teste RM-ANOVA-Tukey, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; Eritrócitos totais — teste RM-ANOVA-Tukey, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$; Trombócitos e volume corpuscular médio (VCM) — teste RM-ANOVA-Tukey.

Gráfico 5 - Resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos de leucócitos totais e as porcentagens obtidas de linfócitos, heterófilos, eosinófilos e monócitos após contagens diferenciais no esfregaço sanguíneo na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: Leucócitos totais - teste RM-ANOVA-Tukey, ** $P < 0,007$, *** $P < 0,001$; Linfócitos - teste RM-ANOVA-Tukey, * $P < 0,005$; Heterófilos e Monócitos - teste RM-ANOVA-Tukey; Eosinófilos - teste RM-ANOVA-Tukey, * $P < 0,005$; *** $P < 0,001$.

O gráfico 6 ilustra os resultados obtidos após os ensaios de *burst* oxidativo nos períodos da pré-muda, muda e padrão basal. Pode-se observar que em relação ao *burst* oxidativo basal, ou seja, sem estímulo, o gráfico 6-A representa que não foi observada diferença significativa entre os diferentes momentos do ciclo da muda anual de penas ($P=0,58$). Já em relação ao *burst* induzido pelo estímulo biológico

(bactéria - SAPI) ilustrado no gráfico 6-B, observou-se um aumento deste parâmetro nos animais na pré-muda ($P<0,001$) em relação ao momento basal e ao momento da muda anual de penas ($P<0,05$). Em relação aos resultados obtidos após o estímulo químico (éster de forbol – PMA) apresentados no gráfico 6-C, verificou-se apenas o aumento do *burst* oxidativo na pré-muda, em relação à muda anual de penas ($P<0,01$).

Gráfico 6 - Resultados obtidos no *burst* oxidativo basal (A), *burst* com SAPI (B) e *burst* com PMA (C) durante a pré-muda, muda e padrão basal

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: A- *Burst* basal, teste de Friedman, $P=0,5836$; B- *Burst* com SAPI, teste de Friedman-Dunn, * $P<0,05$, *** $P<0,001$; *Burst* com PMA, teste de Friedman-Dunn, ** $P<0,01$; IFM= Intensidade de fluorescência média.

O gráfico 7 ilustra os resultados obtidos nos índices de fagocitose na pré-muda, muda e padrão basal. O gráfico 7-A ilustra que em relação à capacidade de fagocitose de bactérias (SAPI) pelos leucócitos circulantes, observou-se uma diminuição tanto na pré-muda ($P<0,05$) quanto na muda ($P<0,01$) anual de penas em relação ao momento basal. Em relação à capacidade de fagocitose de leveduras

(Zymosan A) apresentada em 7-B, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes momentos da muda anual de penas ($P=0,8273$).

Gráfico 7 - Resultados obtidos para os índices de fagocitose com SAPI (A) e com Zymosan A (B) na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: A- Índice de fagocitose com SAPI, teste de Friedman-Dunn, * $p<0,05$, ** $p<0,01$; B- Índice de fagocitose com Zymosan A, teste RM-ANOVA, $P=0,8273$.

O gráfico 8 apresenta os resultados obtidos na análise dos marcadores fenotípicos de membrana para a avaliação da frequência de linfócitos T circulantes por citometria de fluxo e também a porcentagem de proliferação de linfócitos. O gráfico 8-A evidencia que a imunofenotipagem dos leucócitos circulantes revelou uma diminuição ($p<0,001$) na população de linfócitos T $CD4^+$ dos indivíduos na pré-muda e na muda em relação ao momento basal. Em relação à porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ ilustrada no gráfico 8-B, observou-se uma tendência para diminuição destas células no momento da muda, porém não foram observadas diferenças significativas entre os outros momentos ($P=0,0981$). No gráfico 8-C, em relação aos linfócitos T $\gamma\delta$ não foram observadas diferenças significativas ($P=0,0884$) em nenhum momento da muda anual de penas. Os resultados referentes à capacidade linfoproliferativa a mitógenos estão representados no gráfico 8-D e revelaram um aumento ($P<0,05$) na capacidade dos linfócitos dos animais durante a muda anual de penas em relação aos linfócitos dos animais no momento basal.

Gráfico 8 - Resultados obtidos na imunofenotipagem de linfócitos T circulantes CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), T γδ (C) e capacidade linfoproliferativa na pré-muda, muda e padrão basal de pinguins-de-Magalhães

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Legenda: A - Imunofenotipagem – porcentagem de células CD4⁺ circulantes, teste RM-ANOVA-Tukey, ***P<0,001; B - Imunofenotipagem – porcentagem de células CD8⁺ circulantes, teste RM-ANOVA, P=0,0981; C - Imunofenotipagem - porcentagem de células T γδ circulantes, teste RM-ANOVA, P=0,0884; D - Porcentagem de proliferação de linfócitos, teste de Friedman-Dunn, *P<0,05.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo Experimento 1, após o teste de hipersensibilidade cutânea tardia à fitohemaglutinina, demonstram que ambas as patas inoculadas com PBS e FHA desenvolveram um aumento detectável na espessura da membrana interdigital. Este aumento foi mais proeminente nas patas inoculadas com FHA do que com o PBS, particularmente às 24 e 48 horas após a inoculação. Estes resultados corroboram com estudos anteriores feitos com pinguins (MORENO et al., 1998; 2001; 2002; TELLA et al., 2001).

Enquanto todas as comparações feitas da espessura da membrana interdigital produziram resultados estatisticamente significativos, todos os resultados relacionados ao ICRI e contagens diferenciais na histologia, não apresentaram diferenças significativas na quantidade ou tipo do infiltrado inflamatório induzido pela inoculação de PBS ou da FHA. Este fato deu-se independentemente do tempo decorrido desde o momento da inoculação (6, 24 ou 48 horas), indicando que o infiltrado inflamatório induzido pela inoculação de FHA pode não ser diferente do da aplicação da substância inerte, no caso o PBS. Este resultado contrasta com os de estudos anteriores (MORENO et al., 1998; MARTIN et al., 2006b) e sugere, neste caso, que outros componentes podem ter sido envolvidos no aumento da espessura provocado pela inoculação de FHA. A análise histológica das biópsias neste estudo quantificou mudanças relativas ao invés de absolutas, sendo possível que o aumento na espessura da membrana interdigital devido à infiltração celular pode ter sido ofuscado por uma distensão igualmente intensa do interstício devido ao edema. Neste caso, a FHA não induziu uma resposta com proliferação e/ou infiltração de leucócitos, porém apenas conduziu a uma resposta inflamatória inespecífica derivada da lesão direta e irritação do tecido cutâneo, conforme demonstrado em alguns estudos (VINKLER; BAINOVÁ; ALBRECHT, 2010; VINKLER et al., 2014). Vinkler et al. (2010, 2014) defendem que o contexto imunológico dos resultados proporcionados pelo teste da FHA são altamente complexos e não podem ser interpretados como medida da resposta imunológica adaptativa ou da atividade celular de linfócitos T. Estes autores sugerem que o teste intradérmico da FHA espelha apenas o potencial pró-inflamatório dos indivíduos.

Kuhlman e Martin (2010) documentaram que o cativeiro de curto prazo (um a 30 dias) afetou a redistribuição celular da resposta imune em pardais (*Passer domesticus*), presumivelmente devido ao aumento dos hormônios imunossupressores do estresse (corticosterona) durante os estágios iniciais de adaptação das aves ao cativeiro. Neste estudo, assumimos que os pinguins estavam totalmente adaptados às condições controladas de manejo, devido a comporem a população do Sabina Parque Escola do Conhecimento há mais de cinco anos. Portanto, assume-se que a resposta aos efeitos do estresse por esse motivo, se presentes, sejam menos pronunciadas nos indivíduos estudados (MARTIN, 2009).

Os pinguins deste experimento foram amostrados de maneira randômica após terem completado a sua muda anual de penas (com exceção de um indivíduo); que, assim como na maioria das espécies de pinguins, no pinguim-de-Magalhães ocorre após o término do período reprodutivo. Esta época do ano foi selecionada para a amostragem, pois tanto a temporada reprodutiva quanto a muda são reconhecidas por afetar a resposta inflamatória induzida pela FHA (MARTIN; SCHEUERLEIN; WIKELSKI, 2003; MARTIN, 2005; GREENMAN; MARTIN; HAU, 2005; MARTIN et al., 2006a,b; MARTIN, 2009). Nos resultados hematológicos obtidos entre os três grupos estudados (hematócrito, porcentagem de heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos), não foram observadas diferenças significativas com exceção das proteínas plasmáticas totais, que foram inferiores no Grupo 6 h quando comparado ao Grupo 48 h. De acordo com o relato de outros autores (ADAMS; BROWN, 1990; BOURGEON et al., 2007) e os resultados obtidos pelo Experimento 2, os valores de proteínas plasmáticas totais podem estar diminuídos devido ao catabolismo proteico que ocorre durante o processo de muda, e não necessariamente decorrente do teste de hipersensibilidade cutânea tardia à FHA.

Martin et al. (2006b) examinaram biópsias do local de inoculação de FHA em pardais. Estes autores determinaram que o aumento da espessura cutânea induzido pela FHA envolveu a infiltração intensa de diversos tipos celulares, sendo que a abundância relativa de cada tipo teve seu pico em momentos diferentes: heterófilos e trombócitos apareceram primeiro, seguidos de basófilos e macrófagos. Os linfócitos foram abundantes durante toda a resposta e não apresentaram um pico definido de chegada, sendo que estes autores consideraram que sua infiltração ocorreu à partir da corrente sanguínea, ao invés da ocorrência de proliferação

celular local. Caracteristicamente, a proliferação de células T nas aves leva cerca 72 horas para ocorrer (STADECKER et al., 1977; KENNEDY; NAGER, 2010).

No presente estudo, não foram encontradas evidências para a predominância de qualquer tipo celular ao longo da resposta, sendo que a contribuição relativa dos tipos celulares ao infiltrado inflamatório foi consistente tanto nas patas inoculadas com o PBS quanto nas inoculadas com FHA. Embora o número de indivíduos analisados (n=21) tenha sido baixo para alcançar significância estatística, um discreto aumento na proporção relativa de granulócitos foi observado nas patas inoculadas com FHA após 6 horas, fato que é consistente com o papel desempenhado por estas células na resposta imune inata aguda (CAMPBELL; ELLIS, 2007; CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009). Em fases posteriores (24 e 48 horas), as células mononucleares (linfócitos e macrófagos) tiveram aumento relativo e desempenharam um papel mais importante no infiltrado inflamatório. Dietert¹ et al. (1991 apud MARTIN et al., 2006b, p. 297) citam a existência de numerosas classes de macrófagos em aves domésticas, sendo que alguns tem a capacidade de atrair linfócitos para os locais de infecção e outros tem maior propensão para secreção de citocinas, induzindo respostas de fase aguda sistêmicas. Meltzer e Oppenheim (1977) citam também que na presença de FHA, alguns macrófagos liberam fatores de ativação de linfócitos, provocando a quimiotaxia e a proliferação de linfócitos T de camundongos.

As análises dos resultados obtidos com os granulócitos e linfócitos foram consistentes com os de Stadecker et al. (1977), Martin et al. (2006b) e Vinkler et al. (2010). Neste estudo não foi possível determinar um papel relevante para os trombócitos e basófilos na resposta inflamatória cutânea à FHA. Neste sentido, vale ressaltar que basófilos são muitas vezes difíceis de serem diferenciados de linfócitos ativados e plasmócitos na histopatologia, particularmente sob o aumento de 600x, que foi o utilizado por Martin et al. (2006b) e Vinkler et al. (2010). Em contraste, Stadecker et al. (1977) forneceram evidências indiscutíveis que demonstram a intensa infiltração de basófilos na pele periauricular de frangos após a inoculação FHA. A diferença nos resultados pode ser interpretada como uma indicação de que

¹ DIETERT, R.; K. GOLEMBOSKI, K.; BLOOM, S.; QURESHI, M. The avian macrophage in cellular immunity. In: SHARMA J. M. **Avian cellular immunology**. Boston: CRC Press, 1991. p. 71–96.

a composição do infiltrado inflamatório pode diferir entre as espécies, pode ser influenciada pelo local onde é realizada a inoculação ou ainda, pelo método de inoculação. Fazem-se necessários mais estudos para identificar quais as possíveis causas que contribuem para as diferenças observadas nos resultados obtidos.

É relevante considerar também que adaptações anatômicas e fisiológicas apresentadas pelos pinguins possam ser determinantes na seleção e utilização de métodos de estudos imunológicos. Pinguins apresentam adaptações circulatórias para a termorregulação, com a função de dissipar ou conservar o calor corpóreo tanto na água, quanto em terra. Sistemas eficazes de contracorrente aquecem o sangue de temperatura mais baixa antes de alcançar o coração, o que é crítico para a manutenção da temperatura corpórea central em 39°C. Estes sistemas também esfriam o sangue que se desloca em direção às patas, auxiliando os pinguins a manterem seus pés a baixas temperaturas. A temperatura da pele das patas pode ficar entre 6 e 9°C (WILLIAMS, 1995). Estas adaptações podem ter implicações na migração e metabolismo celulares, assim como na homeostase dos fluidos intersticiais, influenciando os resultados finais de testes cutâneos, tais como o teste da FHA realizado neste estudo.

Tella et al. (2008) demonstraram que uma segunda exposição à FHA pode produzir resultados diferentes dos obtidos na exposição original, sugerindo que a imunidade adaptativa também desempenha um papel no aumento da espessura cutânea induzido pela FHA. Devido ao fato da FHA ser uma substância derivada de uma planta, um fator a ser considerado é se a dieta estritamente carnívora de pinguins pode influenciar a resposta imune à FHA e torná-la diferente do que é observado em aves herbívoras ou onívoras terrestres. Estas considerações, enquanto que meramente especulativas, indicam a necessidade de cautela ao assumir que a validação de uma técnica como o teste cutâneo induzido pela FHA pode ser extrapolada entre espécies e entre localizações anatômicas distintas.

De acordo com a opinião de outros pesquisadores (KENNEDY; NAGER, 2006; MARTIN et al., 2006b; VINKLER; BAINOVÁ; ALBRECHT, 2010; DEMAS et al., 2011), expressa-se preocupação na interpretação simplista de resultados obtidos após a aplicação cutânea de FHA. Enquanto os resultados obtidos neste estudo corroboram que a inoculação de FHA causa o aumento significativo e mensurável da espessura da membrana interdigital de pinguins-de-Magalhães, que é consistentemente maior do que aquele provocado pela inoculação de PBS, não

encontrou-se evidência de que esse aumento seja atribuído a uma população celular específica ou a determinado processo imune. Ao invés disso, os resultados obtidos indicam que o aumento da espessura está relacionado com o incremento uniforme de diversas células inflamatórias no tecido cutâneo e interstício (edema).

Considerando a falta de um padrão histológico definido nos processos inflamatórios induzidos nos locais de inoculação da FHA e do PBS, adverte-se contra a interpretação do aumento (ou falta de) na espessura da membrana interdigital como uma representação da imunidade celular mediada individual. Em caso que exista alguma relação direta entre a intensidade da resposta cutânea induzida pela FHA e a capacidade de resposta imunológica individual de pinguins-de-Magalhães, seus mecanismos ainda precisam ser demonstrados e esclarecidos. É necessário considerar, no entanto, que estudos de campo realizados com pinguins demonstraram que há ampla variabilidade interindividual na resposta ao teste cutâneo induzido pela FHA, e foi possível correlacionar esta variabilidade com o êxito reprodutivo e características individuais (MORENO et al., 1998, 2001, 2002; TELLA et al., 2001).

Estudos futuros, portanto, se beneficiariam do estabelecimento de uma correlação entre o teste da FHA e outros indicadores potenciais da resposta imunológica. Alguns exemplos incluem os estudos hematológicos; a citologia e histologia de tecidos que compõem o sistema imunológico, como por exemplo, a medula óssea ou a bursa de Fabricius; a citometria de fluxo, assim como apresentada por Tella et al. (2008) e Salaberria et al. (2013); a implantação subcutânea de gel (KUHLMAN; MARTIN, 2010), a expressão de citocinas (VINKLER et al., 2010), entre tantos outros exemplos. Estudos similares em outras espécies de aves marinhas também podem proporcionar informações importantes sobre o grau de variabilidade na resposta imunitária e fornecer informações valiosas sobre os impactos indiretos na saúde devido a ações antrópicas, tais como a poluição marinha ou o estresse devido ao turismo, por exemplo, que podem afetar a resposta imune e promover variações na suscetibilidade às doenças.

Na análise dos resultados obtidos pelo Experimento 2, pôde-se observar que houve aumento significativo da massa corpórea dos animais no momento da pré-muda, corroborando com a descrição do período preparatório relatado por Penney (1967), em pinguins-de-Adélia. Este autor descreveu a pré-muda em três estágios, com duração média de cinco dias no total, como: pré-muda I – inicia-se assim que o

pinguim chega em terra de sua última viagem de forrageio em preparação para a muda. O indivíduo apresenta grandes depósitos de gordura subcutânea, biliverdinúria devido ao início do período de jejum e letargia. As penas apresentam-se ressecadas e amarronzadas (duração de 1-2 dias); pré-muda II – há aumento marcante do volume das nadadeiras, sendo que as penas que as recobrem perdem o brilho, ao mesmo tempo que as penas novas iniciam o rompimento do tecido subcutâneo desarranjando as antigas (duração de 1-2 dias); pré-muda III – as nadadeiras adquirem o dobro do volume dorsoventral normal, as penas do corpo apresentam-se arrepiadas, simulando um aparente aumento no tamanho dos indivíduos. Há aumento da vascularização da pele, constatado por meio do sangramento fácil (1-3 dias). No presente estudo, o período considerado para pré-muda também foi de cinco dias e foram observadas todas as características descritas por Penney (1967) durante essa fase.

Com relação aos valores hematológicos, observou-se diminuição significativa dos valores de proteínas totais, do hematócrito, eritrócitos totais e leucócitos totais nos indivíduos durante a pré-muda e a muda. Os valores diminuídos corroboram os efeitos da muda que foram possíveis de observar em informações apresentadas por outros autores. Mazzaro et al. (2013) também observaram que os valores de hematócrito e da contagem total de eritrócitos foram diminuídos durante o período da muda de pinguins-africanos (*Spheniscus demersus*) em cativeiro. Bourgeon et al. (2007) mencionam que apesar da maioria dos pinguins estar adaptada a longos períodos sem alimentar-se, o jejum da muda de pinguins-rei é potencialmente um evento muito estressante, levando-os a uma condição energética crítica. O ciclo da muda (catastrófica) anual de penas nos pinguins está acompanhada pela perda gradual de peso e grande catabolismo proteico, justificando os valores hematológicos diminuídos, devido: 1. período prolongado de jejum/anorexia; 2. produção de aminoácidos para a síntese de plumagem nova; 3. aumento da termogênese, devido à perda de calor aumentada em consequência da perda de penas e a vascularização exacerbada da pele (ADAMS; BROWN, 1990; BOURGEON et al., 2007). Durante a fase de muda, observou-se também eosinofilia. Em pinguins, assim como em outras espécies de aves, o aumento dos valores sanguíneos de eosinófilos pode estar associado a infecções parasitárias e ao dano tecidual (WALLACE et al., 1995; CAMPBELL; ELLIS, 2007). Acreditamos que a eosinofilia presente em nosso estudo durante o período da muda está muito

possivelmente associada à erupção das novas penas, empurrando as antigas, através da pele.

A comparação do atual estudo com indivíduos em vida livre não é simples, pois os indivíduos estudados foram alimentados nos momentos que apresentaram apetite durante a fase de muda. Mesmo que cativos, assim como na natureza, os indivíduos apresentaram anorexia, porém se alimentaram em quantidades mínimas (Apêndice D). Ainda assim, devido à demanda energética aumentada e à ingestão de alimento diminuída, foi possível notar que a perda de peso nos períodos pré-muda e muda não teve forte correlação com a quantidade de alimento ingerido, consequentemente os pinguins perderam peso devido ao seu metabolismo aumentado (Apêndice D). Neste estudo não foram avaliados os valores dos hormônios tireoidianos, porém é conhecido que em pinguins-rei, imperadores e de Adélia os níveis de tiroxina (T_4) estão aumentados no período de pré-muda, enquanto os de triiodotironina (T_3) mostram-se aumentados durante a muda (GROSCOLAS; LELOUP, 1986; GROSCOLAS; CHEREL, 1992). Estas alterações certamente induziram o aumento global do metabolismo dos indivíduos, sendo que as mudanças fisiológicas observadas durante o ciclo da muda interferiram também na modulação dos parâmetros imunológicos individuais e foram sugestivas de terem sido consequência do prejuízo energético sofrido durante a pré-muda e a muda, mesmo em animais mantidos em cativeiro.

Além dos fatores já descritos, considera-se também importante a influência que os hormônios glicorticóides exercem sobre os parâmetros imunológicos, principalmente os leucócitos (DHABHAR et al., 1995). Especificamente, em relação aos resultados observados de leucopenia com linfopenia, estes podem ser possivelmente atribuídos à redistribuição, e não necessariamente à morte, de leucócitos em situações de estresse, segundo descrito por Dhabhar et al. (1994). Estes autores apontam que tal fenômeno pode ser uma vantagem adaptativa do organismo, frente aos desafios imunológicos que os indivíduos enfrentam em situações de estresse. Estes estudos sugerem que a resposta ao estresse agudo direciona os leucócitos a saírem do baço e medula óssea e por meio dos vasos sanguíneos, alcançam a pele e linfonodos, em preparação para o desafio imunológico. Assim, análises histológicas revelaram números significativamente mais altos de leucócitos e o aumento da expressão de genes de citocinas na pele de animais estressados, tanto antes quanto depois da exposição ao antígeno e sugeriu

que a redistribuição de leucócitos induzida pelo estresse foi um dos fatores mediadores da imunidade da pele (DHABHAR; McEWEN, 1996). Estes dados corroboram com aqueles encontrados por Hegemann et al. (2012a,b), que observaram os efeitos de diferentes fases do ciclo biológico sobre parâmetros imunológicos (perfil leucocitário, aglutinação, haptoglobina e massa corpórea) de cotovias (*Alauda arvensis*), quando avaliadas por dois ciclos anuais completos e durante quatro períodos de acasalamento. Estes autores concluíram que a modulação imunológica não é um fenômeno pré-programado que reflete mudanças ecológicas previsíveis. Ao contrário, as condições ambientais variáveis entre os anos provavelmente contribuem para as diferenças imunológicas observadas (HEGEMANN et al., 2012a,b).

Quando optamos por avaliar de maneira mais abrangente alguns parâmetros do sistema imune, foi possível observar que ocorreram mudanças significativas na função de células ligadas à resposta imune mais imediata, como o *burst* oxidativo e a fagocitose, bem como na frequência de células T circulantes e sua atividade funcional frente a um mitógeno. A maior abrangência dessa análise foi possível devido à utilização da técnica de citometria de fluxo. A citometria é uma ferramenta versátil e, mesmo com a restrição de reagentes específicos para a espécie aviária em questão, acreditamos que os ensaios utilizados neste estudo revelaram fenômenos interessantes. Por exemplo, verificou-se o aumento significativo do *burst* oxidativo de leucócitos na pré-muda. Este fato pode ser decorrente de facilitação da via metabólica ligada ao sistema NADPH oxidase, que é ativado pelo reconhecimento de fragmentos bacterianos, ou por mecanismos independentes de receptores (por exemplo, ativadores da PKC como o PMA utilizado neste estudo). Como as espécies reativas de oxigênio agem por meio da oxidação de componentes dos microorganismos, aumentando sua eliminação, é possível inferir que na fase de pré-muda este mecanismo possa ter um saldo positivo na eliminação de patógenos, ou seja, sem prejuízo no balanço energético, uma vez que nesta fase do ciclo anual esta via pode estar facilitada. Esta facilitação pode estar relacionada às mudanças no metabolismo energético, já que a oxidação lipídica é o principal substrato energético de pinguins, uma vez que na fase de pré-muda há grande disponibilidade lipídica no tecido subcutâneo (TEULIER et al., 2012), sendo que este fato pode refletir no parâmetro imune ora avaliado. Nos estudos realizados com pinguins-rei conduzidos por Teulier et al. (2012), os autores constataram uma troca na dinâmica

do metabolismo, com diminuição global na maioria da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos e um aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos. Esta mudança na expressão gênica sugere uma modificação seletiva das vias metabólicas que favoreçam o uso de lipídeos como combustível para sustentação do gasto energético. Esta evidência, em pinguins, sustenta a hipótese de que a modulação da resposta imune celular pode ocorrer em decorrência desta drástica mudança metabólica, podendo acarretar um prejuízo e/ou o favorecimento de certos parâmetros imunes. Já em relação à fagocitose, houve sua diminuição na capacidade dos leucócitos dos animais na fase de pré-muda e muda em relação ao padrão basal, quando o agente utilizado foi bacteriano. Apesar desta diminuição na capacidade de realizar fagocitose, não podemos afirmar que haja um prejuízo na eliminação do agente microbiano uma vez que Evans et al. (2015) verificaram que pinguins-azuis (*Eudyptula minor*) ao início da muda apresentaram um menor número de unidades formadoras de colônias (UFC) no ensaio de morte bacteriana com *E. coli*. Como o ensaio empregado no presente estudo não avaliou a morte bacteriana não podemos afirmar que diminuição na capacidade de fagocitose traga prejuízos na resposta imune global. Entretanto, curiosamente não observou-se essa diminuição na fagocitose de leveduras (Zymosan A) em nenhum dos momentos avaliados. Este último resultado não está completamente compreendido, porém sugerimos que as mudanças entre as vias metabólicas nas diferentes fases do ciclo possam ter influenciado este fenômeno.

Até onde sabemos, este trabalho foi o primeiro a realizar imunofenotipagem em células sanguíneas de pinguins utilizando anticorpos anti-galinha. Em geral, quando não há disponibilidade no mercado de anticorpos espécie-específicos, utiliza-se uma ferramenta do NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA) para a comparação de sequências de DNA disponíveis com os bancos de dados genômicos – conhecido como BLAST ou *Basic Local Alignment Search Tool* - a fim de verificar a semelhança interespecíes do antígeno de superfície em questão. No entanto, para o gênero *Spheniscus* estão disponíveis apenas sequências preditoras para algumas moléculas de superfície de linfócitos T, sendo que a maioria conferiu uma reatividade de mais de 90%, quando comparadas com o gênero *Gallus*. Desta maneira, apesar de entendermos que seria mais prudente confirmar a reatividade cruzada de alguns dos marcadores por meio de outras técnicas, como

por exemplo, a imunofluorescência ou a imunohistoquímica, acreditamos que os valores da frequência dos linfócitos avaliados no presente estudo são próximos aos valores estabelecidos para outras aves.

Em relação à frequência das subpopulações de linfócitos T, a única que sofreu diminuição foi a de linfócitos T CD4⁺. Talvez para os pinguins esta subpopulação de linfócitos seja mais suscetível do que os linfócitos T CD8⁺ e os T γδ aos efeitos da adaptação drástica do metabolismo energético, verificado nas fases de pré-muda e muda. Podemos inferir que este resultado seja decorrente de regulação endócrina sobre a dinâmica dos linfócitos, uma vez que na fase da pré-muda os pinguins sofrem um aumento significativo da massa corpórea, acarretando modificações na termorregulação, na reserva energética, na proteção corpórea contra choques mecânicos e, não menos importante, na modulação endócrina sobre células do sistema imune. Neste sentido, diversos trabalhos mostram que a obesidade está envolvida com a regulação imune por meio de moléculas secretadas pelos adipócitos, como por exemplo a leptina (FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010). O receptor para este hormônio já foi descrito em roedores (PAPATHANASSOGLU et al., 2006) e aves (OKHUBO; HADASHI, 2008; PROKOP et al., 2014), sendo que uma diminuição significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ foi verificada em humanos devido à redução dos níveis de leptina pós cirurgia bariátrica (FATHY; MORSHED, 2014). Com isto, sugere-se que a diminuição na frequência dos linfócitos T CD4⁺ dos pinguins possa ser decorrente da influência do hormônio leptina.

Em consequência, talvez como uma maneira de compensar a diminuição na frequência de linfócitos T CD4⁺ verificada na pré-muda e muda, a atividade de linfócitos T *in vitro* se mostrou aumentada na fase de muda. Nesta fase os indivíduos se encontram em pior condição corpórea e, como visto anteriormente, com a capacidade fagocítica diminuída. Portanto, uma vez comprometida sua primeira linha de defesa (fagocitose), o organismo teria que se adaptar favorecendo algum outro parâmetro com o objetivo de manter certa magnitude de resposta aos desafios patogênicos, mesmo que para isso haja redirecionamento dos recursos energéticos. Se por um lado esta compensação gera um gasto energético, por outro, pode ser uma adaptação evolutiva durante a fase de muda, garantindo a manutenção da vida num momento tão extremo como este enfrentado pelos pinguins.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É válido comentar que são raros os trabalhos que investigam o padrão de resposta imune e/ou inflamatória por meio da comparação de vários índices imunológicos em aves selvagens. Este fato se dá possivelmente devido a dificuldades logísticas, em especial, no que diz respeito à proximidade do local de colheita das amostras biológicas e o laboratório, uma vez que, para a correta interpretação de alguns índices há necessidade do processamento ocorrer no mesmo dia. Desta forma, o presente estudo teve a possibilidade de conciliar um laboratório relativamente próximo ao local de colheita das amostras e que tivesse condições satisfatórias para a efetivação das diferentes técnicas empregadas aqui, conferindo assim, uma análise integrada dos parâmetros clínicos e imunológicos em uma população de pinguins-de-Magalhães mantidos em cativeiro. Até onde é de nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a avaliar diferentes parâmetros imunológicos de pinguins utilizando a técnica de citometria de fluxo para avaliação da resposta imune celular.

De acordo com o que foi observado ao longo deste trabalho, destacamos que o teste de hipersensibilidade cutânea tardia à FHA não demonstrou ser um bom método para a medição da função imunológica individual (função celular) e, portanto, seu uso isolado com esse objetivo não é indicado, sendo necessária uma análise mais ampla para conduzir conclusões. Com essa motivação, partiu-se para uma análise integrada de aspectos da resposta imune celular realizada no presente projeto por meio de parâmetros clínicos e laboratoriais como a massa corpórea e o perfil hematológico, a fagocitose e o *burst* oxidativo, a fenotipagem e a resposta linfoproliferativa. Partindo dessa análise, inferimos que os resultados obtidos sejam reflexos da combinação da regulação endócrina e metabólica que os pinguins enfrentam ao longo das diferentes fases do ciclo da muda de penas, muito características destas espécies de aves marinhas. Os resultados demonstraram que dentro de uma mesma fase do ciclo anual houve contraste da resposta sistêmica conforme o índice estudado, talvez atribuída a diferenças nos níveis de regulação da resposta imune. Ao avaliarmos esta circunstância sob o aspecto do redirecionamento de recursos energéticos de acordo o estágio do ciclo anual, o aumento ou diminuição de um determinado parâmetro imunológico pode ser um

reflexo da pressão evolutiva face a situações extremas, tais como as enfrentadas pelos pinguins durante o ciclo anual da muda de penas. Este fato deve considerar também que alguns parâmetros são mais energeticamente custosos do que outros na manutenção da resposta imune.

Documentou-se que o ciclo da muda reflete em mudanças fisiológicas que impactam nos parâmetros clínicos e imune-inflamatórios dos pinguins-de-Magalhães. Observou-se que devido à demanda energética aumentada e à ingestão de alimento diminuída durante o período de muda, as mudanças fisiológicas vistas durante o ciclo da muda interferiram na modulação dos parâmetros imunológicos. As variações documentadas nestes parâmetros foram sugestivas de terem sido consequência do prejuízo energético sofrido durante a pré-muda e a muda, mesmo em animais mantidos em cativeiro. E, por tratarem-se de resultados advindos de animais mantidos em condições controladas, é possível que a magnitude das interferências ora descritas seja diferente ao avaliar animais em vida livre; uma vez que fatores ambientais tais como a indisponibilidade de alimento e a maior interação com patógenos possam gerar uma demanda energética diferente daquela determinada neste estudo.

Espera-se que os resultados do presente projeto possam contribuir para a melhoria das técnicas de manejo em cativeiro e na reabilitação de pinguins debilitados. Com objetivos para a conservação destas espécies, faz-se desejável alcançar um maior entendimento sobre o alto custo energético demandado pelos indivíduos durante e após a muda de penas e qual sua influência nos parâmetros clínicos, na resposta inflamatória e imunológica. Algo ainda a ser explorado é o período pós-muda, que é o momento pré-migratório dos pinguins-de-Magalhães em direção ao Brasil. Seria útil compreender se esse momento do ciclo os torna mais suscetíveis a infecções e ao parasitismo, influenciando de alguma maneira na propensão aos encalhes no litoral brasileiro durante seu deslocamento invernal.

Em vista dos resultados aqui discutidos, associados à sua relevância clínica, reconhece-se que ainda há diversos trabalhos a serem desenvolvidos na elucidação dos mecanismos precisos que mediam os efeitos da resposta inflamatória e imunológica, metabólica e do estresse, assim como suas ramificações clínicas nas distintas espécies de pinguins.

REFERÊNCIAS

ADAMS, N. J.; BROWN, C. R. Energetics of molt in penguins. In: DAVIS, L. S.; DARBY, J. T. **Penguin biology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 297-315.

AINSWORTH, G. C.; NEWELL, R. E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 59, p. 213–224, 1949.

ALONSO-ALVAREZ, C.; FERRER, M.; VIÑUELA, J.; AMAT, J. A. Plasma chemistry of the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* during fasting periods: a case of poor adaptation to food deprivation? **Polar Biology**, v. 26, n. 14-19, p. 1–6, 2003.

AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION. Penguin Taxon Advisory Group. **Penguin husbandry manual**. 3. ed. Silver Spring: Association of Zoos and Aquariums, 2005. 142 p.

AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION. Penguin Taxon Advisory Group. **Penguin (Spheniscidae) care manual**. Silver Spring: Association of Zoos and Aquariums, 2014. 144 p.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological Defense Mechanisms. the Production by Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 3, p. 741–744, 1973.

BARBOSA A.; ORTEGA-MORA, L. M.; GARCÍA-MORENO F.T.; VALERA, F.; PALACIOS, M. J. Southernmost record of the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* in Antarctica. **Marine Ornithology** v. 35, p. 79, 2007.

BARCELOS, R. P.; FILADELPHO, A. L.; BARONI, S.; GRAÇA, W. J. The morphology of the pineal gland of the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781). **Journal of Morphological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 149–156, 2015.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Spheniscus magellanicus**. The IUCN Red List of Threatened Species, 2012. e.T22697822A37820611. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012-1.RLTS.T22697822A37820611.en>>. Acesso em: 15 maio 2016.

BJORKMAN, L.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; BROWN, K. L.; BYLUND, J. Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease. **Arthritis and Rheumatology**, v. 58, n. 10, p. 2931-2935, 2008.

BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597–607, 2008.

BOERSMA, P. D.; FRERE, E.; KANE, O.; POZZI, L. M.; PÜTZ, K.; RAYA REY, A.; REBSTOCK, G. A.; SIMEONE, A.; SMITH, J.; VAN BUREN, A.; YORIO, P.; GARCIA-BORBOROGLU, P. Magellanic penguin. In: GARCÍA-BORBOROGLU, P. G.; BOERSMA, P. D. (Ed.). **Penguins** – natural history and conservation. Seattle: University of Washington Press, 2013. p 233-263.

BOERSMA, P. D.; REBSTOCK, G.; FRERE, E.; MOORE, M. Following the fish: penguins and productivity in the south Atlantic. **Ecological Monographs**, v. 79, n. 1, p. 59–76, 2009.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signalling and leukocyte activation. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1649-1660, 1995.

BOUGHTON, R. K.; JOOP, G.; ARMITAGE, S. A. O. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. **Functional Ecology**, v. 25, n. 1, p. 81–100, 2011.

BOURGEON, S.; VIERA, V. M.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Hormones and immunoglobulin levels in king penguins during moulting and breeding fasts. **Ecoscience**, v. 14, n. 4, p. 519–528, 2007.

BROWN, M.; LOWE, D. G. Automatic panoramic image stitching using invariant features. **Int J Comput Vision**, V. 74, p. 59–73, 2006.

CACCIUTTOLO, E.; ROSSI, G.; NARDONI, S.; LEGROTTAGLIE, R.; MANI, P. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 6, p. 521–527, 2009.

CAMPBELL, T.; ELLIS, C. K. **Avian and exotic animal hematology and cytology**, 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. 286 p.

CARDOSO, L. G.; BUGONI, L.; MANCINI, P. L.; HAIMOVICI, M. Gillnet fisheries as a major mortality factor of Magellanic penguins in wintering areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 840–844, 2011.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). **Lista das aves do Brasil**. Sociedade Brasileira de Ornitologia. 2015. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 2015.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE AVES SILVESTRES (CEMAVE). **Projeto nacional de monitoramento do pinguim-de-Magalhães *Spheniscus magellanicus***. Cabedelo: CEMAVE, 2010. 34 p.

CHEREL, Y.; CHARRASSIN, J. B.; CHALLET, E. Energy requirements for molt in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. R1182–R1188, 1994.

CHEREL, Y.; FRÉBY, F.; GILLES, J.; ROBIN, J. P. Comparative fuel metabolism in gentoo and king penguins: adaptation to brief versus prolonged. **Polar Biology**, v. 13, p. 263–269, 1993.

CHEREL, Y.; HOBSON, K. A.; BAILLEUL, F.; GROSCOLAS, R. Nutrition, physiology, and stable isotopes: new information from fasting and molting penguins. **Ecology**, v. 86, n. 11, p. 2881–2888, 2005.

CHEREL, Y.; LELOUP, J.; LE MAHO, Y. Fasting in king penguin. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. **American Journal of Physiology**, v. 254, p. R170–R177, 1988a.

CHEREL, Y.; LELOUP, J.; LE MAHO, Y. Fasting in king penguin. II. Hormonal and metabolic changes during molt. **American Journal of Physiology**, v. 254, p. R178–R184, 1988b.

CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2605–2641, 2011.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell, 2009. 184 p.

COCKREM, J. F. Circadian rhythms of plasma melatonin in the Adelie penguin (*Pygoscelis adeliae*) in constant dim light and artificial photoperiods. **Journal of Pineal Research**, v. 11, n. 2, p. 63–69, 1991.

CRANFIELD, M. Sphenisciformes. In: Fowler, M. E.; Miller, R. E. **Zoo and wild animal medicine**, 5. ed. Pennsylvania: W.B. Saunders, 2003. p. 103-110.

DANG, P. M.; CROSS, A. R.; BABIOR, B. M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67phox and cytochrome b558. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 6, p. 3001–3005, 2001.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, n. 5, p. 760–772, 2008.

DAWSON, A.; KING, V. M.; BENTLEY, G. E.; BALL, G. F. Photoperiodic control of seasonality in birds. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 4, p. 365–380, 2001.

DAWSON, C.; VINCENT, J.F.; JERONIMIDIS, G.; RICE, G.; FORSHAW, P. Heat transfer through penguin feathers. **Journal of Theoretical Biology**, v. 199, n. 3, p. 291–295, 1999.

DEMAS, G. E.; DRAZEN, D. L.; NELSON, R. J. Reductions in total body fat decrease humoral immunity. **Proceedings Biological Sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1518, p. 905–911, 2003.

DEMAS, G. E.; ZYSLING, D. A.; BEECHLER, B. R.; MUEHLENBEIN, M. P.; FRENCH, S. S. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. **The Journal of Animal Ecology**, v. 80, n. 4, p. 710–730, 2011.

DEHNHARD, N.; POISBLEAU, M.; DEMONGIN, L.; CHASTEL, O.; NOORDWIJK, H. J.; QUILLFELDT, P. Leucocyte Profiles and Corticosterone in Chicks of Southern Rockhopper Penguins. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 1, p. 83–90, 2010.

DEHNHARD, N.; POISBLEAU, M.; DEMONGIN, L.; QUILLFELDT, P. Do leucocyte profiles reflect temporal and sexual variation in body condition over the breeding cycle in southern rockhopper penguins? **Journal of Ornithology**, v. 152, n. 3, p. 759–768, 2011.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function - the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 785–798, 2002.

DHABHAR, F. S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. **Immunologic Research**, v. 58, n. 2-3, p. 193–210, 2014.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 7, p. 2608–2615, 1996.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 11, p. 286–306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5511–5527, 1995.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; STEIN, M.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Diurnal and stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 8, p. 66–79, 1994.

EVANS, J. K.; DANN, P.; FRANKEL, T. Variation in innate immune function during incubation, chick-rearing and moult in little penguins (*Eudyptula minor*). **Emu**, v. 115, n. 1, p. 63–71, 2015.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L.
Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations:
individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and
Immunopathology**, v. 125, n. 3-4, p. 268–273, 2008.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L.
Immunophenotyping of avian lymphocytes: implications and future for understanding
disease in birds. In: PAUL, E. (Ed.). **Emerging Avian Disease**. Berkeley, CA:
University of California Press: Studies in Avian Biology, 2012. p. 81–90.

FATHY, S. M.; MORSHED, G. Peripheral blood lymphocyte subsets (CD4+, CD8+ T
cells), leptin level and weight loss after laparoscopic greater curvature plication in
morbidly obese patients. **Archives of Medical Science**, v. 5, p. 886–890, 2014.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, P.; NAJIB, S.; SANTOS-ALVAREZ, J.; MARTÍN-ROMERO,
C.; PÉREZ-PÉREZ, A.; GONZÁLEZ-YANES, C.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of
leptin in the activation of immune cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. 1, p.
1–8, 2010.

FONSECA, V. S. S.; PETRY, M. V.; JOST, A. H. Diet of the Magellanic penguin on
the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Waterbirds**, v. 24, p. 290-293, 2001.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; SILVA-FILHO R.
P.; ADORNES, A. C.; CONTE-SENA, D.; VELOZO, R.; KOLEŠNIKOVA, C. M.;
DUTRA, G.; MARACINI, P.; NASCIMENTO, C. C.; RAMOS-JÚNIOR, V.; BARBOSA,
L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast.
Marine Pollution Bulletin, v. 60, n. 10, p. 1652–1657, 2010.

GHEBREMESKEL, K.; WILLIAMS, T. D.; WILLIAMS, G.; GARDNER, D. A. ;
CRAWFORD, M. A. Dynamics of plasma nutrients and metabolites in moulting
macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) and gentoo (*Pygoscelis papua*) penguins.
Comparative Biochemistry and Physiology, v. 101A, n. 2, p. 301–307, 1992.

GREENMAN, C. G.; MARTIN, L. B.; HAU, M. Reproductive state, but not
testosterone, reduces immune function in male house sparrows (*Passer domesticus*).
Physiological and Biochemical Zoology, v. 78, n. 1, p. 60–68, 2005.

GROSCOLAS, R. Changes in body mass, body temperature and plasma fuel levels during the natural breeding fast in male and female emperor penguins *Aptenodytes forsteri*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, p. 521–527, 1986.

GROSCOLAS, R.; CHEREL, Y. How to molt while fasting in the cold: the metabolic and hormonal adaptations of emperor and king penguins. **Ornis Scandinavica**, v. 23, n. 3, p. 328, 1992.

GROSCOLAS, R.; LELOUP, J. The endocrine control of reproduction and molt in male and female emperor (*Aptenodytes forsteri*) and Adelie (*Pygoscelis adeliae*) penguins. **General and Comparative Endocrinology**, v. 63, n. 2, p. 264–274, 1986.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HAWKEY, C. M.; DENNET, T. B. **Comparative veterinary haematology**. Ipswich: W.S. Cowell, 1989. 192 p.

HAWKEY, C.; SAMOUR, H. J.; HENDERSON, G. M.; HART, M. G. Haematological findings in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian Pathology**, v. 14, n. 2, p. 251–256, 1985.

HEGEMANN, A.; MATSON, K. D.; BOTH, C.; TIELEMAN, B. I. Immune function in a free-living bird varies over the annual cycle, but seasonal patterns differ between years. **Oecologia**, v. 170, n. 3, p. 605–618, 2012a.

HEGEMANN, A.; MATSON, K. D.; VERSTEEGH, M. A.; TIELEMAN, B. I. Wild skylarks seasonally modulate energy budgets but maintain energetically costly inflammatory immune responses throughout the annual cycle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36358, 2012b.

KENNEDY, M. W.; NAGER, R. G. The Perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 12, p. 653–655, 2006.

KUHLMAN, J. R.; MARTIN, L. B. Captivity affects immune redistribution to skin in a wild bird. **Functional Ecology**, v. 24, n. 4, p. 830–837, 2010.

LUNA, G.; HENNICKE, J.; WALLACE, R.; SIMEONE, A.; WOLFAARDT, A.; WHITTINGTON, P.; ELLIS, S.; MCGOVERN, M. **Spheniscus penguin conservation workshop**: Final Report. Apple Valley: IUCN/ SSC Conservation Breeding Specialist Group, 2002. 83 p.

MARTIN, L. B., Trade-offs between molt and immune activity in two populations of house sparrows (*Passer domesticus*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n. 6, p. 780–787, 2005.

MARTIN, L. B. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. **General and comparative endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 70–76, 2009.

MARTIN, L. B.; HAN, P.; KWONG, J.; HAU, M. Cutaneous immune activity varies with physiological state in female house sparrows (*Passer domesticus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 4, p. 775–783, 2006a.

MARTIN, L. B.; HAN, P.; LEWITTES, J.; KUHLMAN, J. R.; KLASING, K. C.; WIKELSKI, M. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. **Functional Ecology**, v. 20, n. 2, p. 290–299, 2006b.

MARTIN, L. B.; HAWLEY, D. M.; ARDIA, D. R. An Introduction to ecological immunology. **Functional Ecology**, v. 25, n. 1, p. 1–4, 2011.

MARTIN, L. B.; SCHEUERLEIN, A.; WIKELSKI, M. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 270, n. 1511, p. 153–158, 2003.

MAZZARO, L. M.; MEEGAN, J.; SARRAN, D.; ROMANO, T. A.; BONATO, V.; DENG, S.; DUNN, J. L. Molt-associated changes in hematologic and plasma biochemical values and stress hormone levels in African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 27, n. 4, p. 285–293, 2013.

MELTZER, M. S.; OPPENHEIM, J. Bidirectional amplification of macrophage-lymphocyte interactions - enhanced lymphocyte-activation factor production by activated adherent mouse peritoneal cells. **Journal of immunology**, v. 118, n. 1, p. 77–82, 1977.

MORENO, J.; LEON, A. DE; FARGALLO, J.; MORENO, E. Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. **Oecologia**, v. 115, n. 3, p. 312–319, 1998.

MORENO, J.; POTTI, J.; YORIO, P.; BORBOROGLU, P. G. Sex differences in cell-mediated immunity in the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus*. **Annales Zoologici Fennici**, v. 38, n. 2, p. 111–116, 2001.

MORENO, J.; YORIO, P.; BORBOROGLU, P. G.; POTTI, J.; VILLAR, S. Health state and reproductive output in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Ethology Ecology & Evolution**, v. 14, n. 1, p. 19–28, 2002.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.

OHKUBO, T; ADACHI, H. Leptin signaling and action in birds. **The Journal of Poultry Science**, v. 45, p. 233–240, 2008.

OSÓRIO, L. G.; XAVIER, M. O.; LADEIRA, S. R. L.; SILVA-FILHO, R. P. S.; FARIA, R. O.; VARGAS, G. D. A.; CABANA, A. L.; MELLO, J. R. B.; MEIRELLES, M. C. A. Study of bacteria isolated from the foot pad of *Spheniscus magellanicus* with and without bumblefoot. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 47–54, 2013.

PAPATHANASSOGLU, E.; EL-HASCHIMI, K.; LI, X. C.; MATARESE, G.; STROM, T.; MANTZOROS, C. Leptin Receptor Expression and Signaling in Lymphocytes: Kinetics During Lymphocyte Activation, Role in Lymphocyte Survival, and Response to High Fat Diet in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7745–7752, 2006.

PETERSEN, S. L.; BRANCH, G. M.; AINLEY, D. G.; BOERSMA, P. D.; COOPER, J.; WOEHLER, E. J. Is flipper banding of penguins a problem? **Marine Ornithology**, v. 33, p. 75–79, 2005.

PETRY, M. V.; FONSECA, V. S. S. Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v. 13, p.137–142, 2002.

PIEPER, J.; METHNER, U.; BERNDT, A. Heterogeneity of avian $\gamma\delta$ T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, n. 3-4, p. 241–252, 2008.

PINTO, M. B.; SICILIANO, S. BENEDITTO, A. P. M. D. Stomach contents of the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil. **Marine Ornithology**, v. 35, n. 77-78, p. 1–2, 2007.

PROKOP, J. W.; SCHMIDT, C.; GASPER, D.; DUFF, R. J.; MILSTED, A.; OHKUBO, T.; BALL, H. C.; SHAWKEY, M. D.; MAYS, H. L.; COGBURN, L. A.; LONDRVILLE, R. L. Discovery of the elusive leptin in birds: identification of several “missing links” in the evolution of leptin and its receptor. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92751, 2014.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 274 p.

PÜTZ, K.; INGHAM, R. J.; SMITH, J. G. Satellite tracking of the winter migration of Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* breeding in the Falkland Islands. **Ibis**, v. 142, p. 614–622, 2000.

REIS, E. C.; AIRES, R. M.; MOURA, J. F.; MATIAS, C. A. R.; TAVARES, M.; OTT, P. H.; SICILIANO, S.; LÔBO-HAJDU, G. Molecular sexing of unusually large numbers of *Spheniscus magellanicus* (Spheniscidae) Washed Ashore Along the Brazilian Coast in 2008. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3731–3737, 2011.

ROBIN, J. -P.; BOUCONTET, L.; CHILLET, P.; GROSCOLAS, R. Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a “refeeding signal” linked to a metabolic shift. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. R746–R753, 1998a.

ROBIN, J. -P.; FRAIN, M.; SARDET, C.; GROSCOLAS, R.; LE MAHO, Y. Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. **American Journal of Physiology**, v. 254, p. R61–R68, 1988b.

ROMERO, L. M.; REED, J. M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, molecular & integrative physiology**, v. 140, n. 1, p. 73–79, 2005.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RUOPPOLO, V.; VANSTREELS, R. E. T.; WOEHLER, E. J.; HEREDIA, S. A. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P.; MATUS, R.; POLESCHI, C.; KAREN GRIOT, K.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SERAFINI, P. Survival and movements of Magellanic penguins rehabilitated from oil fouling along the coast of South America, 2000-2010. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1309–1317, 2012.

SALVANTE, K. G. Techniques for studying integrated immune function in birds. **The Auk**, v. 123, p. 575–586, 2006.

SCHIAVINI, A.; YORIO, P.; GANDINI, P.; REY, A. R.; BOERSMA, P. D. Los pingüinos de las costas Argentinas: Estado poblacional y conservación. **Hornero**, v. 20, p. 5-23, 2005.

SCOLARO, J.; HALL, M. A.; XIMÉNEZ, I. M. The Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*)- sexing adults by discriminant analysis of morphometric characters. **The Auk**, v. 100, p. 1–4, 1983.

SCOLARO, J. A.; WILSON, R. P.; LAURENTI, S.; KIERSPEL, M.; GALLELLI, H.; UPTON, J. A. Feeding preference of the Magellanic penguin over its breeding range in Argentina. **Waterbirds**, v. 22, p. 104–110, 1999.

SKEWGAR, E.; BOERSMA, P. D.; SIMEONE, A. Winter migration of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the southeastern Pacific. **Waterbirds**, v. 37, n. 2, p. 203–209, 2014.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 926 p.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2014. p. 384-416.

SILVA-FILHO, R. P.; XAVIER, M. O.; MARTINS, A. M.; RUOPPOLO, V.; MENDOZA-SASSI, R. A.; ADORNES, A. C.; CABANA, A. L.; MEIRELES, M. C. A. Incidence density, proportionate mortality, and risk factors of aspergillosis in Magellanic penguins in a rehabilitation center from Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 46, n. 4, p. 667–674, 2015.

SITZ, K. V.; BIRX, D. L. Lymphocyte proliferation assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 17, p. 343–353, 1999.

STADECKER, M. J.; LUKIC, M.; DVORA, A.; LESKOWITZ, S. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. **Journal of immunology**, v. 118, n. 5, p. 1564–1568, 1977.

STOKES, D.; BOERSMA, P. D. Satellite tracking of Magellanic penguin migration. **The Condor**, v. 100, p. 376–381, 1998.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D. Where Breeding Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* forage: satellite telemetry results and their implications for penguin conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 59–65, 1999.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D.; CASENAVE, J. L.; GARCIA-BORBOROGLU, P. Conservation of migratory Magellanic penguins requires marine zoning. **Biological Conservation**, v. 170, n. C, p. 151–161, 2014.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 2, p. 131–141, 2008.

TASKER, M. L.; CAMPHUYSEN, C. J.; COOPER, J.; GARTHE, S.; MONTEVECCHI, W. A.; BLABER, S. J. M. The impacts of fishing on marine birds. **ICES Journal of Marine Science**, v. 57, p. 531–547, 2000.

TELLA, J. L.; FORERO, M.; BERTELLOTTI, M.; DONAZAR, J. A.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O. Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: a multiscale approach. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 268, n. 1475, p. 1455–1461, 2001.

TELLA, J. L.; LEMUS, J. A.; CARRETE, M.; BLANCO, G. The PHA test reflects acquired t-cell mediated immunocompetence in birds. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3295, 2008.

ULBRICHT, J.; ZIPPEL, D. Delayed laying and prolonged fasting in Adélie penguins *Pygoscelis adeliae*. **Polar Biology**, v. 14, p. 215–217, 1994.

VANSTREELS, R. E. T.; ADORNES, A.C.; CANABARRO, P.L.; RUOPPOLO, V.; AMAKU, M.; SILVA-FILHO, R.P.; CATÃO-DIAS, J.L. Female-biased mortality of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the wintering grounds. **Emu**, v. 113, n. 2, p. 128-134, 2013.

VANSTREELS, R. E. T.; BRAGA, E. M.; CATAO-DIAS, J. L. Blood Parasites of Penguins: a Critical Review. **Parasitology**, v. 143, n. 08, p. 931–956, 2016.

VINEY, M. E.; RILEY, E. M. From immunology to eco-immunology: more than a new name. In: MALAGOLI, D.; OTTAVIANI, E. **Eco-immunology**: evolutive aspects and future perspectives. Dordrecht: Springer Science, 2014. p. 1-10.

VINKLER, M.; BAINOVÁ, H.; ALBRECHT, T. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 1081–1086, 2010.

VINKLER, M.; SVOBODOVÁ, J.; GABRIELOVÁ, B.; BAINOVÁ, H.; BRYJOVÁ, A. Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. **Journal of Avian Biology**, v. 45, p. 43–50, 2014.

VLECK, C. M.; VERTALINO, N.; VLECK, D.; BUCHER, T. L. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adélie penguins. **The Condor**, v. 102, p. 392–400, 2000.

WALLACE, R. S.; TEARE, A.; DIEBOLD, E.; MICHAELS, M.; WILLIS, M. J. Hematology and Plasma Chemistry Values in Free-Ranging Humboldt Penguins in Chile. **Zoo Biology**, v. 14, p. 311–316, 1995.

WILLIAMS, T. D. **The penguins**: Spheniscidae. Oxford: Oxford University Press, 1995. 295 p.

WILLIAMS, C. L.; HAGELIN, J. C.; KOOYMAN, G. L. Hidden keys to survival: the type, density, pattern and functional role of emperor penguin body feathers. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 282, n. 1817, p. 20152033, 2015.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants and Redox Signal**, v. 18, n. 6, p. 642-60, 2013.

YORIO, P.; FRERE, E.; GANDINI, P.; CONWAY, W. Status and conservation of seabirds breeding in Argentina. **Bird Conservation International**, v. 9, p. 299-314, 1999.

APÊNDICE A – Resultados do Experimento 1
(Teste de hipersensibilidade cutânea tardia à FHA)

Resumo dos resultados (média $\pm$ SD) da espessura das membranas interdigitais inoculadas, proporção de pixels das células inflamatórias, contagem diferencial na histologia e resultados da hematologia. Os resultados destacados indicam as comparações estatisticamente significativas, com o valor de P apresentado à direita da caixa

	Grupo 6 h	Grupo 24 h	Grupo 48 h
Espessura da membrana interdigital (mm)			
Pata esquerda antes da inoculação de PBS	1,50 ± 0,146	1,79 ± 0,151	1,67 ± 0,192
Pata esquerda 6, 24 e 48 h após inoculação de PBS	1,67 ± 0,093	2,02 ± 0,174	2,08 ± 0,243
	P=0,006	P=0,001	P<0,001
Pata direita antes da inoculação de FHA	1,53 ± 0,119	1,78 ± 0,165	1,68 ± 0,199
Pata direita às 6, 24 e 48 h após inoculação de FHA	1,99 ± 0,347	2,94 ± 0,554	2,89 ± 0,277
	P=0,014	P=0,003	P<0,001
Espessura Delta	0,292 ± 0,338	0,935 ± 0,480	0,803 ± 0,265
			P=0,011
Proporção de pixels das células inflamatórias (PPCI)			
Pata esquerda (PBS)	0,096 ± 0,042	0,133 ± 0,046	0,139 ± 0,047
Pata direita (FHA)	0,127 ± 0,052	0,224 ± 0,104	0,195 ± 0,077
		P=0,047	
Diferença entre as patas	0,032 ± 0,038	0,092 ± 0,097	0,056 ± 0,095

Resumo dos resultados (média $\pm$ SD) da espessura das membranas interdigitais inoculadas, proporção de pixels das células inflamatórias, contagem diferencial na histologia e resultados da hematologia. Os resultados destacados indicam as comparações estatisticamente significativas, com o valor de P apresentado à direita da caixa

Contagem diferencial histologia – Granulócitos				
Pata esquerda (PBS)	36,9% $\pm$ 32,5%	33,8% $\pm$ 15,7%	33,1% $\pm$ 19,9%	
Pata direita (FHA)	43,8% $\pm$ 29,9%	20,4% $\pm$ 9,9%	18,3% $\pm$ 14,4%	
Diferença entre as patas	6,8% $\pm$ 41,0%	-13,4% $\pm$ 21,9%	-14,8% $\pm$ 16,9%	
Contagem diferencial histologia – Linfócitos				
Pata esquerda (PBS)	32,8% $\pm$ 31,4%	37,1% $\pm$ 22,2%	37,8% $\pm$ 10,0%	
Pata direita (FHA)	24,3% $\pm$ 8,4%	37,8% $\pm$ 8,0%	43,4% $\pm$ 9,4%	
Diferença entre as patas	-8,4% $\pm$ 33,0%	0,8% $\pm$ 22,8%	5,7% $\pm$ 10,3%	
Contagem diferencial histologia – Macrófagos				
Pata esquerda (PBS)	28,8% $\pm$ 28,0%	26,2% $\pm$ 10,6%	29,1% $\pm$ 13,1%	
Pata direita (FHA)	30,7% $\pm$ 28,2%	40,2% $\pm$ 15,7%	38,0% $\pm$ 13,5%	
Diferença entre as patas	1,9% $\pm$ 38,3%	14,1% $\pm$ 18,7%	8,9% $\pm$ 14,0%	
Contagem diferencial histologia – Trombócitos				
Pata esquerda (PBS)	1,5% $\pm$ 2,8%	3,0% $\pm$ 4,0%	0,0% $\pm$ 0,0%	
Pata direita (FHA)	1,2% $\pm$ 2,6%	1,5% $\pm$ 1,3%	0,2% $\pm$ 0,6%	
Diferença entre as patas	-0,3% $\pm$ 3,9%	-1,5% $\pm$ 3,1%	0,2% $\pm$ 0,6%	
Hematologia				
Hematócrito	42% $\pm$ 3,0%	45% $\pm$ 3,2%	43,3% $\pm$ 6,5%	
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	4,49 $\pm$ 0,36	5,29 $\pm$ 0,54	5,34 $\pm$ 0,63	P = 0,011

Resumo dos resultados (média $\pm$ SD) da espessura das membranas interdigitais inoculadas, proporção de pixels das células inflamatórias, contagem diferencial na histologia e resultados da hematologia. Os resultados destacados indicam as comparações estatisticamente significativas, com o valor de P apresentado à direita da caixa

Heterófilos	53% $\pm$ 17%	48% $\pm$ 6,4%	52% $\pm$ 18%
Eosinófilos	0,28% $\pm$ 0,48%	1,86% $\pm$ 2,54%	0,86% $\pm$ 0,69%
Basófilos	0%	0,14% $\pm$ 0,38%	0,14% $\pm$ 0,38%
Linfócitos	46% $\pm$ 17,6%	50% $\pm$ 6,5%	48% $\pm$ 17,9%
Monócitos	0,86% $\pm$ 0,69%	0,71% $\pm$ 0,49%	0,28% $\pm$ 0,49%
Proporção de Heterófilos-Linfócitos	1,55 $\pm$ 1,23	0,98 $\pm$ 0,27	1,38 $\pm$ 0,99

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

APÊNDICE B – Resultados do Experimento 1
(Teste de hipersensibilidade cutânea tardia à FHA)

Apresentação das informações individuais, dados clínicos e hematológicos de pinguins-de-Magalhães (n= 21) amostrados para o Experimento 1

No.	Grupo	Sexagem	Momento muda	Escore de condição corporal (1 a 4)	Massa (g)	Hto (%)	Proteína Plasmática (g/dL)	Contagem		Heterófilos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)	Basófilos (%)	Razão H:L	VCM (fL)
								Contagem total eritrócitos (10 ⁶ células/mm3)	Contagem total leucócitos (célis/mm3)							
1	6 h	Fêmea	pós-muda	4	4210	44	4,6	1,48	6500	30%	70%	0%	1%	0%	0,42	298,31
2	24 h	Macho	pós-muda	3	3790	41	5,4	1,61	11000	40%	60%	0%	1%	0%	0,67	255,19
3	24 h	Macho	pós-muda	3	4065	43	4,4	1,66	11000	60%	39%	1%	1%	0%	1,53	259,04
4	24 h	Fêmea	pós-muda	3	3475	47	6	1,49	14250	49%	51%	1%	0%	1%	0,96	314,91
5	24 h	Fêmea	pós-muda	4	3330	46	5,8	1,87	13750	51%	49%	0%	1%	0%	1,05	245,99
6	24 h	Fêmea	pós-muda	3	3780	46	5	1,65	-	44%	51%	6%	0%	0%	0,85	279,64
7	24 h	Fêmea	pré-muda	3	3650	51	5	1,69	13000	47%	47%	5%	1%	0%	1,00	301,78
8	24 h	Fêmea	pós-muda	3	2945	44	5,4	1,66	-	45%	55%	0%	1%	0%	0,82	265,06
9	6 h	Fêmea	pós-muda	3	3335	41	4,2	1,20	4750	40%	59%	0%	1%	0%	0,68	343,10
10	6 h	Macho	pós-muda	3	3990	44	4	1,79	5000	46%	53%	0%	2%	0%	0,88	246,50
11	48 h	Fêmea	pós-muda	4	3335	49	5,6	1,51	2750	42%	57%	2%	0%	0%	0,73	324,50
12	48 h	Fêmea	pós-muda	3	2855	34	5,4	0,51	2250	35%	65%	1%	0%	0%	0,53	666,67
13	48 h	Macho	pós-muda	3	3700	51	5,8	1,23	1500	72%	28%	0%	0%	0%	2,57	414,63
14	48 h	Macho	pós-muda	3	4375	42	6	1,25	6500	74%	26%	1%	1%	0%	2,88	336,00
15	48 h	Macho	pós-muda	4	3950	49	5,6	0,83	1750	58%	42%	0%	1%	0%	1,39	593,94
16	48 h	Fêmea	pós-muda	3	2780	41	4,8	0,54	750	53%	46%	1%	0%	1%	1,16	759,26
17	48 h	Macho	pós-muda	3	4040	37	4,2	-	1000	27%	73%	1%	0%	0%	0,36	-
18	6 h	Macho	pós-muda	3	4400	46	5	1,58	16500	79%	21%	0%	1%	0%	3,83	292,06
19	6 h	Macho	pós-muda	2	3865	37	4,2	1,37	10500	70%	29%	1%	1%	0%	2,46	270,07
20	6 h	Fêmea	pós-muda	3	3945	40	4,6	1,82	5500	63%	37%	1%	0%	0%	1,73	219,78
21	6 h	Macho	pós-muda	3	3990	42	4,8	1,30	4000	46%	54%	0%	0%	0%	0,85	324,32

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

APÊNDICE C – Resultados do Experimento 2
(Influência do ciclo da muda anual de penas em parâmetros da resposta imune)

Apresentação das informações individuais, dados clínicos e hematológicos de pinguins-de-Magalhães (n= 13) amostrados para o Experimento 2, de acordo com seu momento em relação à muda anual de penas:

Momento pré-muda (-5 a 0 dias da muda)															
No.	Sexagem PCR	Escore de condição corporal (1 a 4)	Massa (g)	Hto (%)	Proteína Plasmática (g/dL)	Contagem total eritrócitos (10 ⁶ células/mm3)	Contagem total leucócitos (célis/mm3)	Heterófilo s (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilo s (%)	Monócito s (%)	Basófilos (%)	Razão H:L	Trombócito os	VCM (fL)
1	Fêmea	4	5800	40	4,8	1,63	4000	26	53	17	4	0	0,49	142000	245,40
2	Macho	3	5700	38	4,2	1,90	11500	27	46	12	5	0	0,59	116000	200,00
3	Macho	4	6435	42	5	1,47	9000	27	51	19	3	0	0,53	124000	285,71
4	Fêmea	3	4980	-	-	-	-	22	67	11	2	0	0,33	134000	-
5	Fêmea	4	5900	47	5,6	1,77	9125	50	43	5	2	0	1,16	140000	265,54
6	Macho	4	6380	44	5	1,68	7000	39	49	9	3	0	0,80	136000	261,90
7	Macho	4	7300	43	4,6	1,79	9000	61	32	6	1	0	1,91	152000	240,90
8	Macho	4	6000	45	5,2	1,72	6250	51	44	4	1	0	1,16	158000	261,63
9	Fêmea	4	5235	46	5,2	1,57	5000	41	46	8	5	0	0,89	132000	293,93
10	Fêmea	4	5600	40	5	1,44	7500	56	49	5	2	0	1,14	148000	277,78
11	Macho	4	5460	47	4,8	1,99	3000	31	66	2	1	0	0,47	110000	236,78
12	Fêmea	4	5025	48	5	1,76	12125	39	54	7	0	0	0,72	132000	273,12
13	Macho	4	6410	45	5,4	1,67	6750	33	60	5	2	0	0,55	152000	270,27

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Apresentação das informações individuais, dados clínicos e hematológicos de pinguins-de-Magalhães (n= 13) amostrados para o Experimento 2, de acordo com seu momento em relação à muda anual de penas:

Momento da muda (10° ao 21° dias da muda)

No.	Sexagem PCR	Score de condição corporal (1 a 4)	Massa (g)	Hto (%)	Proteína Plasmática (g/dL)	Contagem total eritrócitos (10 ⁶ céls/mm3)	Contagem total leucócitos (céls/mm3)	Heterófilo s (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilo s (%)	Monócito s (%)	Basófilos (%)	Razão H:L	Trombócitos	VCM (fL)
1	Fêmea	3	4700	34	4,4	1,31	7750	35	60	5	0	0	0,58	100000	260,54
2	Macho	3	3980	33	3,8	1,30	10750	40	48	9	3	0	0,83	130000	253,85
3	Macho	3	5125	40	5	1,03	2625	45	40	8	6	1	1,13	166000	387,41
4	Fêmea	3	3360	46	5,2	1,91	11000	61	36	1	2	0	1,69	148000	240,84
5	Fêmea	4	4300	39	5,2	1,29	2250	68	29	1	1	1	2,34	116000	303,50
6	Macho	3	4675	39	4	1,69	8250	66	32	1	1	0	2,06	130000	231,45
7	Macho	4	6040	40	5	1,33	7375	34	64	1	1	0	0,53	120000	300,19
8	Macho	3	4900	36	4,4	1,23	7750	57	37	6	0	0	1,54	144000	293,88
9	Fêmea	3	3895	41	4,6	1,33	3750	42	40	13	4	1	1,05	116000	309,43
10	Fêmea	3	4300	36	5,4	1,34	9750	48	50	2	0	0	0,96	128000	268,66
11	Macho	3	4630	39	5	1,61	9250	62	38	0	0	0	1,63	164000	242,24
12	Fêmea	3	3815	39	4,4	1,61	6750	49	42	5	3	0	1,17	116000	242,24
13	Macho	3	5090	27	5	1,11	2375	33	63	3	1	0	0,52	132000	243,79

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

Apresentação das informações individuais, dados clínicos e hematológicos de pinguins-de-Magalhães (n= 13) amostrados para o Experimento 2, de acordo com seu momento em relação à muda anual de penas:

Momento basal (>120 dias do início da muda):

No.	Sexagem PCR	Score de condição corporal (1 a 4)	Massa (g)	Hto (%)	Proteína Plasmática (g/dL)	Contagem total eritrócitos (10 ⁶ céls/mm3)	Contagem total leucócitos (céls/mm3)	Heterófilo s (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilo s (%)	Monócito s (%)	Basófilos (%)	Razão H:L	Trombócit os	VCM (fL)
1	Fêmea	4	4080	49	5	2,12	11750	38	58	2	2	0	0,66	114000	231,68
2	Macho	4	4245	54	4,8	1,69	12500	31	65	1	3	0	0,48	98000	320,47
3	Macho	4	5225	53	6	1,78	7500	27	70	0	3	0	0,39	134000	298,59
4	Fêmea	4	4225	56	6	1,83	15250	46	53	1	0	0	0,87	140000	306,01
5	Fêmea	4	4080	59	6	2,26	8250	35	60	2	4	0	0,58	138000	261,64
6	Macho	4	4730	58	6,4	2,78	13500	22	76	2	0	0	0,29	98000	208,63
7	Macho	4	5330	54	6	1,49	9750	59	34	3	3	0	1,74	130000	362,42
8	Macho	3	4695	52	6	1,83	16250	44	53	0	3	0	0,83	144000	284,93
9	Fêmea	3	3730	54	6	1,99	11750	61	38	1	0	0	1,61	120000	272,04
10	Fêmea	3	3825	47	5	1,51	14125	45	57	4	1	1	0,79	118000	311,95
11	Macho	4	4750	53	6	2,23	15000	26	73	1	0	0	0,36	146000	237,67
12	Fêmea	3	3500	49	5	1,95	14500	68	31	0	1	0	2,19	110000	251,28
13	Macho	4	4045	54	5,6	1,93	6500	32	66	2	0	0	0,48	144000	280,52

Fonte: (RUOPPOLO, V., 2016).

APÊNDICE D – Resultados do Experimento 2
(Influência do ciclo da muda anual de penas em parâmetros da resposta imune)

Apresentação da quantidade de alimento ingerida pelos pinguins durante os períodos de pré-muda, muda e pós-muda, com a média e o desvio padrão. As células sombreadas indicam o momento da muda de cada indivíduo

Data	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
2/4/15	600	0	300	100	680	720	720	580	60	360	360	360	360
3/4/15	360	20	300	0	540	480	660	600	0	240	360	300	60
4/4/15	780	0	480	120	240	420	600	300	300	360	480	240	300
5/4/15	300	0	0	360	420	420	540	540	360	360	240	300	480
6/4/15	420	200	660	240	600	660	660	720	240	540	360	480	360
7/4/15	460	120	630	150	280	160	580	850	360	440	530	480	450
8/4/15	120	0	940	120	480	0	540	780	300	600	180	540	540
9/4/15	180	120	380	60	200	180	240	480	240	420	600	440	540
10/4/15	60	0	580	120	280	60	360	860	300	420	660	600	420
11/4/15	0	0	400	120	280	120	0	120	240	60	60	240	60
12/4/15	60	180	180	180	120	180	120	180	0	120	240	120	180
13/4/15	120	120	420	0	60	180	300	360	420	480	540	600	540
14/4/15	60	180	480	40	100	120	180	160	300	300	300	220	840
15/4/15	0	180	240	60	180	60	220	380	420	480	540	460	480
16/4/15	180	340	320	120	0	120	180	0	600	600	720	180	600
17/4/15	120	60	120	100	240	60	280	100	640	780	780	420	240
18/4/15	120	180	160	180	0	0	0	0	300	660	840	300	180
19/4/15	0	240	300	0	0	0	0	0	180	420	180	0	0
20/4/15	0	120	360	220	170	60	180	260	660	660	420	120	480
21/4/15	40	180	240	180	360	100	360	320	720	720	600	210	660
22/4/15	0	180	360	100	300	120	340	340	480	360	240	140	660
23/4/15	0	180	420	20	180	0	20	180	540	420	300	80	180

Data	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
24/4/15	0	340	400	120	180	120	200	360	540	480	180	240	660
25/4/15	60	120	60	60	120	0	180	60	360	120	120	60	60
26/4/15	60	120	180	360	440	60	60	120	120	60	60	180	120
27/4/15	60	360	480	160	0	0	60	120	300	240	120	60	420
28/4/15	140	480	540	240	120	200	260	200	320	240	60	200	420
29/4/15	120	480	480	180	0	0	0	180	300	180	120	0	180
30/4/15	60	420	400	360	300	160	60	300	200	120	0	300	120
1/5/15	120	180	360	180	0	240	60	240	120	180	60	0	240
2/5/15	300	360	360	240	0	60	420	240	180	240	0	180	360
3/5/15	240	420	360	360	0	120	0	60	200	0	0	120	360
4/5/15	240	360	360	300	0	420	60	0	60	60	180	0	180
5/5/15	300	420	300	360	0	360	180	180	60	180	60	120	180
6/5/15	600	420	360	480	0	420	300	180	60	0	0	120	0
7/5/15	420	420	540	420	0	420	240	240	0	0	120	240	0
8/5/15	420	300	480	180	0	420	240	240	0	120	0	60	60
9/5/15	480	300	480	480	0	360	480	180	120	120	180	240	240
10/5/15	240	180	240	120	0	120	240	60	0	60	0	120	60
11/5/15	360	300	420	420	300	540	360	240	60	180	60	240	240
12/5/15	360	300	240	360	180	540	240	180	0	120	60	240	60
13/5/15	480	240	480	360	300	480	300	240	0	240	180	300	180
14/5/15	300	180	420	420	240	360	420	120	60	60	120	240	60
15/5/15	480	420	420	420	420	660	300	240	60	720	300	360	120
16/5/15	480	600	420	540	360	240	0	300	120	360	180	180	120
18/5/15	480	360	240	180	240	300	420	240	0	0	120	360	180
19/5/15	420	120	300	240	240	300	300	240	0	60	240	300	60
20/5/15	480	300	480	360	60	240	120	300	0	0	0	420	300
21/5/15	420	420	420	420	420	240	60	420	180	60	300	360	120
22/5/15	480	360	360	360	180	300	240	360	0	60	180	180	480
23/5/15	540	360	360	420	180	420	540	300	120	300	0	360	300

Data	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
24/5/15	480	240	420	360	0	360	540	180	180	240	0	360	480
25/5/15	420	420	360	420	360	480	240	240	300	240	360	480	300
26/5/15	420	300	420	420	360	360	660	420	240	180	180	480	420
27/5/15	420	360	420	360	540	480	720	240	360	360	240	540	300
28/5/15	420	480	540	420	480	420	420	360	300	240	300	360	360
29/5/15	480	540	360	240	360	360	480	300	360	480	240	480	300
30/5/15	480	480	480	420	540	480	540	480	480	480	540	540	420
31/5/15	480	420	540	480	480	480	420	420	480	420	420	540	420
1/6/15	480	300	240	180	240	240	360	300	240	240	240	240	120
2/6/15	540	300	300	240	360	360	240	420	360	540	300	360	240
3/6/15	420	360	360	480	420	360	420	360	480	480	360	360	300
Média alimento pré-muda	492,00	10,00	270,00		462,86	408,57	614,29	502,31	342,86	433,33	433,18	384,29	365,17
SD	196,27	14,14	199,00		161,83	256,35	68,03	261,28	186,88	89,50	211,65	121,93	221,92
Média alimento muda	123,33	74,00	423,85	119,286	164,67	90,67	185,33	172,31	73,75	124,29	78,75	155,63	166,15
SD	121,46	82,22	234,65	95,79	112,24	61,04	128,06	143,88	169,57	89,50	68,30	121,93	122,85
Média alimento pós - muda	316,00	313,60	379,11	292,50	210,50	312,00	255,56	255,56	233,33	255,00	205,00	296,25	270,00

Fonte: (Sabina Parque Escola do Conhecimento – DOMATO-RIBEIRO, J., 2015).