



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS

**TREMATODÍASE RENAL EM *Puffinus puffinus* NO LITORAL
DO ESTADO DO PARANÁ**

Londrina
2019

ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS

**TREMATODÍASE RENAL EM *Puffinus puffinus* NO LITORAL
DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Matos, Andressa Maria Rorato Nascimento de.

Trematodíase renal em *Puffinus puffinus* no litoral do Estado do Paraná / Andressa Maria Rorato Nascimento de Matos. - Londrina, 2019.

91 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Aves marinhas migratórias - Tese. 2. Pardela - Tese. 3. Patologia animal - Tese. 4. Rencolidae - Tese. I. Bracarense, Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS

**TREMATODÍASE RENAL EM *Puffinus puffinus* NO LITORAL DO
ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias
Universidade de São Paulo

Londrina, 22 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho!

Dedico ao meus familiares, em especial ao meu esposo Ricardo de Matos.

Por fim, dedico àqueles que com o suor de cada dia, trabalham para um futuro melhor na pesquisa, no ensino e na conservação de nossa fauna e flora!

AGRADECIMENTOS

Alguns acreditam que anjos possuem asas, cabelos loiros, encaracolados e olhos azuis. Ao longo destes dois anos aprendi que anjos usam roupas normais, não têm asas, possuem todos os tipos de cores, sotaques, jeitos. Foram muitos os desafios e as dificuldades, não menores tão pouco maiores do que de outros, mas acima de tudo foram meus. Em cada um desses desafios fui presenteada com um desses anjos que com carinho, paciência, dedicação e sabedoria souberam me guiar e acolher. As bênçãos proporcionadas pela convivência nos mostram o quanto somos diferentes e iguais ao mesmo tempo, mas principalmente nos ensinam o quanto necessitamos um dos outros.

Primeiramente, gostaria de dizer mais uma vez o quanto sou grata pela orientação da Profa. Ana Paula Bracarense. A admiro pelo seu caráter, sua sensatez, pelo seu incansável esforço e comprometimento para a realização de um trabalho digno, de qualidade e relevância. Além de nos inspirarmos, é uma honra poder estar ao seu lado aprendendo a superar nossos desafios, ter paciência e sabedoria diante do dia a dia acadêmico.

Agradeço à equipe do Projeto de Monitoramento de Praias de Pontal do Paraná, em especial à Dra. Camila Domit, Dr. Mário Castro, Msc. Daniela Nóbrega, M.V. Jéssica Moreira e Msc Mariane Castro, pela concessão das amostras e dos laudos histopatológicos e pelo apoio nas coletas dos parasitos. Serei eternamente grata pela dedicação e entusiasmo que todos os biólogos e veterinários apresentaram durante estes dois anos de trabalho.

Agradeço aos queridos companheiros de jornadas do Laboratório de Patologia Animal da UEL pela paciência, pelo carinho, pelo conforto em momentos atribulados. Tenho muito a agradecer à recepção desde o início e o companheirismo demonstrado durante estes dois anos. E aos melhores ICs Vivian e Lucas que me mostram a cada dia como é gratificante ensinar e aprender. Aos técnicos, pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Virologia Animal, em especial à grande amiga e irmã Fernanda Lavorente e à admirável “co-orientadora” Dra. Elis Lorenzetti. Muitos foram os aprendizados durante estes dois longos anos junto com vocês. Obrigada pelo acolhimento e companheirismo. A qualidade deste trabalho também deve-se ao extenso auxílio sincero e prestativo de vocês nos conhecimentos da biologia molecular, da ciência e da vida!

Agradeço à técnica Dra. Kerlei por toda ajuda com a biologia molecular e acolhimento nos momentos mais conturbados e difíceis. Ao Prof. Dr. Junior, ao técnico Osvaldo e ao pós-doutorando Thiago do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises e à técnica Dalva, residentes e mestrandos do Laboratório de Parasitologia Veterinária por todo auxílio e entusiasmo para trabalhar conosco.

Ao Prof. Dr. Celso Pinto, um presente em minha inicial vida profissional, por ter sido a inspiração para seguir a área acadêmica com parasitologia. À Profa. Dra. Angelinha e à Dra. Dani Rosim por terem me ensinado a compreender o quanto a parasitologia é encantadora. Ao Prof. Dr. Itamar Navarro e Profa. Dra. Roberta Freire pelo carinho, apoio e ensinamentos durante a residência em Saúde Pública. Agradeço à secretária do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Helenice, por toda a paciência e amparo a todos os pós-graduandos.

De coração e agradecimentos eternos, sou grata ao meu esposo Ricardo por ele ser como é, a luz da minha vida e do meu trabalho e aos meus pais, irmã Lê, sogros e cunhados por formarem uma maravilhosa e amada família. Não tenho palavras para agradecer ao destino por tamanha bênção em tê-los ao meu lado. Agradeço a Ele, nosso Pai maior, por ter proporcionado tudo isso em minha singela existência até o momento. O melhor que posso fazer em eterna gratidão é retribuir a quem quer que seja tudo o que de coração foi proporcionado a mim pelos meus queridos familiares e amigos.

“O sorriso custa menos que a eletricidade e dá mais luz.”

Provérbio escocês

*(...) Gigante pela própria natureza, és belo, és forte,
impávido colosso. Que o teu futuro espelhe essa
grandeza. Terra adorada, entre outras mil, és tu
Brasil, ó Pátria amada (...)*

Hino Nacional – Joaquim Osório Duque Estrada

MATOS, Andressa M. Rorato N. de. **Trematodíase renal em *Puffinus puffinus* no litoral do Estado do Paraná**. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Puffinus puffinus, conhecido como pardela-sombria, pertence a ordem Procellariiformes. Estas aves marinhas mantêm sítios de reprodução na Europa e migram para o Atlântico Sul entre os meses de setembro e fevereiro. Estudos sobre a fauna parasitária destes animais também podem fornecer informações sobre a distribuição e o estoque populacional dos hospedeiros e os impactos sobre a saúde dos oceanos. Objetivou-se com este trabalho identificar por métodos morfológicos e moleculares os trematódeos renais de *Puffinus puffinus* encalhados no litoral do Estado do Paraná e avaliar a associação entre a presença destes parasitos com as alterações renais e sistêmicas e a ocorrência de interação antrópica. A coleta dos animais, dos digenéticos e as autópsias foram realizadas no período de setembro de 2015 a dezembro de 2017 pela equipe do Projeto de Monitoramento de Praias, do Centro de Estudo do Mar, Universidade Federal do Paraná, como condicionante pela exploração de petróleo e gás do pré-sal na Bacia de Santos. Durante a autópsia foram coletadas informações como sexo, idade, condição corporal e interação antrópica. Fragmentos de órgãos foram colhidos e fixados em solução formalina tamponada a 10% para posterior processamento histológico. Determinou-se um escore de lesão no rim que utilizou os seguintes parâmetros: hiperplasia do epitélio tubular, degeneração e necrose do epitélio tubular e infiltrado inflamatório. Para avaliar o índice de saúde, utilizou-se também quatro parâmetros: condição corporal e lesões tegumentares, sistêmicas e organizadas. Os parasitos foram caracterizados por técnicas histológicas e moleculares (reação em cadeia da polimerase e sequenciamento) e por microscopia eletrônica de varredura. Foram encontrados 341 *P. puffinus*, com maior ocorrência durante o mês de novembro. Destes, 85 foram submetidos às avaliações macro e microscópicas. Deste total, 71 (84%) apresentaram digenéticos renais. Em 78 animais foi possível determinar o sexo (44 fêmeas e 34 machos), sendo a maioria juvenis. Interação antrópica foi observada somente em aves parasitadas (17/71), sendo a presença de óleo a principal interação (6/17). As alterações renais mais frequentes nos animais parasitados foram nefrite (53/71) e necrose tubular (17/71). Condição corporal ruim foi observada na maioria das aves parasitadas (46/71) e não parasitadas (12/14). As principais lesões sistêmicas observadas em aves parasitadas e não parasitadas foram necrose cardíaca e muscular, congestão e hemorragia pulmonar. A presença dos digenéticos não teve correlação com o sexo, a maturidade sexual, o escore de lesão renal e o índice de saúde. No entanto, verificou-se correlação significativa entre interação antrópica e o parasitismo renal. A partir dos resultados morfológicos e moleculares foi possível identificar o renicolídeo *Renicola sloanei* pela primeira vez em *P. puffinus*. Além disso, os resultados moleculares também sugerem que este digenético pode ser a forma adulta de *Cercaria pythionike*. Os achados histopatológicos e a análise estatística corroboram o fato do parasitismo por *R. sloanei* acarretar lesões renais não letais, ou seja, que não estão associadas ao encalhe e óbito de *P. puffinus*. Portanto, a mortalidade destes animais pode estar associada ao excessivo esforço energético e muscular durante o período migratório, observados pela baixa condição corporal e lesões cardíaca e muscular.

Palavras-chave: Aves marinhas migratórias. Digenético. Parasitismo. Pardela. Rim.

MATOS, Andressa M. Rorato N. de. **Renal trematodiasis in *Puffinus puffinus* on the coast of Paraná state.** 2019. 91 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Puffinus puffinus, known as Manx shearwaters, belongs to the order Procellariiformes. These seabirds maintain breeding sites in Europe and migrate to the South Atlantic between September to February. Studies on the parasitic fauna of migratory seabirds can also provide information on the host population distribution and stock and the health impacts of the oceans. The aim of this work was to characterize the renal digeneans of *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state by morphological and molecular methods and to evaluate the association between the presence of these parasites, the renal and systemic alterations and the occurrence of anthropic interaction. The sampling of animals, digeneans and autopsy were carried out from September 2015 to December 2017 through the Beach Monitoring Project, of the Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, as a condition for the pre-salt exploration in the Santos Basin. During the autopsy, data concerning sex, age, body condition and anthropic interaction were collected. Tissues samples were fixed in 10% buffered formalin solution for histological analysis. A lesion score in the kidney was determined using the following parameters: tubular epithelium hyperplasia, tubular epithelium degeneration and necrosis, and inflammatory infiltrate. To evaluate the health status, four parameters were also used: body condition and, integumentary, systemic and organized lesions. The parasites were characterized by histological and molecular (polymerase chain reaction and sequencing), and scanning electron microscopy assays. In this study, 341 *P. puffinus* were stranded, with highest occurrence on November. From these, 85 were submitted to macro and microscopic evaluations. Digeneans in renal tissue were observed in 71 (84%) of these animals. In 78 animals it was possible to determine the sex (44 females and 34 males), most of them juveniles. Anthropic interaction was observed only in parasitized birds (17/71), with the presence of oil being the main interaction (6/17). The most frequent renal changes in the parasitized animals were nephritis (53/71) and tubular necrosis (17/71). Poor body condition was observed in most parasitized (46/71) and non-parasitized (12/14) birds. The main systemic lesions observed in parasitized and non-parasitized birds were cardiac and muscular necrosis, congestion and pulmonary hemorrhage. The presence of digeneans had no correlation with sex, sexual maturity, renal injury score, and health index. However, there was a significant correlation between anthropic interaction and renal parasitism. From the morphological and molecular results it was possible to identify *Renicola sloanei* for the first time in *P. puffinus*. In addition, molecular results also suggest that this parasite is the mature form of *Cercaria pythionike*. The histopathological findings and the statistical analysis corroborate the fact that parasitism by *R. sloanei* causes non-lethal renal lesions, and is not associated with the stranding and death of *P. puffinus*. Therefore, the mortality of these animals may be associated with excessive energetic and muscular efforts during the migratory period, observed by poor body condition and cardiac and muscle injury.

Keywords: Digenean. Kidney. Manx shearwaters. Migratory seabirds. Parasitism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Procelariforme *Puffinus puffinus*, popularmente conhecido como bobo-pequeno 14

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Representação genérica do ciclo de vida de trematódeos digenéticos 32

ARTIGO 1

- Figure 1** - Kidney of *Puffinus puffinus* from the coast of Paraná state, Brazil. (A) Macroscopically findings showing renicolids (arrow). (B) Ectasia ductal in kidney with *Renicola sloanei* (*) filled with eggs. White arrow - renal duct edge. Black arrow - cystic formation around the parasites (HE, Bar 200 μ m)..... 48
- Figure 2** - Histological (A, E, F, G, H, I) and scanning electron microscopy (B, C, D) aspects of *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state, Brazil. (A) Body ovate (ventral aspect) (MC, Bar 200 μ m). (B) Scanning electron microscopy showing a roughly oval body (Bar 500 μ m). (C) Scanning electron microscopy showing the spines and genital pore in the median line of the ventral sucker (Bar 100 μ m). (D) Scanning electron microscopy of an egg with opercula (arrow) (Bar 10 μ m). (E) The oral sucker subterminal opens into the pharynx barrel-shape and the caeca (MC, Bar 200 μ m). (F) Spines in the posterior end of the body (DH, Bar 20 μ m). (G) Mature eggs with miracidium and immature eggs in the uterus (MC, Bar 200 μ m). (H) Genital pore, transverse vitelline ducts, ovary lobed on the right side of the body, right and left testes lie on the side of the ventral sucker, observed in a helminth with few eggs (MC, Bar 50 μ m). (I) Ventral sucker, ovary, right and left testes, vitelline glands, ceacas and a connecting channel between the two arms of the excretory vesicle (*) in an immature adult helminth (MC, Bar 50 μ m)..... 51
- Figure 3** - Phylogenetic analysis of the *Renicola sloanei* Brazilian field strains based on the ITS2, CO1, and ND1 regions 53

ARTIGO 2

Figure 1 - *Puffinus puffinus* stranded on Paraná state with oil impregnation (demarked area)..... 69

Figure 2 - Kidney gross and microscopical aspects (HE, Bar 50 µm) from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state. (A) Gross findings showing renicolids (arrow) in the kidney with a score and health status of 6. (B) Parasitized tubule (*) leading to occlusion of neighbouring tubules (arrow). (C) Inflammatory infiltrate (arrow) surrounding a parasitized tubule (*). (D) Normal tubule (white arrow) and hyperplasic tubule (black arrow) with renicolid (*). (E) Tubular necrosis (black arrow) close to a parasitized tubule (*). The insert shows an area of necrosis (Bar 10 µm). (F) Inflammatory infiltrate (arrow head), tubular cytoplasmic degeneration (white arrow), and tubular necrosis (black arrow). The insert shows an area of cytoplasmic degeneration (Bar 10 µm)..... 71

Figure 3 – Microscopical aspects of the heart and lung from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná. (A) Cardiac muscle showing necrosis (black arrow). (B) Lung with congestion (black arrow) and haemorrhage (*) in state. (HE, Bar 50 µm)..... 73

Figure 4 - Adult *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* 75

Figure 5 - Mature eggs used to measurements (length and width) (black and white arrows) from *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state. (A) Histological kidney with *R. sloanei* (HE, Bar 20 µm). (B) Histological of *R. sloanei* (Mayer’s carmalum stain, Bar 20 µm)..... 76

Figure 6 - Phylogenetic analysis of the *Renicola sloanei* Brazilian field strains. The tree based on the ITS2 region was constructed using the Maximum Likelihood method with Kimura-two parameter model + gama distribution (K2+G). The sequences from this study are marked with filled circle. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values < 80% are not shown). The scale bar at the bottom of the tree represent the number of nt substitutions per site. The GenBank accession numbers of the strains are provided and the *Prosthogonimus cuneatus* strain was used as an outgroup 77

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1 -** Relação de algumas espécies de trematódeos (Identificação) descritos em aves marinhas (Hospedeiro), seus sítios de infecção, autores (Referência) e a origem do hospedeiro publicados a partir do ano 2000 25

ARTIGO 1

- Table 1 -** Sequence, annealing temperature (AT) and reference of primers used to perform the amplification and sequencing of nuclear (ITS2) and mitochondrial (ND1, CO1) DNA loci of the renicolids from *Puffinus puffinus* on the coast of Paraná state 47
- Table 2 -** Measurements (μm) of adult renicolids from seabirds with similar distribution as the *Puffinus puffinus* 50

ARTIGO 2

- Table 1 -** Renal alterations score, health level, and the severities degrees evaluated as from autopsy and histopathology from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of the state of Paraná, southern Brazil 65
- Table 2 -** The number of *Puffinus puffinus* stranded on the coast of the state of Paraná 68
- Table 3 -** Morphological parameters of digeneans *Renicola sloanei* infecting *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state, Southern Brazi 75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
	REFERÊNCIAS	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	INTRODUÇÃO	19
2.2	DOENÇAS NATURAIS EM AVES MARINHAS: INFECÇÕES VIRAIS, BACTERIANAS, FÚNGICAS E PARASITÁRIAS	20
2.2.1	Classe Trematoda e família Rencolidae.....	22
2.3	AMEAÇAS ANTRÓPICAS: PETRÓLEO, PESCA, RESÍDUOS SÓLIDOS E QUÍMICOS.....	27
2.4	O ESTUDO DA FAUNA PARASITÁRIA: IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES AMBIENTAIS.....	29
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	34
3	OBJETIVOS	42
3.1	GERAL.....	42
3.2	ESPECÍFICOS.....	42
4	ARTIGO 1: Molecular identification and histological aspects of <i>Rencicola sloanei</i> (Digenea: Rencolidae) in <i>Puffinus puffinus</i> (Aves: Procellariiformes): a first record.....	43
5	ARTIGO 2: Rencolid infection, renal alterations and health level of <i>Puffinus</i> <i>puffinus</i> (Aves: Procellariiformes) stranded on the coast of Paraná, southern of Brazil.....	60
6	CONCLUSÃO	88
	ANEXOS	89
	ANEXO 1: Normas para submissão de manuscritos na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária	90
	ANEXO 2: Normas para submissão de manuscritos em <i>Journal of Comparative</i>	91

1 INTRODUÇÃO

A extensa área litorânea brasileira, uma das maiores do mundo, apresenta variedades tanto climáticas, quanto geomorfológicas, que favorecem a biodiversidade marinha brasileira. Fatores como a concentração de nutrientes, os gradientes térmicos, somados às condições de abrigo, aos locais para reprodução e alimentação para as espécies que habitam os oceanos, conferem aos ambientes costeiros o papel principal de conservação visando a manutenção da biodiversidade (BRASIL, 2010).

O Brasil abriga uma grande parcela das aves marinhas do mundo, sendo relatadas 106 espécies de 17 famílias. As espécies mais abundantes pertencem às famílias Procellariidae (ordem Procellariiformes) e Sternidae (ordem Charadriiformes) (BRASIL, 2014; VOOREN; BRUSQUE, 1999).

No litoral do Estado do Paraná foram observadas aves marinhas pertencentes a quatro ordens: Procellariiformes (albatrozes e petreus) com maior número de espécimes observados (50%), Suliformes (*Fregata magnificens*; *Sula leucogaster*), Sphenisciformes (*Spheniscus magellanicus*) e Charadriiformes (*Larus* spp.; *Chionis albus*, Sternidae e Stercorariidae) (DAUDT *et al.*, 2017).

As aves marinhas podem ser classificadas em espécies costeiras, aquelas que são encontradas em praias e que nidificam em ilhas litorâneas e em espécies oceânicas ou pelágicas que preferem o mar aberto (COELHO *et al.*, 1990; SICK, 1997). Algumas espécies podem apresentar hábitos migratórios que são definidos como o movimento de retorno regular entre áreas geograficamente separadas de reprodução e de invernada, migrando quando as condições ambientais se apresentam desfavoráveis (BRASIL, 2016; NEWTON, 2011). A maioria das espécies de aves migratórias é protegida por acordos internacionais, como a *Convention on Migratory Species* (CMS) (OLMOS, 2002). O Brasil tornou-se signatário somente em 2015, após também entrar para a lista de países que aderiram ao *Agreement on the Conservation of Albatrosses and Petrels* (ACAP) (CMS, 2016).

Estudos relacionados à ecologia de aves migratórias podem contribuir para a compreensão dos impactos sobre a saúde dos oceanos (GUILFORD *et al.*, 2009). Espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas que são fundamentais para a aquisição de reservas energéticas necessárias aos longos deslocamentos. No entanto, devido à distribuição descontinuada dos recursos alimentares, levando a modificações drásticas nestas áreas, as populações rapidamente respondem de forma negativa, como a perda de populações inteiras ou até a extinção de espécies (BRASIL, 2016).

Desta forma, as aves marinhas têm sido historicamente usadas como sentinelas por serem facilmente visualizadas, habitarem extensas áreas costeiras, apresentarem grandes populações, longa duração de vida e, principalmente, por ocuparem o topo da cadeia alimentar (BURGER; GOCHFELD, 2004; FURNESS; CAMPHUYSEN, 1997; SICILIANO; ALVES; HACON, 2005).

A ordem Procellariiformes apresenta o maior número de espécies de aves marinhas (40 espécies) as quais preferem habitats oceânicos ou pelágicos. A esta ordem pertence a família Procellariidae, uma das mais numerosas em número de espécimes, possuindo cinco espécies do gênero *Puffinus* - *Puffinus puffinus* com ocorrência sazonal, vindos do Hemisfério Norte; *Puffinus griseus* e *Puffinus gravis* visitantes sazonais vindos do sul da América do Sul; *Puffinus tenuirostris*, com ocorrência irregular e *Puffinus lherminieri*, única espécie que é residente no Brasil (PIACENTINI *et al.*, 2015; SICK, 1997).

Puffinus puffinus (Figura 1), conhecido popularmente como pardela-sombria ou bobo-pequeno, possui sítios de reprodução na Europa, migrando para o Atlântico Sul para se alimentar entre os meses de setembro à fevereiro, apresentando distribuição em toda a costa brasileira (SICK, 1997). Estudo realizado no Brasil indicou que *P. puffinus* podem ser utilizados como animais sentinelas por ingerirem invertebrados e peixes marinhos também consumidos por humanos. Dessa forma, estes podem estar expostos aos compostos tóxicos e aos patógenos detectados nas pardelas (CARDOSO *et al.*, 2014).

Figura 1. Procellariiforme *Puffinus puffinus*, popularmente conhecido como bobo-pequeno ou pardela-sombria.



Fonte: Brian Sullivan. Cornell Lab. of Ornithology.

Apesar dos variados trabalhos relacionados à ecologia da avifauna marinha, estudos parasitológicos são pouco usuais, apesar das evidências de que os parasitos podem oferecer informações substanciais sobre a ecologia de seus hospedeiros (HOBERG, 1996). O primeiro estudo sobre o parasitismo em *P. puffinus* no litoral brasileiro foi realizado com espécimes no Estado da Paraíba, onde foram encontradas as espécies parasitárias *Seurattia shiplei*, *Contracaecum* spp. e *Tetrabothrius* spp. infectando o proventrículo e o intestino delgado, sendo que em nenhum dos casos o parasitismo foi relacionado com a causa do óbito (MELO *et al.*, 2012). Estudo posterior realizado no Estado de Sergipe apresentou a infecção renal pelo trematódeo *Renicola* spp. em seis (25%) *P. puffinus* associada a infiltrado linfoplasmocitário e necrose renal (MARIANI, 2016). O parasitismo por *Renicola* spp. em *P. puffinus* foi relatado pela primeira vez em 1956, com alta incidência parasitária no parênquima renal associada à lesão tecidual discreta a moderada (WRIGHT, 1956).

Trabalhos para revelar o papel dos parasitos nas mortes de aves marinhas são escassos (ROHDE, 2005). No entanto, deve-se ressaltar que a presença de parasitos não necessariamente resulta em processo patológico e óbito (SERAFINI; LUGARINI, 2014) e sendo componentes de comunidades biológicas, podem alterar o comportamento individual do hospedeiro e regular o tamanho da população hospedeira, atuando diretamente nas taxas de nascimento e morte (LAFFERTY, 2008; LEFÈVRE *et al.*, 2009; MÖLLER, 2005). Além disso, a detecção e identificação dos parasitos são necessárias para entender a interação também com outras espécies parasitárias (MELO *et al.*, 2012).

Por ser considerada ave sentinela e pela escassez de estudos com esta ave marinha no ambiente costeiro brasileiro, o objetivo deste trabalho foi identificar os digenéticos renais de *Puffinus puffinus* encalhados no litoral do Estado do Paraná e avaliar a associação entre o parasitismo com as alterações renais e sistêmicas e interações com atividades antrópicas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. Panorama da Conservação dos Ecossistemas Costeiros e Marinhos no Brasil. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/205/_publicacao/205_publicacao03022011100749.pdf>; Acesso em: 10 de setembro de 2018.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Aves marinhas e costeiras. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/3632-aves-marinhas-e-costeiras>>; Acesso em: 20 de novembro de 2018.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/DCOM_Miolo_Rotas_Migrat%C3%B3rias_2016_final.pdf>; Acesso em: 2 de novembro de 2018.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Marine birds as sentinels of environmental pollution. **Ecohealth**, Nova Iorque, v. 1, p. 263-274, 2004.
- CARDOSO, M. D.; DE MOURA, J. F.; TAVARES, D. C.; GONÇALVES, R. A.; COLABUONO, F. I.; ROGES, E. M.; SOUZA, R. L.; RODRIGUES, D. P.; MONTONE, R. C.; SICILIANO, S. The Manx shearwater (*Puffinus puffinus*) as a candidate sentinel of Atlantic Ocean health. **Aquatic Biosystems**, Suíça, v. 10, n. 1, p. 6, 2014.
- CONVENTION CONSERVATION OF MIGRATORY SPECIES OF WILD ANIMALS – CMS. Brazil Joins CMS as Party N° 122. 2016. Disponível em: <<https://www.cms.int/en/news/brazil-joins-cms-party-no-122>>; Acesso em: 23 de novembro de 2018.
- COELHO, E. P.; ALVES, V. S.; SONEGHET, M. L. L.; CARVALHO, F. S. Levantamento das aves marinhas no percurso Rio de Janeiro – Bahia (Brasil). **Boletim do Instituto Paulista de Oceanografia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 161-167, 1990.
- DAUDT, N. W.; PEREIRA, A.; RECHETELO, J.; KRUL, R.; MESTRE, L. A. M. Noteworthy seabird records from Paraná state, southern Brazil. **Bulletin of the British Ornithologists' Club**, Tring, v. 137, n. 3, p. 195-205, 2017.
- FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, C. J. Seabirds as monitors of the marine environment. **ICES Journal of Marine Science**, Oxford, v. 54, p. 726-737, 1997.
- GUILFORD, T.; MEADE, J.; WILLIS, J.; PHILLIPS, R. A.; BOYLE, D.; ROBERTS, S.; COLLETT, M.; FREEMAN, R.; PERRINS, C. M. Migration and stopover in a small pelagic seabird, the Manx shearwater *Puffinus puffinus*: insights from machine learning. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biologic Science**, Londres, v. 276, p. 1215-1223, 2009.

- HOBERG, E. P. Faunal diversity among avian parasite assemblages: the interaction of history, ecology, and biogeography in marine systems. **Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology**, Escandinávia, v. 6, n. 2, p. 65-89, 1996.
- LAFFERTY, K.D. Ecosystem consequences of fish parasites. **Journal of Fish Biology**, Liverpool, v. 73, n. 9, p. 2083-2093, 2008.
- LEFÈVRE, T.; LEBARBENCHON, C.; GAUTHIER-CLERC, M.; MISSÉ, D.; POULIN, R.; THOMAS, F. The ecological significance of manipulative parasites. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 41-48, 2009.
- MARIANI, D. B. **Causas de encalhes de aves marinhas no nordeste do Brasil**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- MELO, C. M. F.; OLIVEIRA, J. B.; ATHAYDE, A. C. R.; DANTAS, A. F. M.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; MENEZES, D. J. A.; WAGNER, P. G. C. Identification of parasites in *Puffinus puffinus* (Birds, Procellariiformes) from Northeastern Brazil. **Veterinary Research Communications**, Suíça, v. 26, p. 235-238, 2012.
- MÖLLER, A. P. Parasitism and the regulation of host populations. In: THOMAS, F.; RENAUD, F.; GUÉGAN, J. F. (Eds.), **Parasitism and Ecosystems**. Oxford: Oxford University Press, 2005. p 43-53.
- NEWTON, I. The ecology of bird migration patterns. BOU Proceedings-The ecology & Conservation of migratory birds. 2011. Disponível em: <<http://www.bou.org.uk/bouprocnet/migratory-birds/newton.pdf>>; Acesso em: 02 de novembro de 2018.
- OLMOS, F. Non-breeding seabirds in Brazil: a review of band recoveries. **Revista Brasileira de Ornitologia**, Brasília, v. 10, p. 31-42, 2002.
- PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 91-298, 2015.
- ROHDE, K. Economic and environmental importance. In: _____. **Marine Parasitology**. Australia: CSIRO, p. 76-87. 2005
- SICK, H. Ordem Procellariiformes. In: _____. **Ornitologia Brasileira**. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p. 175-185, 1997.
- SICILIANO, S.; ALVES, V. C.; HACON, S. Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: uma revisão do conhecimento brasileiro. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 927-946, 2005.
- SERAFINI, P. P.; LUGARINI, C. Procellariiformes e outras aves de ambientes marinhos (albatroz, petrel, fragata, atobá, biguá, gaivota). In: Cubas, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2ed. São Paulo: Editora Roca, p. 470-494, 2014.

VOOREN C. M.; BRUSQUE L. F. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação**. Rio Grande: Fundação UFRG - Departamento de Oceanografia: Laboratório de Elasmobrânquios e Aves Marinhas, 1999.

WRIGHT, C. A. Studies on the life-history and ecology of the trematode genus *Renicola* Cohn, 1904. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**, Oxford, v. 126, p. 1-50, 1956.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

A partir do início do século XX estabeleceu-se um interesse crescente relacionado à biodiversidade, incluindo também os parasitos – organismos em geral não lembrados e não visíveis por estarem internamente ou sobre outros organismos (AMATO; AMATO, 2010). Parasito pode ser definido como o organismo que vive durante um significativo período de sua existência em um hospedeiro, podendo ou não afetar negativamente o sucesso reprodutivo e evolutivo do mesmo (POULIN; MORAND, 2000). Em aves marinhas há aproximadamente 700 espécies conhecidas de trematódeos digenéticos, eucestódeos, nematódeos e acantocéfalos descritos em 165 espécies de aves (HOBERG, 1996; 2005).

Os parasitos, assim como todo o restante da fauna e flora, geralmente não possuem distribuições geográficas homogêneas, portanto, as áreas apresentam variações de composição de espécies. Além disso, devido às pressões evolutivas similares, flora e fauna de uma mesma região são mais relacionadas entre si (NEVES, 2009).

Associado à identificação dos parasitos e à compreensão da interação destes com seus hospedeiros, busca-se entender o papel dos parasitos como biomarcadores de ambientes alterados pelas atividades antrópicas. A poluição ambiental pode elevar as taxas de parasitismo quando os mecanismos de defesa do hospedeiro são afetados negativamente, quando aumenta o grau de susceptibilidade hospedeira ou as densidades populacionais dos hospedeiros intermediários ou definitivos (LAFFERTY; KURIS, 1999).

Diversos estudos descreveram espécies parasitárias em aves marinhas brasileiras (i. e. ALTRÃO *et al.*, 2017; CAMPOS *et al.*, 2015; JERDY *et al.*, 2016; MARIANI, 2016; MELO *et al.*, 2012; SCHRAMM *et al.*, 2018; WRIGHT, 1954b). No entanto, apesar dos extensivos estudos relacionados à ecologia de aves marinhas, a maioria das pesquisas com fauna parasitária ocorre em um limitado número de aves, com localidade e período de estudos restritos (HOBERG, 1996).

Objetivou-se com esta revisão de literatura abordar brevemente alguns agentes infecciosos e parasitários (em especial os trematódeos renicolídeos, objeto de estudo do trabalho) em aves marinhas e as principais atividades antrópicas que ameaçam à conservação das mesmas. Além disso, objetivou-se apresentar os conhecimentos sobre a interação parasito-hospedeiro e suas relações com a saúde do ecossistema marinho. Dessa

forma, incentiva-se os estudos com a fauna parasitária ao aprimorar os conhecimentos do papel dos parasitos na dinâmica dos ecossistemas.

2.2 DOENÇAS NATURAIS EM AVES MARINHAS: INFECÇÕES VIRAIS, BACTERIANAS, FÚNGICAS E PARASITÁRIAS

As aves marinhas são importantes reservatórios naturais de diversos agentes infecciosos e parasitários, sendo o período reprodutivo, quando há maior concentração de espécimes, o que mais favorece a transmissão intra e interespecíes, além dos movimentos migratórios. No entanto, a manutenção de patógenos no ambiente depende de variáveis bióticas (espécies hospedeiras suscetíveis e vetores) e abióticas (temperatura, umidade) (SERAFINI; LUGARINI, 2014).

Diversos agentes infecciosos, como bactérias, vírus e fungos foram detectados em aves marinhas. Importantes agentes virais foram descritos como o da doença de Newcastle (Paramixovírus), adenovírus, herpesvírus, poxvírus, papilomavírus e poliomavírus (GAYNOR *et al.*, 2015; KUIKEN *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2014; NIEMEYER *et al.*, 2017; VELARDE *et al.*, 2010), evidenciando a importância dos estudos inclusive epidemiológicos com aves marinhas.

O vírus da influenza aviária, exemplo de agente com potencial zoonótico, possui uma das principais ocorrências e diversidade de subtipos em aves marinhas pertencentes a ordem Charadriiformes (gaivotas, trinta-réis, maçaricos e batuíras), sendo esta a segunda maior ordem em número de espécies, inclusive no litoral brasileiro (NEVES; BUGONI; ROSSI-WONGTSCHOWKI, 2006; STALLKNECHT; SHANE, 1988; WARD *et al.*, 2009; WEBSTER *et al.*, 1992).

Além da identificação de espécies patogênicas virais, atenção também deve ser dada em estudos com a dispersão e os efeitos das mesmas sobre a população de aves marinhas e de outras espécies, assim como tem ocorrido com importantes arboviroses com potencial zoonótico (encefalite equina do leste e febre do Nilo ocidental) (SERAFINI; LUGARINI, 2014).

Frequentemente observam-se espécies bacterianas relevantes em aves marinhas, inclusive na costa brasileira, como *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium avium*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (SIEBERT *et al.*, 2012; ZAMPIERI; MARANHO; OLIVEIRA, 2013). Mortalidade em aves marinhas devido a doenças bacterianas é comum

principalmente devido às toxinas produzidas, como em infecções por *Clostridium* spp. (SERAFINI; LUGARINI, 2014). Além de algumas dessas bactérias terem potencial zoonótico, em um estudo envolvendo fragatas (*Fregata magnificens*) de centros de reabilitação no Estado de São Paulo constatou-se a ocorrência de bactérias com genes de resistência antimicrobiana em 62,8% (27/43) dos casos avaliados (SAVIOLI *et al.*, 2016).

O trato respiratório, tanto de aves marinhas quanto de outros grupos de animais como os répteis e mamíferos, consiste em uma importante via de entrada e é um dos principais sistemas afetados por agentes bacterianos ou fúngicos (CASTRO, 2000). Os fungos mais frequentemente isolados são *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. (CORK *et al.*, 1999; HUBÁLEK, 2004). Ambas as espécies podem ser oportunistas, no entanto, quando associadas a outras alterações como má nutrição, imunossupressão, estresse, exposição a toxinas e óleos podem resultar em lesões graves (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015; SEUNG-HEON *et al.*, 2004; ZAMPIERI; MARANHO; OLIVEIRA, 2013).

Vertebrados aquáticos geralmente apresentam comunidade parasitária mais rica que as espécies terrestres (POULIN; MORAND, 2000) e os helmintos de aves marinhas podem ocupar diversos tipos de sistemas, como digestório, pulmonar e renal (HOBERG, 2005). Além disso, as aves, tanto terrestres quanto aquáticas, são parasitadas por muitas espécies de micro (pequenos, que se multiplicam no hospedeiro) e macroparasitos (organismos maiores, que não se multiplicam no hospedeiro) (AMATO; AMATO, 2010).

Aves que habitam regiões pelágicas (oceânicas) apresentam menor variabilidade de espécies parasitárias quando comparadas àquelas de ambientes neríticos (sobre a plataforma continental) ou costeiros. Ademais, ressalta-se que a riqueza parasitária (diversidade de espécies) varia com o habitat das aves e dos outros hospedeiros que compreendem o ciclo evolutivo do parasito (HOBERG, 1996).

Os helmintos reportados em aves pertencem a três filós: Platyhelminthes, Acanthocephala e Nematoda (AMATO; AMATO, 2010). A subordem Eucestoda (filo Platyhelminthes, ordem Cestoda, família Tetrabothriidae) e a subclasse Digenea (filo Platyhelminthes, classe Trematoda) têm sido descritas na maioria dos grupos de aves marinhas (HOBERG, 1996; 2005). Nematódeos ascarideoideos (Superfamília Ascaridoidea, gêneros *Anisakis* e *Contracaecum*, principalmente) comumente ocorrem no proventrículo e esôfago de aves marinhas piscívoras e os gêneros *Seuratia*, *Stegophorus* e *Tetrameres* também são encontrados no proventrículo e ventrículo principalmente de pinguins, procelariformes, larídeos e alcídeos (HOBERG, 2005). Baixa especificidade parasito-hospedeiro foi observada no parasitismo por *Seuratia shipley* e *Stegophorus diomedea* por

ocorrer em várias espécies de Procellariiformes, Charadriiformes e Sphenisciformes (SCHRAMM *et al.*, 2018). Além dos helmintos, podem albergar protistas hemo e histoparasitos, artrópodes ectoparasitos e, mais raramente, pentastomídeos e sanguessugas (AMATO; AMATO, 2010).

Em um estudo de revisão, 110 gêneros de parasitos metazoários (sendo 85 com identificação de espécie) foram descritos em levantamento da fauna parasitária de pinguins, sendo pertencentes aos grupos Nematoda (31), Digenea (22), Cestoda (10) e Acanthocephala (7). As espécies de pinguins que apresentaram maior riqueza da fauna parasitária foram pinguim-azul (*Eudyptula minor*) (30 espécies) e pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (28 espécies) (BRANDÃO; MOREIRA; LUQUE, 2014).

A mortalidade em massa de aves marinhas é atribuída a várias causas, no entanto, estudos para revelar o papel dos parasitos nas mortes são escassos (ROHDE, 2005). Em um estudo com Procellariiformes do litoral do Rio Grande do Sul, lesões gástricas como úlceras, inflamação, necrose e granulomas no proventrículo foram associadas ao parasitismo por *Seurattia* spp. em petrel-gigante (*Macronectes giganteus*) e petrel-gigante-do-norte (*Macronectes halli*), respectivamente (SPOTORNO *et al.*, 2005). No entanto, deve-se ressaltar que a presença de parasitos não necessariamente resulta em alterações teciduais (SERAFINI; LUGARINI, 2014).

2.2.1 Classe Trematoda e família Rencolidae

A classe Trematoda representa um grupo heterogêneo de parasitos os quais devido à natureza de seu ciclo biológico apresentam forte e persistente associação com ambientes aquáticos. A permanência e sobrevivência dos trematódeos, tanto no ambiente quanto no hospedeiro, dependem e são suscetíveis às alterações climáticas e sazonais ambientais e das flutuações da fauna hospedeira (ERASMUS, 1972).

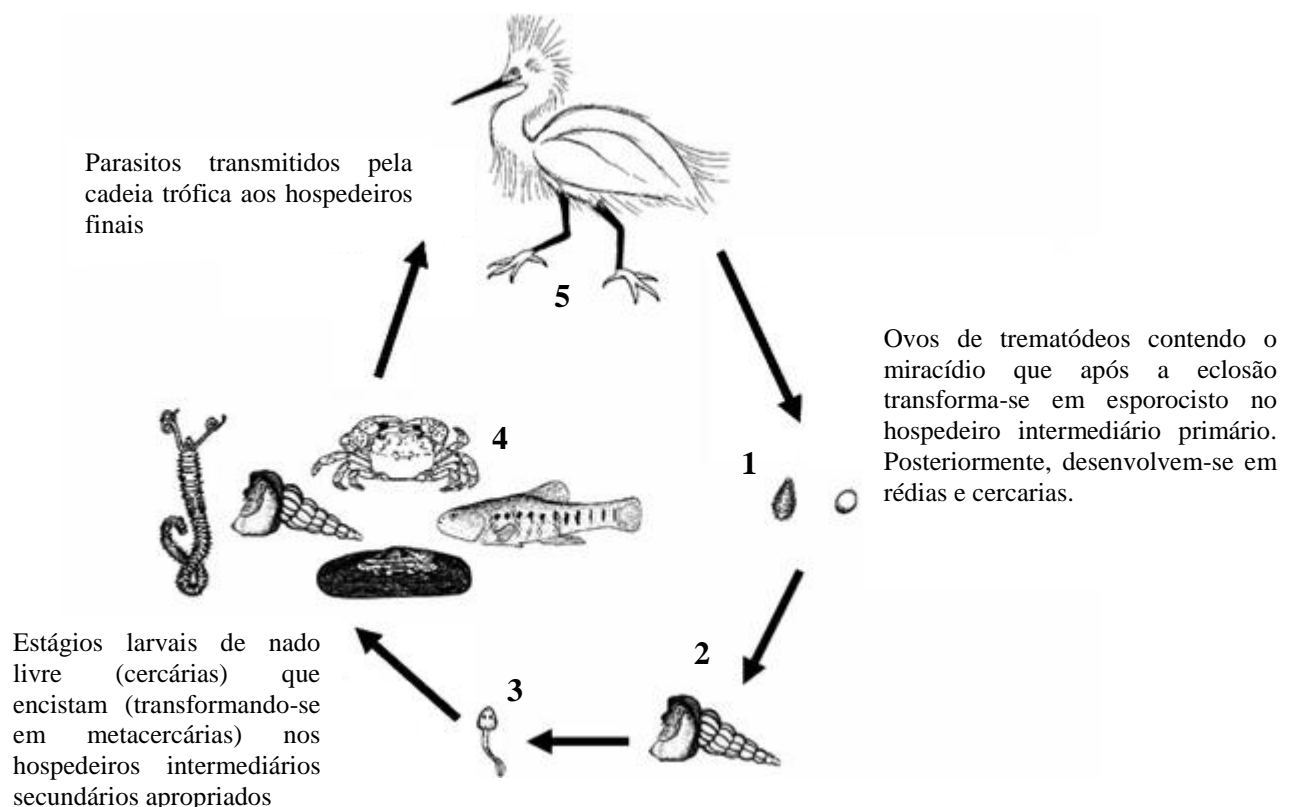
Os trematódeos são subdivididos em duas subclasses (Digenea e Aspidogastrea), apresentam características como corpo achatado dorsoventralmente, parasitam órgãos internos de todas as classes de vertebrados (GIBSON, 1996; 2002; SCHMIDT; ROBERTS, 2009) e em sua maioria são hermafroditas, possuindo uma abertura comum para os ductos reprodutivos (masculino e feminino) (GIBSON, 1996; 2002).

Os digenéticos necessitam de dois a quatro hospedeiros para completarem seu ciclo (THATCHER, 1993) e realizam tanto a reprodução assexuada (estágios de esporocisto e de rédia nos hospedeiros intermediários) quanto a sexuada (estágio adulto no

hospedeiro definitivo) (BOWMAN, 2006; EIRAS, 1994). O ciclo completo compreende as fases: ovo, miracídio, esporocisto, rédia (pode não ocorrer em algumas espécies), cercária, metacercária (quando existe um segundo hospedeiro intermediário) e adulto (EIRAS, 1994; THATCHER, 1993).

Os hospedeiros intermediários primários principais são os moluscos gastrópodes, além de anelídeos, crustáceos, equinodermos, celenterados, cnidários e quetognatos. Os peixes, gastrópodes, bivalves e crustáceos exercem a função de hospedeiros intermediários secundários e aves, répteis, mamíferos e novamente os peixes compreendem os hospedeiros definitivos (Figura 1) (EIRAS, 1994; GIBSON, 1996; GRANOVITCH; MIKHAILOVA, 2004).

Figura 1. Representação genérica do ciclo de vida de trematódeos digenéticos apresentando (1) os ovos, que contém o miracídio, (2) hospedeiro intermediário primário, (3) cercária, (4) hospedeiros intermediários secundários e (5) hospedeiro definitivo.



Fonte: Adaptado de Hechinger *et al*, 2007.

Na Tabela 1 estão apresentadas algumas espécies de trematódeos encontradas em aves marinhas no Brasil e em outras localidades e que foram relatadas a partir

do ano 2000. Apesar da apresentação breve, observa-se a variedade tanto de espécies parasitárias quanto de aves hospedeiras. O trato digestório é o principal sistema parasitado (GIBSON, 1996; 2002) e os parasitos que permanecem neste sistema podem ser melhor estudados pela facilidade de observação e colheita.

Renicola spp., digenético frequentemente observado nos rins e ureteres de aves marinhas que se alimentam de moluscos e peixes, caracteriza-se por apresentar ventosas reduzidas, grande saco uterino e uma variedade de ciclos de vida e de características larvais (GIBSON, 2008; WRIGHT, 1954a). A identificação dos estágios de desenvolvimento foram descritos em poucos renicolídeos (*R. roscovita*, *R. cerithidicola*, *R. buchamani*, *R. thaidus* e *R. lari*) (GRANOVITCH; MIKHAILOVA, 2004; MARTIN, 1971; PREVOT; BÁRTOLI, 1978; STUNKARD, 1964; THIELTGES; HUSSEL; BAEKGAARD, 2006; WRIGHT, 1956). Além disso, os renicolídeos não apresentam o estágio de rédia (MARTIN, 1971).

Gastrópodes marinhos, como as espécies *Littorina* spp. (GRANOVITCH; MIKHAILOVA, 2004; THIELTGES; HUSSEL; BAEKGAARD, 2006), *Nucella lapillus* (GRANOVITCH; MIKHAILOVA, 2004; STUNKARD, 1964), *Cerithium* spp. (PREVOT; BÁRTOLI, 1978) e *Turritella communis* (WRIGHT, 1956) foram identificados como hospedeiros intermediários primários. O mexilhão-comum (*Mytilus edulis*) (STUNKARD, 1964) e os peixes gobídeos (*Gillichthys mirabilis*), killifish da Califórnia (*Fundulus parvipinnis parvipinnis*) (MARTIN, 1971) e *Atherina* spp. (PREVOT; BÁRTOLI, 1978) foram observados como hospedeiros intermediários secundários. Em estudos no estado de Minas Gerais, observaram-se cercárias e metacercárias de renicolídeos no molusco *Melanoides tuberculata* e no peixe *Poecilia reticulata*, respectivamente. No entanto, detalhes do ciclo de vida dos renicolídeos descritos em aves marinhas brasileiras continuam desconhecidos (PINTO; MELO, 2012).

Renicolídeos adultos foram observados em rins de espécies caradriformes (*Larus* spp., *Sterna* spp. e *Thalasseus maximus*) (FREITAS, 1955; THATCHER, 1993; WRIGHT, 1954b), suliformes (*Sula* spp.) (FREITAS, 1955; THATCHER, 1993), em pinguins-de-magalhães (*S. magellanicus*) (JERDY *et al.*, 2016) e em bobo-pequeno (*P. puffinus*) (MARIANI, 2016), sendo que neste último não foram apresentadas as mensurações detalhadas dos parasitos.

Devido ao estágio de desenvolvimento imaturo, a localização no tecido dos hospedeiros e às características morfológicas, a identificação de trematódeos pode ser difícil, fazendo-se necessário a associação de técnicas histológicas e moleculares (ROUTTU *et al.*, 2014).

Tabela 1. Relação de algumas espécies de trematódeos (Identificação) descritos em aves marinhas (Hospedeiro), seus sítios de infecção, autores (Referência) e a origem do hospedeiro publicados a partir do ano 2000.

Identificação	Hospedeiro	Sítio de infecção	Referência	Origem
<i>Ascocotyle</i> spp.	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Brandão <i>et al.</i> (2013)	Brasil
<i>Cardiocephaloides brandesii</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Cardiocephaloides physalis</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Brandão <i>et al.</i> (2013); Campos <i>et al.</i> (2015); Prado; Santos-Lopes; Silva (2011); Tamiasso <i>et al.</i> (2018)	Brasil
<i>Cardiocephaloides physalis</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Diaz; Cremonte; Navone (2010)	Argentina
<i>Cercarioides cochleariformis</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Cryptocotyle</i> sp.	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
Echinostomatidae	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
<i>Eucotyle</i> sp.	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
<i>Galactosomum puffini</i>	<i>Sula nebouxii</i>	Trato gastrointestinal	Rubio-Godoy <i>et al.</i> , (2011)	México
<i>Gymnophallus choledochus</i>	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
<i>Mesostephanus fajardensis</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Mesostephanus microbursa</i>	<i>Sula nebouxii</i>	Trato gastrointestinal	Rubio-Godoy <i>et al.</i> , (2011)	México
<i>Mesostephanus odhneri</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Brandão <i>et al.</i> (2013)	Brasil
Microphallidae	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha

<i>Natterophthalmus andersoni</i>	<i>Sterna maxima</i>	Saco conjuntival	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Opisthometra planicollis</i>	<i>Sula neboxii</i>	Trato gastrointestinal	Rubio-Godoy <i>et al.</i> , (2011)	México
<i>Parorchis acanthus</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Posthodiplostomum macrocotyle</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Brandão <i>et al.</i> (2013)	Brasil
Psilostomidae	<i>Somateria mollissima</i>	Trato gastrointestinal	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
<i>Renicola lari</i>	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	Rim	Heneberg <i>et al.</i> (2016)	República Tcheca
<i>Renicola pinguis</i>	<i>Podiceps cristatus</i>	Rim	Heneberg <i>et al.</i> (2016)	República Tcheca
<i>Renicola sloanei</i>	<i>Spheniscus demersu</i>	Rim	Heneberg <i>et al.</i> (2016)	República Tcheca
<i>Renicola</i> spp.	<i>Somateria mollissima</i>	Rim	Thieltges; Hussel; Baekgarrrd (2006)	Alemanha
<i>Renicola</i> spp.	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Rim	Jerdy <i>et al.</i> (2016)	Brasil
<i>Renicola sterna</i>	<i>Sterna hirundo</i>	Rim	Heneberg <i>et al.</i> (2016)	República Tcheca
<i>Renicola thapari</i>	<i>Sula neboxii</i>	Rim	Rubio-Godoy <i>et al.</i> , (2011)	México
<i>Renicola thapari</i>	<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	Rim	Overstreet; Curran (2005)	Estados Unidos
<i>Stephanoprora conciliata</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Stephanoprora denticulata</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos
<i>Stephanoprora uruguayensis</i>	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Trato gastrointestinal	Brandão <i>et al.</i> (2013)	Brasil
<i>Stictodora cablei</i>	<i>Sterna maxima</i>	Trato gastrointestinal	Dronen <i>et al.</i> (2007)	Estados Unidos

2.3 AMEAÇAS ANTRÓPICAS (PETRÓLEO, PESCA, RESÍDUOS SÓLIDOS E QUÍMICOS)

As aves marinhas apresentam longevidade e numerosas populações em diversas áreas costeiras e compõem o topo da cadeia alimentar. Tais características ecológicas e biológicas possibilitam que sejam consideradas sentinelas do ambiente marinho (BURGER; GOCHFELD, 2004; FURNESS; CAMPHUYSEN, 1997; SICILIANO; ALVES; HACON, 2005). Animais sentinelas são aqueles utilizados em estudos regulares e sistemáticos para identificar potenciais alterações ambientais (NRC, 1991).

Os descartes de resíduos municipais e industriais, as águas de barragem que tornam-se tóxicas pela falta de oxigenação, os agrotóxicos (herbicidas, pesticidas, fungicidas) e os poluentes derivados da exploração e transporte do petróleo, compreendem as inúmeras, dentre tantas outras fontes de poluição aquática e marinha (SICK, 1997). Contudo, a concentração de contaminantes em animais marinhos pode estar relacionada e variar de acordo com a distribuição geográfica, migração, dieta e idade de cada espécie avaliada (COLABUONO; TANIGUCHI; MONTONE, 2012).

Compostos tóxicos bifenil policlorados, pesticidas e elementos traço podem ser detectados em tecido adiposo, fígado e musculatura das aves. Em estudo na costa sudeste brasileira, foram detectados compostos organoclorados em aves que também apresentaram baixa condição corpórea, quadro que pode ser agravado nas espécies que passam por longos períodos de migração (COLABUONO; TANIGUCHI; MONTONE, 2012).

A partir de estudos experimentais e observacionais, a toxicidade do óleo devido à exploração marinha do petróleo revelou alterações morfofuncionais em aves marinhas como perda da flutuabilidade e da termorregulação (contato externo) e lesões macro e microscópicas hepáticas, renais, glandulares, gastrointestinais dentre outros (após ingestão do óleo), além da mortalidade embrionária em ovos expostos durante o período de incubação (LEIGHTON, 1986; 1993).

É importante ressaltar que pesquisas com aves encalhadas contribuem para a compreensão dos efeitos não só da exposição aguda (durante os grandes acidentes de derramamentos), mas também da exposição crônica causada pela soma das descargas operacionais, dos pequenos e constantes vazamentos e/ou dos derrames durante operações de perfuração ou transporte em alto mar (CAMPHUYSEN; VAN FRANEKER, 1992).

Outro tipo de poluição oceânica ocorre pelos resíduos derivados do plástico, a qual tem sido uma das principais preocupações nas últimas décadas. A presença destes resíduos no trato gastrointestinal de aves marinhas, com ocasionais obstruções, foi relatada

em 70 procelariformes encalhados na costa do Rio Grande do Sul após dias de tempestades no ano de 1987 (SICK, 1997). Como pode ser constatado por tal estudo, os fragmentos de plásticos há mais de três décadas são fonte de impactos antrópicos.

Dessa forma, a crescente preocupação deve-se ao fato dos graves casos de obstruções gastrointestinais em diversas espécies de animais marinhos, não somente das aves. Ademais, a bioacumulação dos microplásticos (produtos plásticos microscópicos produzidos para diversos fins ou derivados da fragmentação ambiental de macropelásticos) gera toxicidade ao longo da cadeia trófica, fenômeno conhecido como biomagnificação. Além disso, tanto os macropelásticos quanto os microplásticos facilitam o transporte de pequenas e/ou microscópicas espécies para locais distantes de seu habitat natural, interferindo positiva ou negativamente no ecossistema de destino (BARNES *et al.*, 2009; PETRY; BENEMANN, 2017; WILCOX; VAN SEBILLE; HARDESTY, 2015; WRIGHT; THOMPSON; GALLOWAY, 2013).

A captura incidental devido à pesca, principalmente a pesca por espinhel, também é reconhecida como uma grande ameaça aos procelariformes, ordem com maior número de espécies e espécimes no Brasil. Os procelariformes possuem o hábito de se alimentarem de presas enfraquecidas ou mortas encontradas na superfície oceânica ou de restos alimentares predados por grandes peixes. Este comportamento favorece que estas aves procurem suplementar a dieta com descartes de atividades pesqueiras e também ingiram iscas que estão nos anzóis. Dessa forma, observou-se que o período de declínio populacional de procelariformes coincidiu com o aumento nas atividades pesqueiras, principalmente do tipo espinhel (NEVES; BUGONI; ROSSI-WONGTSCHOWKI, 2006).

A busca por medidas de mitigação para a pesca incidental por espinhel de espécies não alvo (aquelas sem interesse econômico) tem sido objeto de interesse crescente. Em um estudo com esse foco, as medidas testadas apresentaram eficiência ao reduzir o número de aves capturadas (duas), enquanto que no controle (atividade pesqueira sem a utilização de medidas mitigadoras) foram capturadas 205 aves. Além da redução da pesca incidental de aves marinhas, as medidas de mitigação também permitem a redução nas perdas das iscas predadas pelas espécies não alvo, favorecendo o aspecto econômico (LØKKEBORG, 2003). Dessa forma, pode-se evidenciar a importância dos estudos com populações afetadas pelas diversas atividades antrópicas ao apresentar o grau de interferência na manutenção populacional das espécies relacionadas, além de promover ações e acordos mitigatórios para a conservação da fauna marinha.

2.4 O ESTUDO DA FAUNA PARASITÁRIA: IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES AMBIENTAIS

Comparativamente a outros organismos, espécies parasitárias são pouco estudadas, provavelmente por possuírem ciclos biológicos complexos, geralmente reduzido tamanho e taxonomia muitas vezes confusa (GÓMEZ; NICHOLS, 2013). Por vezes, como não são vistos, são negligenciados (AMATO; AMATO, 2010).

As diversas espécies parasitárias apresentam variação no número e no tipo de hospedeiros, ou seja, algumas não necessitam de hospedeiros intermediários ou vetores, algumas parasitam apenas um hospedeiro definitivo ou diversas espécies (NEVES, 2009).

Para poderem completar seu ciclo de vida, muitas espécies de parasitos utilizam as interações predador-presa, sendo assim transmitidos pela cadeia trófica. Dessa forma, o hospedeiro se infecta somente dentro da área endêmica do parasito em particular, a qual deve apresentar as condições necessárias, como temperatura e salinidade, e todas as espécies hospedeiras requeridas para completar o seu ciclo de vida (LAFFERTY, 2013; MACKENZIE, 2005; VIDAL-MARTÍNEZ *et al.*, 2010).

No caso de parasitismo por trematódeos, a riqueza, abundância e heterogeneidade das aves hospedeiras dentro de uma comunidade estão positivamente correlacionadas com a riqueza, abundância e heterogeneidade dos parasitos nos hospedeiros intermediários. Dessa forma, as comunidades ricas e abundantes podem promover o parasitismo (HECHINGER; LAFFERTY, 2005).

Para aves migratórias, verificou-se recentemente que não há relação entre a riqueza parasitária e a distância percorrida durante a migração. A riqueza de espécies de helmintos eleva-se de acordo com uma dieta variável, sem necessariamente sofrer os efeitos de outras características ecológicas. Portanto, aves migratórias que exploram diversos habitats e dietas podem estar mais expostas a uma também diversificada comunidade parasitária (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Espécies parasitárias geralmente utilizam hospedeiros específicos, sendo estes uma única espécie ou um número pequeno de espécies hospedeiras. Esta interação espécie-específica pode decorrer da coevolução entre os indivíduos ou como resultado de fenômenos ecológicos imediatos (POULIN; MORAND, 2000). A coevolução ocorre quando dois organismos, neste caso parasito e hospedeiro, influenciam mutuamente suas mudanças evolutivas. Exemplo ocorre quando um hospedeiro gera resistência contra um parasito e o mesmo subsequentemente evolui em resposta a esta defesa; dessa forma, a seleção se torna

recíproca favorecendo uma evolução conjunta e equilibrada entre parasito e hospedeiro (PENN, 2001).

Mesmo quando há especificidade parasito-hospedeira, períodos de estresse podem afetar a distribuição e abundância de parasitos no hospedeiro. Além disso, o parasitismo por agentes exóticos, ou seja, quando passam a infectar novas espécies hospedeiras, podem causar alterações nos sistemas orgânicos (EIRAS, 1994; PEDERSEN *et al.*, 2007). Um exemplo ocorre quando a lontra marinha se alimenta de crustáceos parasitados por acantocéfalos adaptados ao intestino de aves marinhas. Devido a diferenças intestinais significativas entre ambas as espécies, ao invés de se fixar na mucosa intestinal, o parasito a perfura, acarretando em peritonite e consequente morte do hospedeiro (THOMAS; COLE, 1996).

A maioria dos helmintos encontrados em aves marinhas são componentes da fauna parasitária comum e causam o óbito de seus hospedeiros quando em infecções graves (GALAKTIONOV, 1996). Os efeitos de certas espécies de nematódeos em comunidades de aves sugerem que estes parasitos podem modificar o comportamento reprodutivo e outras características comportamentais nas aves (FAGERHOLM, 1996).

Uma alta virulência pode ser devido ao crescimento e a multiplicação de um parasito (i. e., tanto organismos metazoários, quanto vírus, bactérias, fungos, protozoários), onde o mesmo utiliza recursos energéticos, causa danos teciduais ou produz toxinas em seus hospedeiros. Além disso, a elevação no grau de virulência pode ocorrer em resposta a mudanças na resistência do hospedeiro. Dessa forma, um parasito pode apresentar mais virulência quando a resistência de seu hospedeiro torna-se reduzida ou apresenta resposta exacerbada (PENN, 2001).

A dinâmica hospedeiro-parasito que ocorre no ambiente natural pode ser afetada também quando ocorre a introdução de animais domésticos durante a colonização de novas áreas. Espécies novas podem passar a infectar os animais domésticos e/ou animais silvestres. No entanto, os impactos destas alterações são pouco documentados em parte pelo fato de que a maior parte dos efeitos são menores quando comparados a outras interferências na conservação da vida silvestre (doenças virais/bacterianas, compostos químicos, resíduos sólidos, pesca, dentre outros) (WEINSTEIN; LAFFERTY, 2015).

Observa-se que algumas espécies parasitárias de ambientes degradados são mais generalistas, parasitando hospedeiros com maior abundância ou apresentam comportamento oportunista ao parasitar hospedeiros imunologicamente enfraquecidos (LAFFERTY, 2013). Além disso, em habitats degradados a redução no número dos

hospedeiros reduz também as transmissões parasitárias, principalmente aquelas com transmissão densidade-dependente (WOOD; LAFFERTY; MICHELI, 2010).

Os poluentes marinhos também podem afetar de forma positiva, negativa ou nula as respostas fisiológicas e/ou numéricas de algumas espécies de parasitos (SURES, 2008). E ao contrário do que se possa acreditar, os parasitos podem desaparecer antes de seus hospedeiros (LAFFERTY, 2013). Em alguns casos, os parasitos podem ser mais sensíveis aos poluentes do que seus hospedeiros, sendo que os efeitos podem variar de acordo com as espécies parasitárias e entre os estágios de desenvolvimento (fases larvais ou adultos) (SURES, 2004). No entanto, em outros casos os parasitos contribuem para a mortalidade de aves como em altas infecções observadas em corvo-marinho-de-crista (*Phalacrocorax aristotelis*) quando há contaminação com xenobióticos, como o óleo, e/ou efeitos sinérgicos causados por outros bioagressores (ABOLLO; GESTAL; PASCULA, 2001).

As aves que ingerem petróleo (óleo cru) após derramamento podem apresentar carga parasitária gastroentérica reduzida devido a potenciais efeitos anti-helmínticos, principalmente daquelas espécies parasitárias que não permanecem fixadas à mucosa e/ou devido ao período de inanição que antecede ao óbito nestes casos (THIELTGES; HUSSEL; BAEKGAARD, 2006). O contato com o óleo cru reduz o parasitismo por digenéticos e acantocéfalos, em contrapartida, facilita o aumento de ciliados, trematódeos e monogenóides (KHAN, 1987; LAFFERTY, 1997).

Os compostos químicos e os elementos traço também geram efeitos negativos pela possibilidade de funcionarem como substâncias anti-helmínticas (LAFFERTY, 1997). A concentração média de cádmio nos estágios larvais do acantocéfalo *Pomphorhynchus laevis* foi aproximadamente $1,8 \cdot 10^2$ vezes mais baixa do que a encontrada no parasito adulto. Além disso, as concentrações de chumbo e cádmio no acantocéfalo adulto foram $2,7 \cdot 10^3$ e $4,0 \cdot 10^2$ vezes maiores, respectivamente do que a concentração muscular na espécie de peixe hospedeira, e $1,1 \cdot 10^4$ e $2,7 \cdot 10^4$ vezes maiores do que a encontrada na água (SURES; TARASCHEWSKI, 1995; SURES; TARASCHEWSKI; JACKWERTH, 1994). Estes estudos evidenciam que o acúmulo de elementos traço, a partir da poluição marinha, ocorre não somente dentro da cadeia trófica, mas também durante as fases de desenvolvimento parasitário.

Dessa forma, importante aspecto no estudo de parasitos marinhos deve-se ao fato de que estes organismos podem ser utilizados como biomarcadores, principalmente àqueles relacionados com espécies de peixes utilizados comercialmente (MACKENZIE, 2005). Os biomarcadores refletem os impactos por responderem às modificações ambientais

ao alterar sua fisiologia, composição química e/ou seu comportamento (SURES, 2004; VIDAL-MARTÍNEZ *et al.*, 2010).

Observa-se variadas possibilidades de respostas do parasitismo perante os fatores estressantes ambientais como a (1) elevação do grau de parasitismo devido a maior suscetibilidade do hospedeiro definitivo e/ou devido ao aumento da abundância dos hospedeiros intermediários ou vetores; (2) redução do parasitismo se os hospedeiros infectados sofrerem alta mortalidade e/ou devido a redução da abundância dos hospedeiros intermediários ou dos vetores; (3) entrada de novas doenças às populações nativas suscetíveis a partir da introdução de indivíduos exóticos (LAFFERTY; KURIS, 1999).

Na medicina humana, no início do século XXI, foram descritos aproximadamente 1415 microrganismos patogênicos conhecidos por infectar humanos. Deste total, 132 foram considerados emergentes e com potencial zoonótico (TAYLOR; LATHAM; HOOLHOUSE, 2001). Dessa forma, relevância deve ser dada também para a compreensão dos fenômenos biológicos que propiciam a transferência de patógenos entre os hospedeiros (humanos e animais), além da especiação e diversificação das espécies parasitárias (PENN, 2001).

Dentro do conceito de saúde única, doenças parasitárias podem ser denominadas também de “doenças de pobreza” (atualmente conhecida doenças negligenciadas), ou seja, são doenças que ocorrem nas camadas mais pobres da população, as quais não possuem adequadas condições de moradia, trabalho, educação e serviços sanitários. Comparativamente, em países atualmente conhecidos como desenvolvidos tais doenças também eram frequentes há um século. No entanto, pelo desenvolvimento da educação e pelas contínuas e eficientes implantações de medidas sanitárias muitas delas foram controladas e erradicadas (NEVES, 2009).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas e revisões frequentemente evidenciam a variedade de respostas que a interação hospedeiro-parasito oferece para a conservação das espécies. Observa-se variação também nas respostas de acordo com as espécies envolvidas e com o ambiente em que estão inseridos.

Por serem animais sentinelas, as aves marinhas apresentam vasto universo para os estudos ecológicos e epidemiológicos. De forma conjunta, os parasitos são componentes estratégicos dos ecossistemas e apresentam funções importantes ao estarem

inseridos no ciclo evolutivo de muitas, se não todas, as espécies de invertebrados e vertebrados, terrestres e marinhos.

Efeitos negativos desta interação (negativos perante uma limitada compreensão sobre as regulações e dinâmicas populacionais) podem ocorrer, tanto para as espécies parasitárias quanto para seus hospedeiros intermediários e definitivos. Estes efeitos podem ser, dentre outros, a redução na abundância dos parasitos ou dos hospedeiros, alterações fisiológicas e comportamentais de ambos ou a geração de danos teciduais aos hospedeiros. Independente do efeito, as consequências podem ser relevantes para tal ecossistema que as espécies estão inseridas.

A quebra do equilíbrio da interação parasito-hospedeiro pode ocorrer por diversos motivos, no entanto, há uma crescente e constante facilitação por meio de ações humanas como a poluição e a degradação ambientais e a introdução de espécies exóticas.

Alguns estudos estão relacionados às espécies com relevância nas saúdes animal e humana, ou seja, aqueles que geram quadros clínicos, perdas econômicas e desafios à saúde pública, enquanto outros apresentam resultados voltados para uma compreensão da interação parasito-hospedeiro e do modo como o parasito atua nas populações (forma nula, positiva ou negativa).

No contexto de saúde única, entende-se que três componentes interagem constantemente: hospedeiro, agente infeccioso/parasitário e ambiente. Quando ocorrem desequilíbrios na interação de um ou mais desses componentes eleva-se a probabilidade de resultados negativos. Dessa forma, é crescente o interesse sobre a interdisciplinaridade para que além de identificar os agentes parasitários, possa-se associá-los aos outros importantes componentes, inclusive o ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABOLLO, E.; GESTAL, C.; PASCUAL, S. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. **Journal of Helminthology**, Londres, v. 75, n. 3, p. 209-214, 2001.
- ALTRÃO, C. S.; DE PAULA, A. A.; TAVARES, M.; OTT, P. H.; SILVA-SOUZA, A. T. Population structure of the nematode *Contracaecum pelagicum* Johnston & Mawson, 1942 during the winter migration of the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* (Forster, 1781) in southern Brazil. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2017.
- AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: VON MATTER, S.; STRAUBE, F. C.; DE QUEIROZ PIACENTINI, V.; ACCORDI, I. A.; CÂNDIDO, J. J. F. **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p 369-393.
- BARNES, D. K.; GALGANI, F.; THOMPSON, R. C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, Londres, v. 364, n. 1526, p. 1985-1998, 2009.
- BRANDÃO, M.; LUQUE, J. L.; SCHOLZ, T.; KOSTADINOVA, A. New records and descriptions of digeneans from the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Aves: Sphenisciformes) on the coast of Brazil. **Systematic Parasitology**, Suíça, v. 85, n. 1, p. 79-98, 2013.
- BRANDÃO, M. L.; MOREIRA, J.; LUQUE, J. L. Checklist of Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda and Arthropoda parasitizing penguins of the world. **Check List**, v. 10, n. 3, p. 562-573, 2014.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Marine birds as sentinels of environmental pollution. **Ecohealth**, Nova Iorque, v. 1, p. 263-274, 2004.
- CAMPHUYSEN, C. J.; VAN FRANEKER, J. A. **The value of beached bird surveys in monitoring marine oil pollution**. Vogelbescherming Nederland, 1992.
- CAMPOS, S. D. E.; ALMOSNY, N. R. P.; SICILIANO, S.; COSTA, C. H. C.; BRENER, B. Co-infecção e aspectos morfológicos de *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) e *Cardiocephaloides physalis* (Digenea: Strigeidae) em pinguim-de-Magalhães na baixada litorânea do Rio de Janeiro. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1646-1652, 2015.
- CASTRO, A. G. M. Doenças do Sistema Respiratório. In: B. JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p 71-74.
- COLABUONO, F. I.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. Organochlorine contaminants in albatrosses and petrels during migration in South Atlantic Ocean. **Chemosphere**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 701-708, 2012.

CORK, S. C.; ALLEY, M. R.; JOHNSTONE, A. C.; STOCKDALE, P. H. G. Aspergillosis and other causes of mortality in the stitchbird in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, p. 481-486, 1999.

CRIBB, T. H. Helminth Parasites: Digenea (endoparasitic flukes). In: ROHDE, K. (Ed.) **Marine Parasitology**. Australia: CSIRO e CABI Publ. Melbourne and Wallingford, 2005. p 76-87.

DIAZ, J. I.; CREMONTE, F.; NAVONE, G. T. Helminths of the Magellanic penguin, *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes), during the breeding season in Patagonian Coast, Chubut, Argentina. **Comparative Parasitology**, Lawrence, v. 77, n. 2, p. 172-177, 2010.

DIAZ, J. I.; FUSARO, B.; LONGARZO, L.; CORIA, N. R.; VIDAL, V.; D'AMICO, V.; BARBOSA, A. Gastrointestinal helminths of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) from Antarctica. **Polar Research**, Londres, v. 35, n. 1, p. 285-16, 2016.

DRONEN, N. O.; BLEND, C. K.; GARDNER, S. L.; JIMENEZ, F. A. *Stictodora cablei* n. sp. (Digenea: Heterophyidae) from the royal tern, *Sterna maxima* (Laridae: Sterninae) from Puerto Rico and the Brazos County area of the Texas Gulf coast, USA, with a list of other endohelminths recovered in Texas. **Zootaxa**, Auckland, v. 1432, n. 1, p. 35-56, 2007.

EIRAS, J.C. Platelminha. In: _____. **Elementos de Ictioparasitologia**. Porto: Fundação Eng Antonio de Almeida, 1994. p 147-169.

ERASMUS, D. A. General Features. In: _____. **The Biology of Trematodes**. Londres: Edward Arnold Ltd, 1972. p 1-35.

FAGERHOLM, H. P. Nematode parasites of marine-and shore birds, and their role as pathogens. **Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 16-30, 1996.

FREITAS, J. F. T. Sobre dois trematódeos parasitos de aves: *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 e *Renicola mirandaribeiroi* n. sp. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 585-610, 1955.

FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, C. J. Seabirds as monitors of the marine environment. **ICES Journal of Marine Science**, Oxford, v. 54, p. 726 -737, 1997.

GALAKTIONOV, K. V. Impact of seabird helminths on host populations and coastal ecosystems. **Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology**, v. 6, p. 50-64, 1996.

GAYNOR, A. M.; FISH, S.; DUERR, R. S.; CRUZ JR, F. D.; PESAVENTO, P. A. Identification of a novel papillomavirus in a Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*) with viral production in cartilage. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 52, n. 3, p. 553-561, 2015.

GENNARI, S. M.; NIEMEYER, C.; SOARES, H. S.; MUSSO, C. M.; SIQUEIRA, G. C.; CATÃO-DIAS, J. L.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos Archipelago, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 226, p. 50-52, 2016.

- GIBSON, D. I. Class Trematoda Rudolph, 1808. In: _____. **Trematoda** – Part IV – Guide to the parasites of fishes of Canada. National Research Press Council of Canada, Ottawa, p. 5 - 10. 1996.
- GIBSON, D. I.; Class Trematoda Rudolphi, 1808; In: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. **Keys to the Trematoda**, CABI Publishing, London, UK, v. 1, 2002.
- GÓMEZ, A.; NICHOLS, E. Neglected wild life: parasitic biodiversity as a conservation target. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, Amsterdam, v. 2, p. 222-227, 2013.
- GRANOVITCH, A. I.; MIKHAILOVA, N. A. Rocky shore trematodes of the west coast of Sweden: distribution and life cycle strategies. **Acta Parasitologica**, Suíça, v. 49, n. 3, p. 000-000, 2004.
- GUTIÉRREZ, J. S.; RAKHIMBERDIEV, E.; PIERSMA, T.; THIELTGES, D. W. Migration and parasitism: habitat use, not migration distance, influences helminth species richness in Charadriiform birds. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 1137-1147, 2017.
- HECHINGER, R. F.; LAFFERTY, K. D. Host diversity begets parasite diversity: bird final hosts and trematodes in snail intermediate hosts. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, Londres, v. 272, n. 1567, p. 1059-1066, 2005.
- HECHINGER, R. F.; LAFFERTY, K. D.; HUSPENI, T. C.; BROOKS, A. J.; KURIS, A. M. Can parasites be indicators of free-living diversity? Relationships between species richness and the abundance of larval trematodes and of local benthos and fishes. **Oecologia**, Berlim, v. 151, n. 1, p. 82-92, 2007.
- HENEBERG, P.; SITKO, J.; BIZOS, J.; HORNE, E. C. Central European parasitic flatworms of the family Rencolidae Dollfus, 1939 (Trematoda: Plagiorchiida): molecular and comparative morphological analysis rejects the synonymization of *Renicola pinguis* complex suggested by Odening. **Parasitology**, Londres, v. 143, n. 12, p. 1592-1604, 2016.
- HOBERG, E. P. Faunal diversity among avian parasite assemblages: the interaction of history, ecology, and biogeography in marine systems. **Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 65-89, 1996.
- HOBERG, E. P. Marine birds and their helminths parasites. In: ROHDE, K. (Ed.) **Marine Parasitology**. Australia: CSIRO e CABI Publ. Melbourne and Wallingford, 2005. p 414-425.
- HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.
- JERDY, H.; BALDASSIN, P.; WERNECK, M.R.; BIANCHI, M.; RIBEIRO, R.B.; CARVALHO, E.C.Q. First report of kidney lesions due to *Renicola* sp. (Digenea: Trematoda) in free-living Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) found on the coast of Brazil. **Journal of Parasitology**, Cairo, n. 102, v. 6, p.650-652, 2016.
- KHAN, R. A. Crude oil and parasites of fish. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 99-100, 1987.

KUIKEN, T.; WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A.; HAINES, D. M.; CHELACK, B.; BOGDAN, J.; HASSARD, L.; HECKERT, R. A.; RIVA, J. Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n. 1, p. 8-23, 1999.

LAFFERTY, K. D. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment?. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 13, p. 251-255, 1997.

LAFFERTY, K.D. Parasites in marine food webs. **Bulletin of Marine Science**, Miami, v. 89, n. 1, p. 123-134, 2013.

LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M. How environmental stress affects the impacts of parasites. **Limnology and Oceanography**, Washington, v. 44, n. 3, p. 925-931, 1999.

LEE, S. Y.; KIM, J. H.; PARK, Y. M. SHIN, O. S.; KIM, H.; CHOI, H. G.; SONG, J. W. A novel adenovirus in Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) in Antarctica. **Viruses**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 2052-2061, 2014.

LEIGHTON, F. A. Clinical, gross, and histological findings in herring gulls and Atlantic puffins that ingested Prudhoe Bay crude oil. **Veterinary Pathology**, Basel, n. 23, v. 3, p. 254-263, 1986.

LEIGHTON, F. A. The toxicity of petroleum oils to birds. **Environmental Reviews**, Ottawa, v. 1, n. 2, p. 92-103, 1993.

LØKKEBORG, S. Review and evaluation of three mitigation measures - bird-scaring line, underwater setting and line shooter - to reduce seabird bycatch in the north Atlantic longline fishery. **Fisheries Research**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 11-16, 2003.

MACKENZIE, K. Parasites as biological tags. In: ROHDE, K. (Ed.) **Marine Parasitology**. Austrália: CSIRO e CABI Publ. Melbourne and Wallingford, 2005. p 351-355.

MARIANI, D. B. Causas de encalhes de aves marinhas no nordeste do Brasil. Dissertação (Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2016.

MARTIN, W. E. Larval stages of renicolid trematodes. **Transactions of the American Microscopical Society**, Malden, v. 90, p. 188-194, 1971.

MELO, C. M. F.; OLIVEIRA, J. B.; ATHAYDE, A. C. R.; DANTAS, A. F. M.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; MENEZES, D. J. A.; WAGNER, P. G. C. Identification of parasites in *Puffinus puffinus* (Birds, Procellariiformes) from Northeastern Brazil. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 26, p. 235-238, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards**, Washington: The National Academy Press, 1991. 176 p.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 3thed. São Paulo: Atheneu, 2009. 592 p.

- NEVES, T.; BUGONI, L.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. **Aves oceânicas e suas interações com a pesca na Região Sudeste-Sul do Brasil**. São Paulo: Instituto Oceanográfico USP (Série documentos Revizee: Score Sul), 2006. 104 p.
- NIEMEYER, C.; FAVERO, C. M.; SHIVAPRASAD, H. L.; UHART, M.; MUSSO, C. M.; RAGO, M. V.; SILVA-FILHO, R. P.; CANABARRO, P. L.; CRAIG, M. I.; OLIVEIRA, V.; PEREDA, A.; BRANDÃO, P. E.; CATÃO-DIAS, J. L. Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 6, e0178811, 2017.
- OVERSTREET, R. M.; CURRAN, S. S. Parasites of the American white pelican. **Gulf and Caribbean Research**, Mississippi, v. 17, p. 31-48, 2005.
- PEDERSEN, A. B.; JONES, K. E.; NUNN, C. L.; ALTIZER, S. Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 21, n. 5, p. 1269-1279, 2007.
- PENN, D. J. Coevolution: Host-Parasite. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 8, p. 213-219, 2001.
- PETRY, M. V.; BENEMANN, V. R. Ingestion of marine debris by the White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*): Is it increasing over time off southern Brazil?. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 117, p. 131-135, 2017.
- PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring renicolid cercariae (Trematoda: Rencolidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, Cairo, v. 98, n.4, p. 784-787, 2012.
- POULIN, R.; MORAND, S. The diversity of parasites. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 75, n. 3, p. 277-293, 2000.
- PRADO, M. I. B. D. M.; SANTOS-LOPES, A. R. D.; SILVA, R. J. D. Helminthfauna of Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus* Foster, 1781) proceeding from Ilha Comprida, South Coast, State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Helminthology**, Lima, p. 50-55, 2011.
- PREVOT, G.; P. BARTOLI. Le cycle de développement de *Renicola lari* J. Timon-David, 1953 (Trematoda, Rencolidae). **Annales de Parasitologie**, v. 53, p. 561-575, 1978.
- ROUTTU, J.; GRUNBERG, D.; IZHAR, R.; DAGAN, Y.; GUTTEL, Y.; UCKO, M.; BEN-AMI, F. Selective and universal primers for trematode barcoding in freshwater snails. **Parasitology Research**, Berlim, v. 113, n. 7, p. 2535-2540, 2014.
- RUBIO-GODOY, M.; DE LEÓN, G. P. P.; MENDOZA-GARFIAS, B.; CARMONA-ISUNZA, M. C.; LA MORA, A. N. D.; DRUMMOND, H. Helminth parasites of the blue-footed booby on Isla Isabel, México. **Journal of Parasitology**, Cairo, v. 97, n. 4, p. 636-641, 2011.

SAVIOLLI, J. Y.; CUNHA, M. P. V.; GUERRA, M. F. L.; IRINO, K.; CATÃO-DIAS, J. L.; DE CARVALHO, V. M. Free-ranging frigates (*Fregata magnificens*) of the southeast coast of Brazil harbor extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* resistant to antimicrobials. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. e0148624, 2016.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. 2thed. Iowa: John Wiley & Sons, 2015. 298 p.

SCHRAMM, C. C.; MASCARENHAS, C. S.; GASTAL, S. B.; SCHEER, S.; MÜLLER, G.; ROBALDO, R. B. *Acuariidae* (Nematoda) in Procellariiformes (Aves) on the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2018.

SERAFINI, P. P.; LUGARINI, C. Procellariiformes e outras aves de ambientes marinhos (albatroz, petrel, fragata, atobá, biguá, gaivota). In: Cubas, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2thed. São Paulo: Editora Roca, 2014. p 470-494.

SEUNG-HEON, S.; PONIKAU, J. U.; SHERRIS, D. A.; CONGDON, D.; FRIGAS, E.; HOMBURGER, H. A.; SWANSON, M. C.; GLEICH, G. J.; HIROHITO, K. Chronic rhinosinusitis: An enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 114, n. 6, p. 1369-1375, 2004.

SHMIDT G.D.; ROBERTS, L.S. Trematoda: Form, Function, and Classification of Digeneans. In: _____. **Foundations of Parasitology**. 8thed. McGraw Companies, New York, p. 219-245, 2009.

SICILIANO, S.; ALVES, V. C.; HACON, S. Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: uma revisão do conhecimento brasileiro. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 927-946, 2005.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 910 p.

SIEBERT, U.; SCHWEMMER, P.; GUSE, N.; HARDER, T.; GARTHE, S.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; WOHLSEIN, P. Health status of seabirds and coastal birds found at the German North Sea coast. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 54, n. 1, p. 43, 2012.

SPOTORNO, B.; COLABOUNO, F.; BARQUETE, V.; VOOREN, C. **Lesiones causadas por nemátodos en el proventrículo de procellariiformes en el litoral sur del Brasil**. 2005. Disponível em: <<http://www.schcm.cl/web/images/congresos/>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2018.

STALLKNECHT, D. E.; SHANE, S. M. Host range of avian influenza virus in free-living birds. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 12, n. 2, p. 125-141, 1988.

STUNKARD, H. W. Studies on the trematode genus *Renicola*: observations on the life-history, specificity, and systematic position. **The Biological Bulletin**, v. 126, n. 3, p. 467-489, 1964.

SURES, B. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 170-177, 2004.

SURES, B. Host-parasite interactions in polluted environments. **Journal of Fish Biology**, Liverpool, v. 73, n. 9, p. 2133-2142, 2008.

SURES, B.; TARASCHEWSKI, H. Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. **Parasitology Research**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 494-497, 1995.

SURES, B.; TARASCHEWSKI, H.; JACKWERTH, E. Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. **Journal of Parasitology**, Cairo, v. 80, n. 3, p. 355-357, 1994.

TAMIASSO, N. V.; ZOCATELLI, T. F.; MARTINS, S.; SANTOS, M.; DE AVELAR, B. R.; FREIRE MARTINS, I. V.; DE CARVALHO NUNES, L. Identification of parasites and gross findings in Magellanic Penguins in Espírito Santo, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 23, n. 1, 2018.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, Londres, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

THATCHER, V. E. **Trematódeos Neotropicais**. INPA, Manaus, 1993, p. 553

THIELTGES, D. W.; HUSSEL, B.; BAEKGAARD, H. Endoparasites in common eiders *Somateria mollissima* from birds killed by an oil spill in the northern Wadden Sea. **Journal of Sea Research**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 301-308, 2006.

THOMAS, N. J.; COLE, R. A. The risk of disease and threats to the wild population. **Endangered Species Update**, Michigan, v. 13, n. 2, p. 24-28, 1996.

VELARDE, R.; CALVIN, S. E.; OJKIC, D.; BARKER, I. K.; NAGY, É. Avian influenza virus H13 circulating in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) in southern Ontario, Canada. **Avian Diseases**, Amherst, v. 54, n. 1, p. 411-419, 2010.

VIDAL-MARTÍNEZ, V. M.; PECH, D.; SURES, B.; PURUCKER, S. T.; POULIN, R. Can parasites really reveal environmental impact?. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n.1, p. 44-51, 2010.

WARD, M. P.; MAFTEI, D. N.; APOSTU, C. L.; SURU, A. R. Association between outbreaks of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 and migratory waterfowl (Family Anatidae) populations. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 56, p. 1-9, 2009.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WEINSTEIN, S. B.; LAFFERTY, K. D. How do humans affect wildlife nematodes?. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 222-227, 2015.

WILCOX, C.; VAN SEBILLE, E.; HARDESTY, B. D. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 38, p.11899-11904, 2015.

WOOD, C. L.; LAFFERTY, K. D.; MICHELI, F. Fishing out marine parasites? Impacts of fishing on rates of parasitism in the ocean. **Ecology Letters**, Oxford, v. 13, p. 761-775, 2010.

WRIGHT, C. A. Trematodes of the genus *Renicola* from birds in British zoos, with descriptions of two new species. **Proceedings of the Zoological Society of London**, Oxford, v. 124, n. 1, p. 51-61, 1954a.

WRIGHT, C. A. Trematodes of the genus *Renicola* from the kidneys of birds in Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 14, p. 61-64, 1954b.

WRIGHT, C. A. Studies on the life-history and ecology of the trematode genus *Renicola* Cohn, 1904. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**, Oxford, v. 126, p. 1-50, 1956.

WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, Nova Iorque, v. 178, p. 483-492, 2013.

ZAMPIERI, B. D. B.; MARANHO, A.; DE OLIVEIRA, A. J. F. C. Grupos de fungos e bactérias isolados no trato respiratório de aves marinhas em reabilitação na região costeira da Baixada Santista. **Natural Resources**, Aracaju, v. 3, n. 1, p. 14-25, 2013.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar os trematódeos renais em *Puffinus puffinus* encalhados no litoral do Estado do Paraná e avaliar as alterações renais e sistêmicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os trematódeos renais por métodos histológicos e moleculares.

Caracterizar as alterações renais, estabelecer escore lesional e avaliar a associação com a presença dos parasitos.

Estabelecer o índice de saúde e avaliar a correlação entre o escore de lesões sistêmicas e a presença dos parasitos.

Avaliar se há correlação entre a interação antrópica (pesca, resíduos sólidos, petróleo, agressão), alterações renais e sistêmicas e presença dos parasitos.

4 ARTIGO 1

Molecular identification and histological aspects of *Renicola sloanei* (Digenea: Rencolidae) in *Puffinus puffinus* (Aves: Procellariiformes): first records*

Identificação molecular e aspectos histológicos de *Renicola sloanei* (Digenea: Rencolidae) em *Puffinus puffinus* (Aves: Procellariiformes): primeiros registros

Abstract

Renicolids are parasites that inhabit the renal tubules and ureters of molluscivorous and piscivorous birds. *Puffinus puffinus* is a migratory seabird that was identified as the definitive host of *Renicola* spp. Studies focusing on the renicolid species and the resulting renal lesions are valuable for their association with causes of stranding in seabirds. The aim of this study was to identify the renicolid trematodes and evaluate the histological findings in two *P. puffinus* stranded on the coast of Paraná state, Brazil. The parasites were evaluated by histologic, ultrastructural and molecular assays, while tissue changes were analyzed by histologic methods. The morphological and morphometrical characteristics of the parasites, along with polymerase chain reaction and sequencing assays (ribosomal and mitochondrial regions), identified the species as *Renicola sloanei*. The results also suggest that this helminth can be the adult form of *Cercaria pythionike*. The dilation of collecting ducts was the main histological finding in the kidneys. In conclusion, *R. sloanei* was identified, and for the first time, *P. puffinus* was described as a host of this digenean inducing mild renal changes.

Keywords: Histopathological; Kidney; Manx shearwater; Renicolid; Seabirds; Trematoda.

Resumo

Renicolídeos são parasitos que habitam túbulos renais e ureteres de aves que se alimentam de moluscos e peixes. *Puffinus puffinus*, ave marinha migratória, foi registrada como hospedeiro definitivo de *Renicola* spp. Estudos relacionados com as espécies de renicolídeos e as lesões renais resultantes são importantes para o entendimento das causas de óbito de aves marinhas.

*Manuscrito aceito e em fase de correção, na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. Encontra-se no Anexo 1 as informações sobre a formatação.

O objetivo deste estudo foi identificar os trematódeos renicolídeos e avaliar os achados histológicos em dois *P. puffinus* encalhados no litoral do Estado do Paraná, Brasil. Os parasitos foram avaliados por exames histológicos, ultraestruturais e moleculares, enquanto as alterações teciduais foram analisadas por métodos histológicos. As características morfológicas e morfométricas dos parasitos, juntamente com a reação em cadeia da polimerase e sequenciamento (regiões ribossomal e mitocondrial), identificaram a espécie como *Renicola sloanei*. Os resultados também sugerem que este helminto pode ser a forma adulta de *Cercaria pythionike*. A dilatação dos ductos coletores foi o principal achado histológico renal. Em conclusão, *R. sloanei* foi identificado, e pela primeira vez *P. puffinus* foi descrito como hospedeiro deste digenético induzindo alterações renais discretas.

Palavras-chave: Aves marinhas; Bobo-pequeno; Histopatologia; Renicolídeo; Rins; Trematoda.

Introduction

Puffinus puffinus (*P. puffinus*), a procellariiform popularly known as the Manx shearwater, remains in Europe during the breeding season and then migrates to the South Atlantic between September and February for feeding. The entire Brazilian coast is a feeding ground for *P. puffinus* (SICK, 1997). The first description of a parasitic renal infection in this bird was in 1956 when two renicolid trematodes were morphologically identified, with differences only in the extent of the vitelline glands (WRIGHT, 1956).

Digeneans of the *Renicola* genus, which includes approximately 28 species, inhabit the renal tubules and ureters of birds that eat bivalves and fish (WRIGHT, 1954a; GIBSON, 2008; WoRMS, 2018). The infection by this genus was previously described in *P. puffinus*, where the large number of worms induced the dilation of some renal tubules and ducts and occluded others due to the increased pressure (WRIGHT, 1956). In the same study, morphological similarities were identified between *Renicola* sp. in these birds and *Renicola sloanei* (identified in other species of marine birds) including a suggested association between this adult parasite and the *Cercaria pythionike* metacercariae (WRIGHT, 1956). In addition, *R. sloanei* was also reported in *Uria aalge* (COLE, 1959).

In Brazil, there are previous descriptions of *Renicola* sp. from *Sterna* spp., *Larus dominicanus*, and *Sula leucogaster* belonging to the Instituto Oswaldo Cruz collection

(WRIGHT, 1954b). More recently, *Renicola* sp. was reported in *Spheniscus magellanicus* (JERDY et al., 2016).

Parasitic fauna studies can provide information about the distribution, feeding habits and population stocks of both intermediate and definitive hosts, however, data about the complex biology and ecology still insufficient in this context (MACKENZIE et al., 2008). In a first study in the Brazilian Northeast region including *P. puffinus*, various ectoparasites and endoparasites species were identified (MELO et al., 2012); however, renal digeneans were not described. Considering these aspects, the aim of this study was to identify the renicolid trematodes in *P. puffinus* using morphological and molecular assays and to evaluate the renal histological lesions.

Materials and methods

Hosts

Two *P. puffinus* found dead in December 2017, stranded in the Paraná state (25°44'S and 48°29'W), southern Brazil, were submitted to necropsy as part of the ongoing monitoring of the stranding program as part of the Santos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS). The collet of two animals was granted by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources - Ministry of Environment (n° 640/2015).

Histological analysis of kidneys

Kidney samples were fixed in 10% buffered formalin solution, dehydrated in increasing alcohols and embedded in paraffin. Sections of 4 µm were stained with hematoxylin and eosin for histologic analysis.

Histological preparation of helminths

The worms were fixed in AFA (a solution of ethanol, formaldehyde, and acetic acid), stained with Mayer's carmalum (MC) and Delafield's hematoxylin (DH) and mounted on histological slides with Entellan® (Merck, Germany) (AMATO & AMATO, 2010).

The voucher specimens on permanent slides were then deposited in the Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CHIOC numbers 39034 and 39035), Rio de Janeiro, Brazil.

Measures of helminths

All measurements were done based on Wright (1954b; 1956) using an Opticam Microscopy Technology 0500R (Doral, FL, USA) image analysis system.

The following parameters were measured: body (length and width; the maximum body width and the width in the ventral sucker level), oral sucker (length and width), pharynx (length and width), ventral sucker (length and width), and the spines in the medium lateral level of the body (length). For the evaluation of the eggs (length and width), 10 mature eggs (with a brown-shell and containing a miracidium) per renicolid were selected. To assess the extension of the vitelline glands and the caeca, the body length was divided into five equal parts.

A descriptive statistical analysis was conducted to calculate the mean, standard deviation (SD), maximum and minimum values for each character, and the length/width ratios for the suckers and the body.

Ultrastructural assessment

The digenean parasites sampled from *P. puffinus* were submitted to scanning electron microscopy (SEM). The parasites were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 24 h. The specimens were then washed with sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) and treated with 1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 1 h before being gradually dehydrated in ethanol (70, 80, 90 and 100%) and dried to the critical point (Critical Point Dryer CPD 030, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein). The dried parasites were coated with gold (Sputter Coater SDC 050, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein) and analysed using a scanning electron microscope (FEI Quanta 200, Eindhoven, Netherlands/Holland).

DNA Extraction, PCR, and sequencing

Trematodes were removed from the kidneys and the DNA extraction was carried out using a commercial kit (DNeasy Blood and Tissue™ kit, QIAGEN®, Valencia, CA). The Table 1 shows the primers, the annealing temperatures, and the references of each primer used to perform the amplification of the ITS2 (internal transcribed spacer 2), ND1 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, subunit 1), and CO1 (cytochrome C oxidase, subunit 1) regions.

The PCR amplicons were detected by electrophoresis on 2% agarose gel in a TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) containing ethidium bromide (0.5

µg/ml) and visualized under UV light. The PCR amplicons were purified using the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and quantified using a Qubit® Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA). The PCR amplicons were then sequenced using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the forward and reverse primers used in the PCR assay.

Table 1. Sequence, annealing temperature (AT) and reference of primers used to perform the amplification and sequencing of nuclear (ITS2) and mitochondrial (ND1, CO1) DNA loci of the renicolids from *Puffinus puffinus* on the coast of Paraná state.

Locus	Primer	Sequence (5' – 3')	AT	Reference
ITS2	Spir 1	GAGGGTCGGCTTATTATCTATCA	50°C	Stacy et al. (2010)
	Spir 2	TCACATCTGATCCGAGGTCA		
ND1	ND1J	AGATTCGTAAGGGGCCTAATA	43°C	Bray et al. (1999)
	ND1J2A	CTTCAGCCTCAGCATAATC		Morgan & Blair (1998)
CO1	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	48°C	Bowles et al. (1992)
	JB4-5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG		
	CO1-R-Trema	CAACAAATCATGATGCAAAAAGG	50°C	Miura et al. (2005)

The sequence quality analyses were performed using PHRED and the sequences were accepted if the base quality was ≥ 20 . The consensus sequences were determined using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). The nucleotide (nt) sequences were compared to the sequences deposited in GenBank using BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pairwise and multiple sequence alignments at the nt level were realized with ClustalW in MEGA version 7.0.26 (Supplementary files - Alignments S1, S2, and S3).

The phylogenetic trees based on the nt sequences were built using the Maximum-Likelihood method with a Kimura two-parameter model + invariant sites (K2+I) to ITS2 and Hasegawa-Kishino-Yano model + gama distribution (HKY+G) to ND1 and CO1 loci,

according to find best DNA model (Supplementary files - Tables S4, S5, and S6) in MEGA (version 7.0.26) (KUMAR et al., 2016). Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The nt sequence identity matrices were generated by BioEdit software version 7.2.6.1.

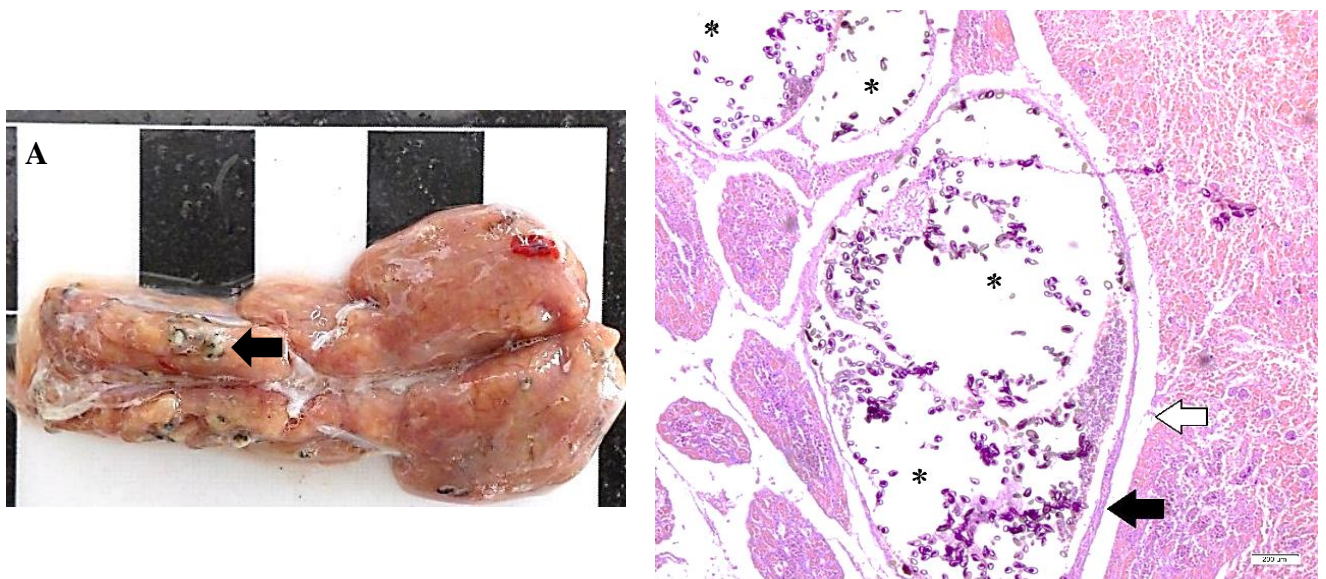
The nt sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database (accession numbers: MH021181 and MH021182).

Results

Gross and histologic findings of the kidneys

Macroscopically, the kidneys of *P. puffinus* had small black and white multifocal areas (Figure 1A) where worms were found in pairs inside of cyst-like structures within the renal tissue and distributed in the whole organ. Microscopic findings were characterized by the dilation of the collecting ducts associated with the intraluminal accumulation paired renicolids in dilated ducts (Figure 1B).

Figure 1. Kidney of *Puffinus puffinus* from the coast of Paraná state, Brazil. (A) Macroscopically findings showing renicolids (arrow). (B) Ectasia ductal in kidney with *Renicola sloanei* (*) filled with eggs. White arrow - renal duct edge. Black arrow - cystic formation around the parasites (HE, Bar 200 µm).



Histologic and ultrastructural analysis of the parasites

The morphometry analyses were executed in 99 helminths (Table 2). In mature specimens filled with eggs, few parameters were measured, such as the body length and the dimensions of the oral sucker and eggs.

Most worms presented a roughly oval body with a blunt anterior extremity that gradually tapered toward the other end; there was a large variation in length (Figure 2A). The cuticle had numerous little spines (Figures 2C and 2F), and the oral sucker was subterminal (Figures 2A, 2B and 2E) or terminal in a few worms, opening into the barrel-shaped pharynx (Figure 2E). The caeca were at the fourth to fifth part of the body, and the excretory vesicle extended in the posterior end. The vitelline glands were in follicles located laterally to the caeca (extracaecal) and were distributed from the distal pharynx region to the proximal ventral sucker area (four-fifths of the body) (Figure 2A). The lobed ovary was located anterolaterally to the ventral sucker, and the two lobed testes were placed on both sides of the ventral sucker (Figures 2H and 2I). The genital pore (Figures 2B, 2C, and 2H) was located at the median line, approximately 103 μm down from the ventral sucker, and between these structures, the transverse vitelline ducts were observed (Figure 2H). The parasites presented a long, coiled uterus with a large uterine sac with both immature (light brown shell) and mature (dark brown shell) operculate eggs (Figure 2G).

In a specimen without eggs (an immature adult worm) it was possible to verify a transversal connection in the y-shaped excretory vesicle, immediately after the ventral sucker (Figure 2I). The intestinal caeca divided immediately behind the pharynx, so it lacks an esophagus (Figure 2E).

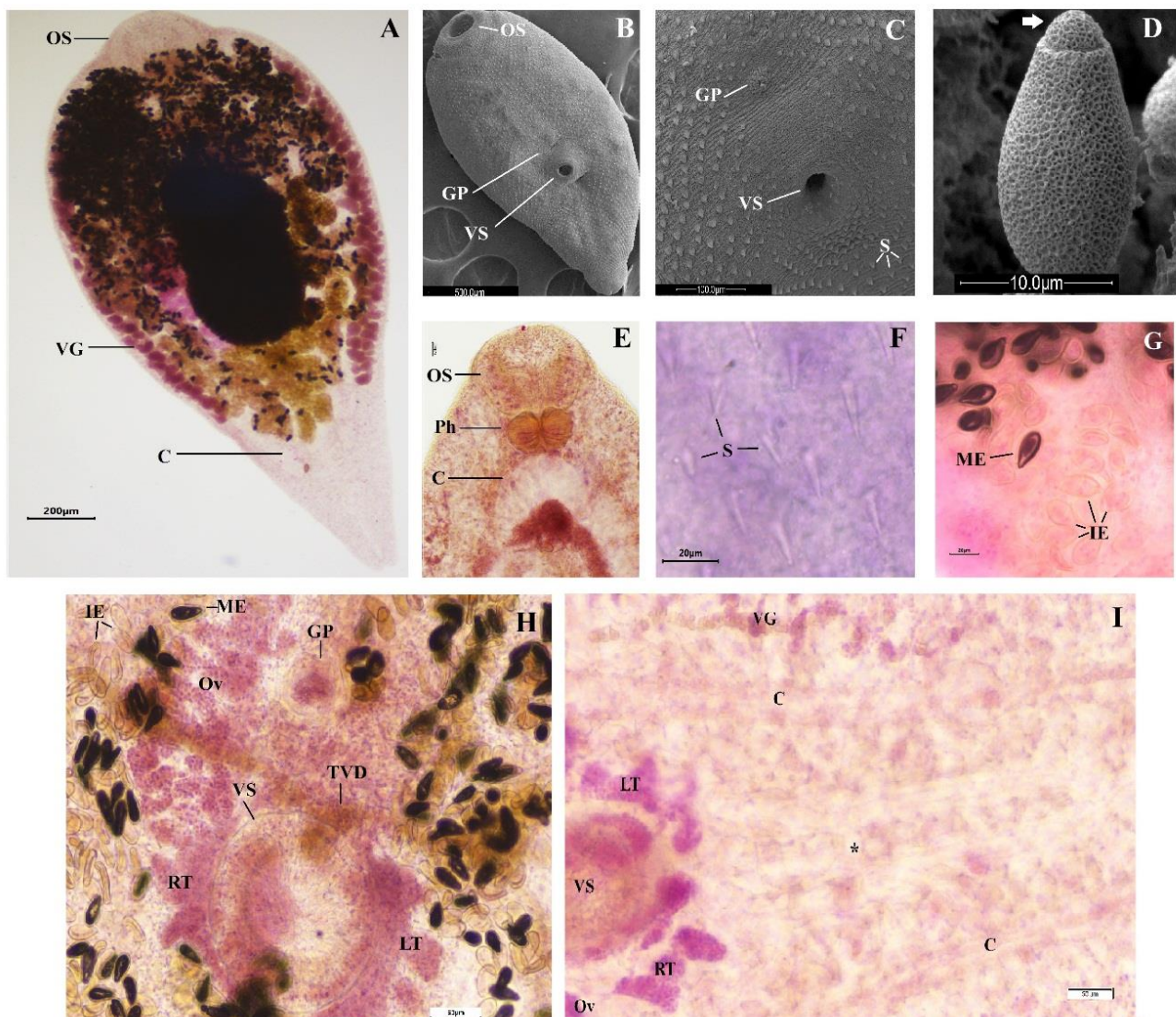
The SEM of adults confirmed their roughly oval body shape (Figure 2B), the subterminal position of the oral sucker (Figure 2B), the genital pore lying at the median line of the ventral sucker (Figures 2B and 2C) and the well-developed cuticular spines covering the entire parasite body (Figure 2C). The SEM also revealed the ultrastructural aspects of the egg shell, which is characterized by a dense network of irregular striated anastomosing ridges, covering the whole surface of the operculated barrel-shaped egg (Figure 2D).

Table 2. Measurements (μm) of adult renicolids from seabirds with similar distribution as the *Puffinus puffinus*.

Renicolidae	<i>Renicola sloanei</i>		<i>Renicola sloanei</i>	<i>Renicola</i> sp.	<i>Renicola</i> sp.	<i>Renicola</i> sp.	<i>Renicola lari</i>	
Source	This study		Wright, 1954a	Wright, 1956	Jerdy et al., 2016	Wright, 1954b	Heneberg et al., 2016	
Host (locality)	<i>Puffinus puffinus</i> (BR)		<i>Pygoscelis antarctica</i> and <i>Eudyptes chrysolophus</i> (UK)	<i>Puffinus puffinus</i> (UK)	<i>Spheniscus magellanicus</i> (BR)	<i>Larus dominicanus</i> (BR)	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (CR)	
Measurements	N	Mean\pmSD (Range)	Range	Range	Mean\pmSD (Range)	Mean	N	Mean\pmSD (Range)
B length	60	2063 \pm 449 (1287-3096)	1470-2710	940-1950	1162 \pm 82 (1073-1254)	2000	30	1268 \pm 210 (1000-1771)
B width ^a	45	1039 \pm 279 (631-1659)	690-1260	360-980	603 \pm 56 (548-695)	1000	30	794 \pm 130 (522-1000)
B width ^b	22	935 \pm 258 (610-1520)						
OS length	71	278 \pm 74 (158-536)	257-329	136-280	132 \pm 9.8 (117-142)	240	30	220 \pm 37 (174-296)
OS width	72	324 \pm 88 (115-666)	229-286	120-180	134 \pm 15.5 (124-164)	150-180	30	266 \pm 36 (203-348)
Pharynx length	59	106 \pm 20 (68-158)	114	60-96	70 \pm 15.7 (53-84)	84	30	89 \pm 10 (70-104)
Pharynx width	61	122 \pm 22 (92-173)	114	60-80	50 \pm 10 (40-60)	80	30	79 \pm 10 (70-99)
VS length	29	155 \pm 29 (111-270)	114-129	80-144		105	30	98 \pm 15 (81-145)
VS width	31	150 \pm 29 (115-267)					30	98 \pm 15 (81-145)
Eggs length	583	30 \pm 2 (24-35)	28-34	34-38	28.5 \pm 1.6 (26-32)	38-42	30	47 \pm 1 (46-48)
Eggs width	583	16 \pm 1 (12-19)	16-18	19-22	15.3 \pm 1.4 (14-18)	17-21	30	27 \pm 1 (26-28)
Spines length	167	12 \pm 0.31 (8-20)					30	9.5 \pm 1.0 (8-10)
Length:width ^c	38	2 \pm 0.28 (1:1.6-2.9)					30	1.6 \pm 0.2 (1:1.1-2.0)
OS:VS length ^d	20	1.8 \pm 0.7 (1:0.2-1)					30	2.3 \pm 0.5 (1:1.1-3.4)
OS:VS width ^e	21	2.3 \pm 0.9 (1:0.2-1.5)					30	2.8 \pm 0.5 (1:1.6-4.0)

^a the maximum body width. ^b the width in the level of ventral sucker. ^c length of the body and maximum body width ratio. ^d ventral and oral suckers length ratio. ^e ventral and oral suckers width ratio. BR = Brazil. UK = United Kingdom. CR = Czech Republic. N = number of measurements. SD = standard deviation. B = body. OS = oral sucker. VS = ventral sucker.

Figure 2. Histological (A, E, F, G, H, I) and scanning electron microscopy (B, C, D) aspects of *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state, Brazil. (A) Body ovate (ventral aspect) (MC, Bar 200 μm). (B) Scanning electron microscopy showing a roughly oval body (Bar 500 μm). (C) Scanning electron microscopy showing the spines and genital pore in the median line of the ventral sucker (Bar 100 μm). (D) Scanning electron microscopy of an egg with opercula (arrow) (Bar 10 μm). (E) The oral sucker subterminal opens into the pharynx barrel-shape and the caeca (MC, Bar 200 μm). (F) Spines in the posterior end of the body (DH, Bar 20 μm). (G) Mature eggs with miracidium and immature eggs in the uterus (MC, Bar 200 μm). (H) Genital pore, transverse vitelline ducts, ovary lobed on the right side of the body, right and left testes lie on the side of the ventral sucker, observed in a helminth with few eggs (MC, Bar 50 μm). (I) Ventral sucker, ovary, right and left testes, vitelline glands, caecae and a connecting channel between the two arms of the excretory vesicle (*) in an immature adult helminth (MC, Bar 50 μm).



C = caeca. DH = Delafield's hematoxylin stain. GP = genital pore. IE = immature eggs. LT = left teste. MC = Mayer's carmalum ME = mature eggs. OS = oral sucker. Ov = ovary. Ph = pharynx. RT = right teste. S = spines. TVD = transverse vitelline ducts. VG = vitelline glands. VS = ventral sucker.

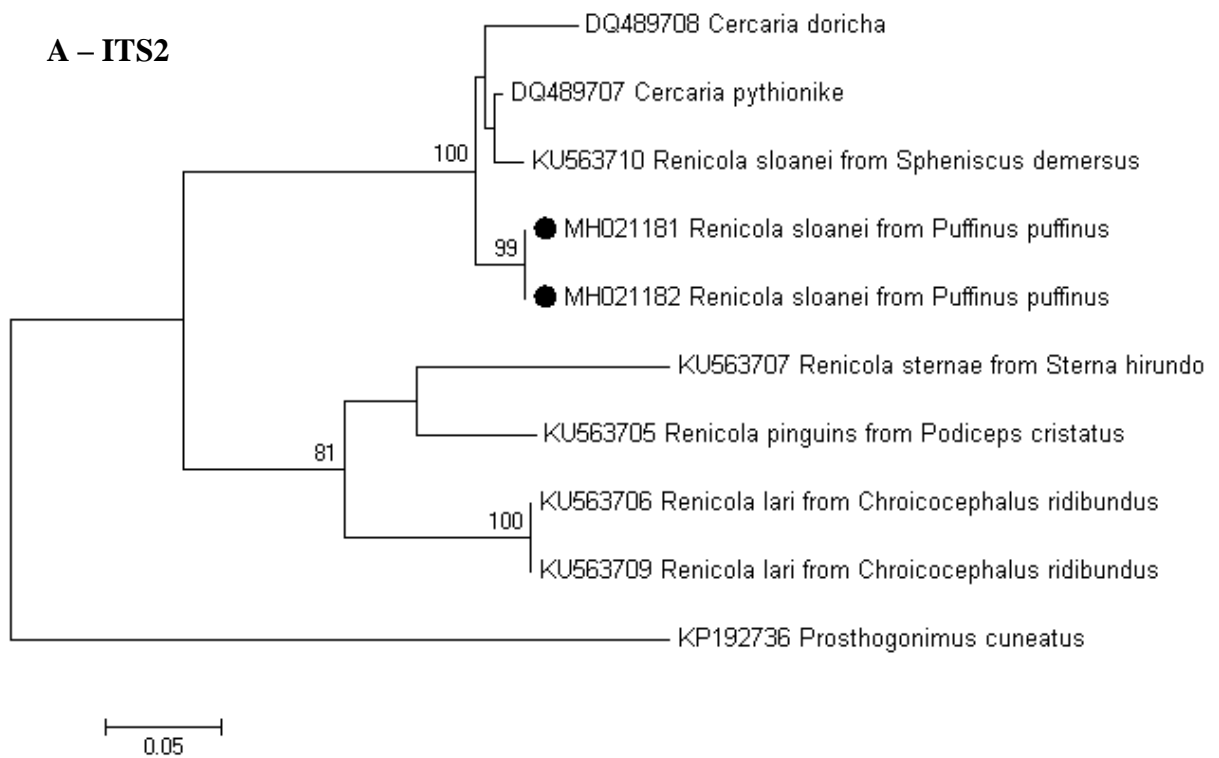
Molecular identification and phylogenetic analysis

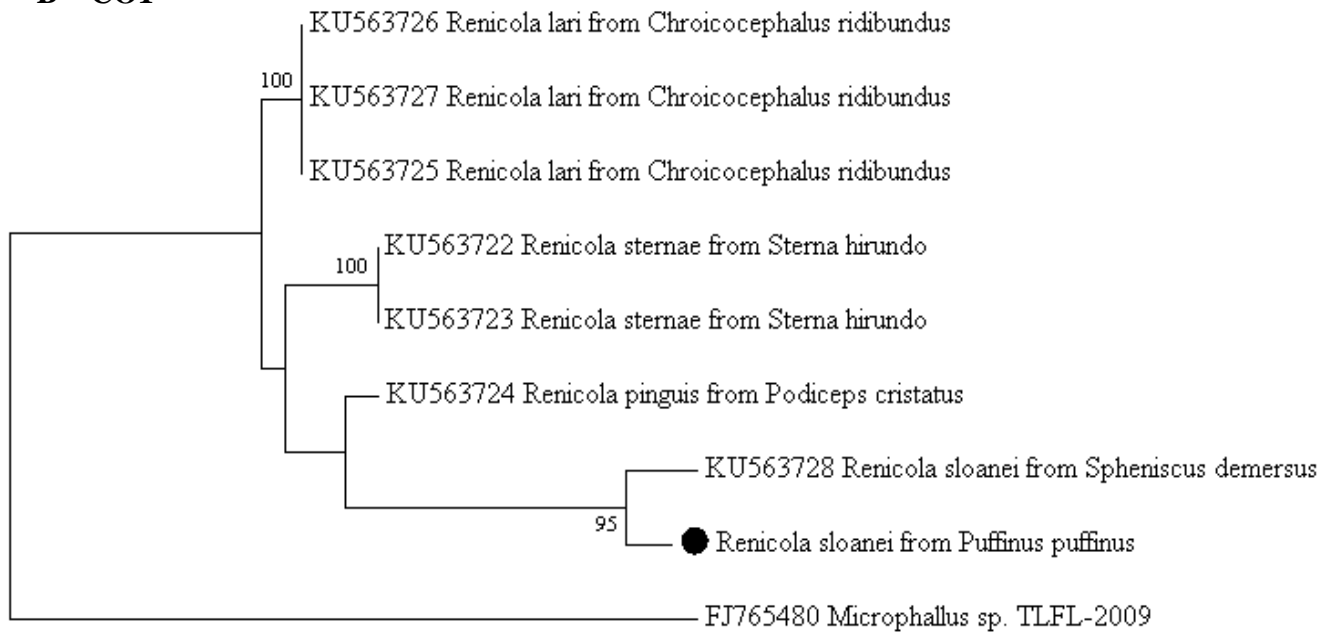
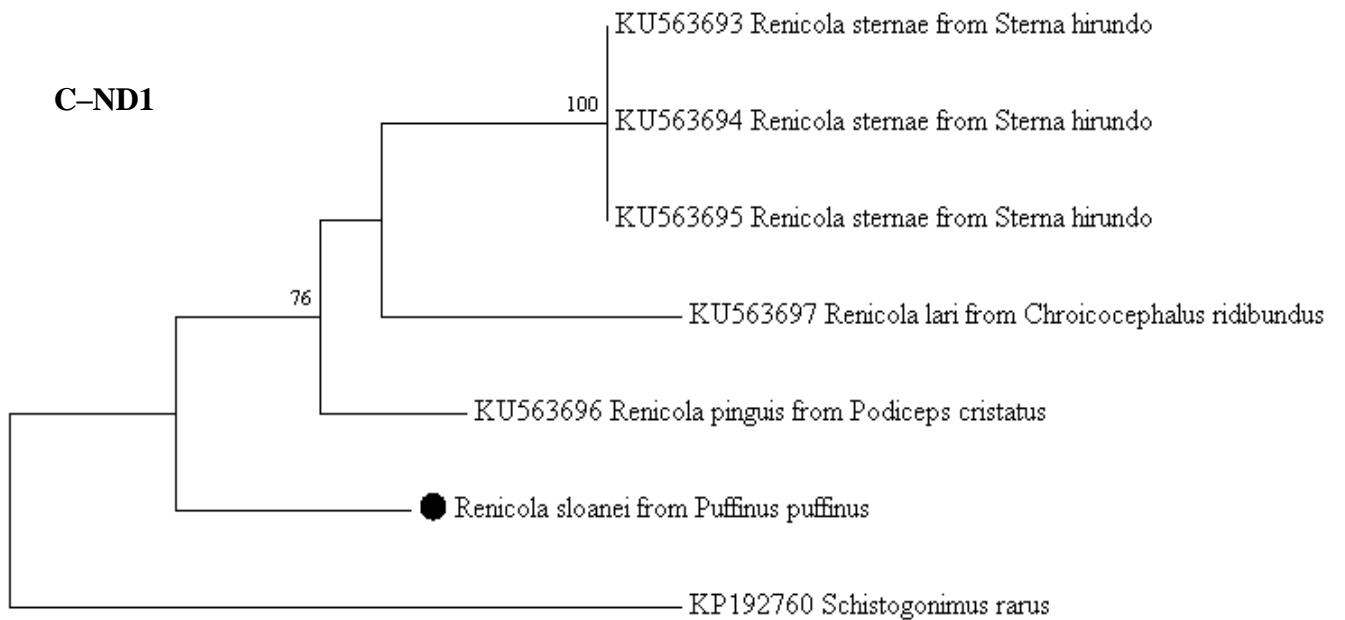
The amplicons of ITS2 region from the digeneans of 2 *P. puffinus* exhibited the expected size (300 bp) and were sequenced (accession number: MH021181 and MH021182). The sequences from the digeneans of *P. puffinus* in this study showed 100% of nt similarity to each other and 95.9%, 96.6%, and 87.3% with *Renicola sloanei* (accession number: KU563710; HENEBERG et al., 2016), *Cercaria pythionike* (accession number: DQ489707), and *C. doricha* (accession number: DQ489708) strains, respectively. The *C. pythionike* strain also exhibited a close molecular similarity with *R. sloanei* (96.2%) (accession number: KU563710; HENEBERG et al., 2016). When compared with other species of the genus *Renicola* (*R. lari*, *R. pinguins*, and *R. sternaе*; HENEBERG et al., 2016) available in GenBank, the two nt sequences of *R. sloanei* of *P. puffinus* exhibited lower nt similarity (68.6%, 74.2%, and 68.8%, respectively).

The amplified products of CO1 and ND1 loci had 463 and 434 bp, respectively. The sequence of CO1 locus from our renicolid also showed higher nt similarity with *R. sloanei* (90.6%; accession number: KU563728) and lower nt similarity with *R. pinguins* (82.1%; accession number: KU563724), *R. lari* (80%; accession numbers: KU563725, KU563726, KU563727), and *R. sternaе* (79.2%; accession numbers: KU563722, KU563723). Lower nt similarity was observed between our sequence and ND1 locus from others renicolids: *R. pinguins* (77.5%; accession number: KU563696), *R. sternaе* (74.6%; accession numbers: KU563693, KU563694, KU563695), and *R. lari* (72%; accession number: KU563697). However, it was not possible to compare with the deposited sequence of *R. sloanei* from *S. demersus* (accession number: KU563692) due to the small sequence size (182 bp). Due to nt similarity (100%) between the two *P. puffinus* strains in the ITS2 region, only one sequence with better nt quality of each locus (ND1 and CO1) was deposited in the GenBank database.

In the phylogenetic trees (Figure 3) the *P. puffinus* strains from this study clustered with *R. sloanei* strain, revealed by the analyses of ITS2 and CO1 loci (Figures 3A and 3B). In ND1 locus, the *P. puffinus* strain formed a separated branch from the other renicolids species (Figure 3C). In addition, in the ITS2 phylogenetic tree the *R. sloanei* strain clustered with *C. pythionike* and *C. doricha* (Figure 3A) strains.

Figure 3. Phylogenetic analysis of the *Renicola sloanei* Brazilian field strains based on the ITS2 (3A), CO1 (3B), and ND1 (3C) regions. The trees were constructed using the Maximum Likelihood method with Kimura-two parameter model + invariant sites (K2+I) to ITS2 and Hasegawa-Kishino-Yano model + gamma distribution (HKY+G) to CO1 and ND1. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values < 60% are not shown). The scale bar at the bottom of the trees represent the number of nt substitutions per site. The sequences from this study are marked with filled circle and the GenBank accession numbers of the strains were provided. The *Prosthogonimus cuneatus*, *Microphallus* sp., and *Schistogonimus rarus* strains were used as outgroups.



B – CO1**C–ND1**

Discussion

The parasitic infections generally cause low mortality and morbidity; there is also evidence that parasites can regulate the host population. However, the effects and the role of the parasites in the mortalities in marine birds are few understood (JONES, 2005; EBERT et al., 2013). In this way, the primary necessity is to identify the parasitic species and follow its biological cycle to better understand the relationship between parasitism and the host's health status. In this study, the results of the morphometrical and molecular assays were indicative of kidney parasitism by *Renicola sloanei* in *Puffinus puffinus*.

There are few studies describing renal parasitic species in *P. puffinus*, possibly due to the difficulty in obtaining suitable specimens for more accurate identification (i.e., parasites with few eggs or that did not break during processing). The natural fragility of these worms and their arrangement in pairs inside the cysts made it very difficult to work with them without rupturing their bodies, either during removal from the cysts or during the staining procedures and slide assembly.

In a previous study of *P. puffinus* from the United Kingdom, a high rate of infection was also reported (number minimum of 30 and the maximum was not informed) (WRIGHT, 1956). The association between the histological lesions and the presence of *Renicola* spp. is controversial. A previous study of seabirds reported kidney lesions such as increased diameter of the renal tubules and inflammatory infiltrates that might result in death or contribute to the host's susceptibility to lethal infections (WRIGHT, 1956). Conversely, *R. sloanei* from *Spheniscus demersus* on the coast of South Africa caused only mild tissue changes in histopathologic evaluation (HORNE et al., 2011). In the present study, the birds showed mild lesions in the kidneys. Apparently, the presence of parasites did not induce an inflammatory response or growth disorder in this host species, however, more studies should be performed to confirm this hypothesis.

Two renicolids species were previously reported in *P. puffinus*, differentiated primarily by the extension of the vitelline glands (WRIGHT, 1956). In this report, the general morphology of the parasites showed similarity with *R. sloanei* recovered from penguins (WRIGHT, 1954a). At that time, the parasitism by *R. sloanei* was identified only in penguin species (*Aptenodytes patagonicus*, *Pygoscelis antarcticus*, *Eudyptes chrysolophus*, and *S. demersus*) (CAMPBELL & SLOAN, 1943; WRIGHT, 1954a; HORNE et al., 2011; HENEBERG et al., 2016), and in *Uria aalge* (WRIGHT, 1954a; COLE, 1959). In the present

study, the morphological characteristics of the vitelline glands, caeca, and size of the eggs were similar to that reported for *R. sloanei* (Table 1).

The main characteristic that distinguished *R. sloanei* from other described renicolids was the different distribution of the vitelline glands (extra-caecal follicles extending from the second-fifth to the fourth-fifth body length) (WRIGHT, 1954a). The distribution of the vitelline glands were similar to *Renicola* spp. from *Fratercula arctica* and *Colymbus arcticus* (WRIGHT, 1956). In these last seabirds species, the renicolids were not identified at the species level; however, the author suggested that probably it were *R. sloanei*. In addition, the connection between the arms of the excretory vesicle was only observed in *Renicola* sp. from *P. puffinus*, *R. sloanei* from penguins and *U. aalge*, in *Renicola* spp. from *F. arctica* and *C. arcticus*, and in *Renicola glacialis* from *Fulmarus glacialis* (WRIGHT, 1954a; 1956; RILEY & OWEN, 1972, KHAROO, 2013).

The length of the body of the renicolids derived from this study was similar to *R. sloanei* (Table 2). Additionally, the ratios tend to present less variability than absolute measurements (FERNÁNDEZ et al., 1995); therefore, when suckers' length and width ratios of *R. lari* were compared with our results, a clear difference between the ratios were observed in these structures.

In the present study, the eggs' size showed dimensions similar to *R. sloanei* and *Renicola* sp. from penguins previously described (WRIGHT, 1954a; JERDY et al., 2016) (Table 1). It is also important to note that eggs from *R. sloanei* present smaller dimensions than *R. lari* from *C. ridibundus* and *Renicola* sp. from *L. dominicanus* (WRIGHT, 1954b; HENEBERG et al., 2016) (Table 2). The dimensions of the eggs differ between the renicolids species (WRIGHT, 1956). In this way, the size of the eggs is an useful parameter for the species differentiation, besides being a parameter of easy observation and measurement.

In this study, SEM was also used to characterize the parasites. A cuticle replete of spines and a well-developed genital pore were observed, which are characteristics not easily observed by histology. This last characteristic also was verified in *R. sloanei* (WRIGHT, 1954a). The similarity of the spines in the SEM and histologic slides indicate the preservation of this structure (Figures 2C and 2F). Furthermore, for the first time, the ultrastructural aspects of the eggs were shown, providing evidence of the opercule and the anastomosing ridges of the shell (Figure 2D).

Renicola sloanei probably is not be species-specific but may be found in different definitive and intermediate hosts and inhabiting various environments. Considering these

biological aspects and the difficulty in obtaining adequate parasites for morphological analysis, molecular assays are essential for parasitic identification.

Phylogenetic analysis enabled us to classify the renicolids found in this study as *R. sloanei*. In the ITS2 region, the high nt similarity among *R. sloanei* strains from *P. puffinus* of this study (100%) may be due to the parasitism of the same species as the definitive host. In addition, the strains presented less nt similarity (95.9%) with the other *R. sloanei* strains described previously by Heneberg et al. (2016) in *S. demersus*.

According to the morphological findings described by Wright (1956) and the phylogenetic and nt sequence analysis performed in this study, it can be suggested that *C. pythionike* is a metacercariae of *R. sloanei*, since it has the close nt similarity with *R. sloanei* of *P. puffinus* (96.6%) (described herein) and with *R. sloanei* of *S. demersus* (96.2%) (HENEBERG et al., 2016). In addition, *C. pythionike*, when compared to other renicolid strains, showed a reduced nt similarity with *R. sterna*e (69.2%), *R. lari* (68.4%), and *R. pinguins* (74.6%). However, to confirm this suggestion, additional morphological and molecular studies are required for *Cercaria* spp. and *R. sloanei*.

The sequences from both mitochondrial (CO1 and ND1) genes were used for comparison with sequences obtained using ribosomal DNA (ITS2) gene (MORGAN & BLAIR, 1995), and due to the presence of greater nt variability are used to detect differences among the taxa (VILLAS et al., 2005). Therefore, considering the variability of mitochondrial regions, the higher nt similarity between our digeneans and *R. sloanei* (CO1), and lower nt similarity with others renicolids (ND1 and CO1), we identified the renicolids from *P. puffinus* stranded on the coast of Paraná state as *R. sloanei*.

Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study using morphological and molecular assays to characterize the renal trematode *R. sloanei* in *P. puffinus*. In addition, our results suggest that *R. sloanei* is the adult form of *C. pythionike*. However, additional investigations with these digeneans are required to confirm this information and to better evaluation of the renal lesions in parasitized *P. puffinus* on the Brazilian coast.

Acknowledgements

This study was prepared as part of the results obtained by the Beach Monitoring Project of the Santos Basin, state of Paraná, which is a requirement established by the federal

environmental licensing division of the Brazilian Environmental Agency (IBAMA). This work has been made possible by the dedication of the collaborators of this project to obtain information and samples.

References

Amato JFR, Amato SB. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: Von Matter S, Straube FC, de Queiroz Piacentini V, Accordi IA, Cândido Jr JF. *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Technical Books, Rio de Janeiro; 2010. p. 369-393.

Campbell JG, Sloan J. A possible new species of trematode parasitic in the kidneys of the king penguin (*Aptenodytes longirostris*). *Vet J* 1943; 99: 291-294.

Cole, B. A report on the endoparasites found on Lundy, 1956-57. *Annu Rep Lundy Field Soc* 1959, 12: 31-34.

Ebert D, Lipsitch M, Mangin KL. The effect of parasites on host population density and extinction: experimental epidemiology with *Daphnia* and six microparasites. *Am Naturalist* 2013; 156: 459-477.

Fernández M, Balbuena JA, Pertusa JF, Raga JA. Biometric variability of *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) (Digenea, Campulidae) from the intestine of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). *Syst Parasitol* 1995; 30: 67-76.

Gibson DI. Family Rencolidae Dollfus, 1939. In: Gibson DI, Bray RA, Jones A. *Keys to Trematoda 3*. CABI Publishing, The Natural History Museum. London, UK; 2008. p. 591-594.

Heneberg P, Sitko J, Bizos J, Horne EC. Central European parasitic flatworms of the family Rencolidae Dollfus, 1939 (Trematoda: Plagiorchiida): molecular and comparative morphological analysis rejects the synonymization of *Renicola pinguis* complex suggested by Odening. *Parasitology* 2016; 143: 1592-1604.

Horne EC, Bray RA, Bousfield B. The presence of the trematodes *Cardiocephaloides physalis* and *Renicola sloanei* in the African Penguin *Spheniscus demersus* on the east coast of South Africa. *Ostrich* 2011; 82: 157-160.

Jerdy H, Baldassin P, Werneck MR, Bianchi M, Ribeiro RB, Carvalho ECQ. First report of kidney lesions due to *Renicola* sp. (Digenea: Trematoda) in free-living Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) found on the coast of Brazil. *J. Parasitol* 2016; 102: 650-652.

Jones B. Mass mortalities in the oceans. In: Rohde, K. *Marine Parasitology*. Australia: CSIRO; 2005. p. 371-426.

Kharoo VK. A review of the history and classification of the family Rencolidae Dollfus, 1939 (Trematoda: Digenea). *Ind J Fund Appl Life Sci* 2013; 3:6-12.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870-1874.

MacKenzie K, Campbell N, Mattiucci S, Ramos P, Pinto AL, Abaunza, P. Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fish Res* 2008; 89: 136-145.

Melo CMF, Oliveira JB, Athayde ACR, Dantas AFM, Feitosa TF, Vilela VLR *et al.* Identification of parasites in *Puffinus puffinus* (Birds, Procellariiformes) from Northeastern Brazil. *Vet Res Commun* 2012; 36: 235-238.

Riley J, Owen RW. *Renicola glacialis* sp. nov., a new trematode from the north sea fulmar, *Fulmarus glacialis* (L.), with observations on its pathology. *J Helminthol* 1972; 46: 63-72.

Sick H. Ordem Procellariiformes. In: Sick H. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro; 1997. p. 175-185.

Stacy BA, Frankovich T, Greiner E, Alleman AR, Herbstà LH, Klein P *et al.* Detection of spirorchiid trematodes in gastropod tissues by polymerase chain reaction: preliminary identification of an intermediate host of *Learedius learedi*. *J Parasitol* 2010; 96: 752-757.

WoRMS Editorial Board (2018). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2018-07-08. doi:10.14284/170

Wright CA. Trematodes of the genus *Renicola* from birds in British zoos, with descriptions of two new species. In: *Proceedings of the Zoological Society of London*. v. 124. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 1954a. p. 51-61.

Wright CA. Trematodes of the genus *Renicola* from the kidneys of birds in Brazil. *Rev Bras Biol* 1954b; 14: 61-64.

Wright CA. Studies on the life-history and ecology of the trematode genus *Renicola* Cohn, 1904. In: *Proceedings of the Zoological Society of London*. v. 126. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 1956. p. 1-50.

Wright CA. Two kidney flukes from Sudanese birds, with a description of a new species. *J Helminthol* 1957; 31:229-238.

5 ARTIGO 2

Renicolid infection, renal alterations and health level of *Puffinus puffinus* (Aves: Procellariiformes) stranded on the coast of Paraná, Southern of Brazil*

Summary

Studies with parasitic fauna in migratory seabirds, such as the procellariiformes *Puffinus puffinus* (*P. puffinus*), might improve knowledge about feeding habits, migration route, distribution, populations stocks, and health of the ocean. The aim of this study was to describe the morphological and molecular aspects of renicolids found in *P. puffinus* stranded on the coast of Paraná state, and to correlate the impacts of the parasitism in the renal and systemic health. The study occurred in September of 2015 to December of 2017. A total of 341 *P. puffinus* was found stranded, and 85 animals were used to histological evaluations. The kidney was evaluated using a histological score of alterations, and the health status was evaluated considering the body condition, presence of integumentary lesions, and histological lesions in organic systems. In addition, the anthropic interaction was evaluated (bycatch, solid residues, oil, and aggression). The identification of the parasites was realized by histological and molecular assays. A high prevalence of renicolids was found in *P. puffinus* (71/85). In the kidney, the main microscopical finding was nephritis, whereas degeneration, and cardiac and muscle necrosis were the most frequent systemic changes. No correlation was observed between parasitism and renal alterations and/or health status; however, a significant correlation was observed with anthropic interaction. The morphological and molecular analysis ($n=2/14$ sequenced samples) confirmed the species infecting the kidney as *Renicola sloanei* (95.9% of nucleotide identity). The results indicate that the parasitism by renicolids are non-lethal in this host, and the main cause of mortality of *P. puffinus* stranded on the Paraná coast, south Brazil was the cardiac and muscle lesions, probably related to the migration process.

Keywords: health status; Mans shearwaters; *Renicola sloanei*; trematode.

*Manuscrito será submetido ao Journal of Comparative Pathology. As instruções aos autores estão no Anexo 2.

Introduction

Among the seabirds that inhabit the Southern hemisphere, the Procellariiformes order is one of the most important, by both numbers of species and specimens (Bocher *et al.*, 2000). *Puffinus puffinus*, a procellariiform known as Manx shearwaters, had colonies located in North Atlantic Ocean, breeding in boreal summer (northern hemisphere summer), mainly in the Britannic islands. During the sexual rest, these birds migrate to South Atlantic, Argentina, Uruguay and Brazilian seawaters mainly in spring and summer, between September to November months (Neves *et al.*, 2006; Thompson, 1987; Vooren and Brusque, 1999; Guilford *et al.*, 2009; Freeman *et al.*, 2013).

The main areas of *P. puffinus* permanence during the migration are the Brazilian coast, and the region of the Rio de la Plata, Argentina. These seabirds have also a particular interest concerning migration ecology, and a better understanding of the ocean health (Guilford *et al.*, 2009). Mortality of Manx shearwaters was reported in Brazilian seawaters associated to the migration process (Vooren and Brusque, 1999). Although *P. puffinus* have been considered a marine environment sentinel (Cardoso *et al.*, 2014), data regarding the parasitism and lesions in *P. puffinus* on the coast of Brazil are scarce (Melo *et al.*, 2012; Mariani, 2016). In addition, studies with parasitic fauna might provide information about feeding habits, migration route, distribution, and populations stocks of its hosts (Mackenzie *et al.*, 2008).

Important components of the parasitic fauna of seabirds are the Heterophyidae (62 genus, e. g. *Ascocotyle*, *Pholeter*), Rencolidae (1 genus, 28 species, e. g. *Renicola lari*, *Renicola sloanei*) and Schistosomatidae (5 genus, e. g. *Ornithobilharzia*, *Gigantobilharzia*) families (Cribb, 2005; WoRMS, 2018).

Rencolidae is a group of small digeneans that inhabit the renal tubules and ureters of birds (Campbell and Sloan, 1943; Wright, 1954a; Gibson, 2008). In general, flukes occur

alone in the initial period of the mature development or in pairs into cyst-like spaces when the worms are mature. Mature renicolids can lead to complete obliteration of the tubular lumen and occlusion of other neighbouring tubules (Campbell and Sloan, 1943; Wright, 1954a; Byrd and Kellogg, 1972). The parasitism by renicolids was associated with lesions such as: nephritis, fibrosis, and tubular hyperplasia (Campbell and Sloan, 1943; Rylei and Owen, 1972; Munyer and Holloway, 1990; Jerdy *et al.*, 2016). However, in some birds kidney alterations were not observed (Wright, 1956; Byrd and Kellogg, 1972; Horne *et al.*, 2011).

One of the first studies to highlight the morphological characteristics of renal renicolids of *P. puffinus* described morphological similarities with *Renicola sloanei* species (Wright, 1956). Posteriorly, other study considered the renicolid of *P. puffinus* as another species, the *R. wrighti* (Odening, 1962). However, no reports describing both morphological and molecular features of renicolids in shearwaters. Digeneans renicolids were also reported in Brazilian seabirds as *Sterna* spp., *Larus dominicanus* and *Sula leucogaster* (Wright, 1954b). More recently, a mild occurrence of *Renicola* was described in *P. puffinus* found in the Brazilian Northeast coast (Mariani, 2016). Therefore, the aim of this study was to describe the morphological and molecular aspects of renicolids found in *P. puffinus* stranded on the coast of Paraná state, and to evaluate the impacts of the parasitism in renal and systemic health.

Material and methods

Local of study and animals

The area of study was the coast of Paraná state (25°44'S and 48°29'W), characterized by an extension of 105 Km, including Baía de Guaratuba at southern and the Paranaguá Estuarine Complex at north (PEC). PEC area includes the islands of Mel, Superagui and Peças. The coastal area was monitored daily and weekly in the Mel island.

The animals sampled for this study were obtained between September 2015 to December 2017 through the Santos Basin Beach Monitoring Project - Phase 1. This project is part of the requirements established by the federal environmental licensing process of the Brazilian Environmental Agency (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources – IBAMA; n° 640/2015), for the exploration of oil and gas at the Santos Basin pre-salt province.

In this study, 341 *P. puffinus* stranded on the coast of Paraná state were used. The condition of decomposition of carcasses were classified as fresh, moderate, advanced or mummified (Pugliares *et al.*, 2007). The identification of the birds and the sexual maturity (juvenile and mature) were based on species-specific standard range of body length and sex (Onley and Scofield, 2007). The carcasses were submitted to a standard gross analysis. At autopsy, carcass were sexed, and the nutritional state (body condition) was scored on anatomical parameters (pectoral muscle mass).

Tissue samples (brain, cerebellum, lungs, heart, liver, kidneys, skeletal muscle, proventriculus/ventriculus, small and large intestines, salt, harder and thyroid/parathyroid glands, and thymus, bursa of Fabricius and spleen) were collected, fixed in 10% buffered formalin solution, sectioned with 4 µm and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological analysis. Samples for histological analysis were collected only from carcasses in fresh or moderate condition of decomposition.

Histological analysis and health status of Puffinus puffinus

A lesional score was established to histological changes in the kidney, and the intensity and the severity of the lesions were considered. The criteria used were degeneration of tubular epithelium, inflammatory infiltrate, hyperplasia of tubular epithelium, and tubular cell necrosis (Table 1).

An index to assess the health status was also established considering the following criteria: body condition, presence of integumentary lesions, occurrence of lesions in organic systems (the number and type of affected systems were also considered), and organized lesions. Specifically to the organized lesions, previous changes as fibrosis, metaplasia, and consolidated fractures were taken into account. For each criteria a severity degree was considered. The criteria lesions in organic systems and organized lesions comprise 8 systems with different degrees of severity accordingly to the relevance of the system for the systemic homeostasis (Table 1).

For both evaluations (renal alterations and health status) a final score was obtained according to the intensity and severity of the changes in the kidney and the health status: normal (score 0), mild changes (score 1 to 6), moderate changes (score 7 to 16), and severe changes (score 17 to 24). Furthermore, the presence/absence of the anthropic interaction (bycatch, solid residues, oil, and aggression) was evaluated, including the intensity of the interaction (Table 1). In addition, for better consensus of observed alterations, all evaluations (macro and microscopical) were evaluated by three pathologists.

Table 1 Renal alterations score, health level, and the severities degrees evaluated as from autopsy and histopathology from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of the state of Paraná, southern Brazil.

Renal alterations	Severity factor	Intensity of histological changes			
		0	1	2	3
Tubular epithelium degeneration	1	Absent	Discrete	Moderate	Severe
Tubular epithelial hyperplasia	2	Absent	Discrete	Moderate	Severe
Inflammatory infiltrate	2	Absent	Discrete	Moderate	Severe
Tubular cell necrosis	3	Absent	Focal	Multifocal	Diffuse
Health status		Intensity of systemic changes			
		0	1	2	3
Body condition	1	-	Good	Poor	Cachectic
Integumentary lesions	1	None	Focal	Multifocal	Diffuse
Lesions in organic systems	NS/CS = 3	None	1-3 systems	4-6 systems	>6 systems
	DS/RS = 2				
Organized lesions	HS/OS/ES/RpS=1	None	1-3 systems	4-6 systems	>6 systems
	NS/CS = 3				
	DS/RS = 2				
	HS/OS/ES/RpS=1				
Anthropic interaction		Intensity			
		0	1	2	3
Bycath					
Solid residues					
Oil	2	None	Discrete	Moderate	Severe
Aggression					

NS-Nervous central system, CS-Cardiovascular system, DS-Digestory system, RS-Respiratory system, HS-Hemolinfatic system, OS-Osteomuscular system, ES-Endocrine system, RpS-Reproductive system.

Histological analysis of the renal digeneans

The trematodes digeneans isolated from the kidneys were fixed in AFA solution (ethanol, formaldehyde, and acetic acid) and no worms were compressed during the fixation. The digeneans were stained with Mayer's carmalum and Delafield's hematoxylin and mounted on

histological slides with a synthetic medium (Entellan[®], Merck, Germany) (Amato and Amato, 2010).

The measures of renicolids were taken using an image analysis software (Opticam Microscopy Technology 0500R, Doral, FL, USA). The following parameters were measured accordingly to Wright (1954b; 1956): the body (length and width; the maximum body width and the width in the ventral sucker level), the oral sucker (length and width), the pharynx (length and width), the ventral sucker (length and width). The length and width of the eggs were measured of 5 at 10 mature eggs (with a brown-shell and containing a miracidium) per renicolid. To assess the extension of the vitelline glands and the caeca, the body length was divided into 5 equal parts.

Histological slides of the kidneys were also used to measure the length and width of the eggs. Criteria to include the eggs evaluated in this assessment were the presence of a brown-shell and a miracidium, and disposed in a longitudinal section.

Nucleic acid extraction, PCR, and sequencing

The extraction of genetic material of the digeneans was carried out using a commercial kit (DNeasy Blood and Tissue™ kit, QIAGEN[®], Valencia, CA). The amplification of the ITS2 region was performed using the primer pair SPIR1 (5'-GAGGGTTCGGCTTATTATCTATCA-3') and SPIR2 (5'-TCACATCTGATCCGAGGTCA-3') (Stacy *et al.*, 2010).

The polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: 45 cycles of denaturation at 95°C (1 min); annealing at 50°C (45 sec); extension at 72°C (10 min); the initial denaturation at 95°C (5 min) and final extension at 72°C (10 min).

The PCR amplicons were detected by electrophoresis on 2% agarose gel in a TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) containing ethidium bromide (0.5

µg/ml) and visualized under UV light. The PCR amplicons were purified using the Purelink PCR Purification Kit (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA) and quantified using a Qubit® Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA). The purified PCR amplicons were then sequenced using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the forward and reverse primers used in the PCR assay.

The sequence quality analyses were performed using PHRED and the sequences were accepted if the base quality was ≥ 20 . The consensus sequences were determined using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Subsequently, the nucleotide (nt) sequences were compared to the sequences deposited in GenBank using BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pairwise and multiple sequence alignments at the nt level were realized with ClustalW in MEGA software 7.0.26.

The phylogenetic tree based on the nt sequences was built using the Maximum-Likelihood method, with Kimura two-parameter model + gama distribution (K2+G), bootstrapping with 1,000 replicates in the MEGA 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016), and the nt sequence identity matrix was generated by BioEdit software 7.2.6.1.

Statistical analysis

For both the morphological evaluations (histological parameters of the helminths and eggs in the kidneys) a descriptive statistical analysis was conducted to calculate the mean, standard deviation, and minimum and maximum values for each parameter. In addition, the length/width ration for the body and the suckers (oral and ventral sucker) was calculated.

Statistical analysis was performed using the IBM® SPSS Statistics software (Version 25.0, Armonk, NY) and the data were submitted to normality test. The Chi-Square

test was used for categorical characteristics (gender and sexual maturity) and the Spearman test for correlations of the lesional score, health status, and anthropic interaction. For both tests, P values of ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Occurrence of Puffinus puffinus stranding on the coast of Paraná

During approximately two years of coast monitoring, 341 *P. puffinus* were found stranded in Paraná state. The occurrence of birds in each year and month was described in Table 2. In this study, the greater frequency of stranded *P. puffinus* was in 2017. Interestingly, when the occurrence is evaluated over the months, a higher stranding was observed mainly in October and November.

Table 2 Occurrence of *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state, southern Brazil by year and month.

	Year		
	2015	2016	2017
Months (n)	September (3)	January (5)	January (54)
	October (17)	September (6)	February (35)
	November (40)	October (52)	September (9)
	December (1)	November (63)	October (20)
		December (9)	November (12)
			December (15)
Total (n)	61	135	145

Biological characteristics of stranded animals

From the 341 animals, 85 were submitted to gross and histological analysis due to the poor condition of the carcasses. From these, 71 presented renal parasites and in 14 no parasites were detected in the kidneys. Macroscopically, the sex was established in 78 animals (44

female and 34 male). In 7 animals the sex was not determined. The sexual maturity was established in 39 animals (32 were juveniles, 7 were adults), and in 38 the sexual maturity was not determined. For both sexes, juveniles were more frequent. The association between the presence of the parasites, sex and sexual maturity was statistically evaluated, however there is no association in the analysed parameters.

Anthropic interaction

Anthropic interactions were observed only in parasitized animals (17/71). The presence of oil on the plumage was the most frequent interaction ($n=7$) showing a severe interaction/score 3 (Figure 1). Severe interactions with solid residues occurred in six birds. The interactions with fisheries and lesions by aggressions occurred in three ($n=3$, severe interaction) and one ($n=1$, discrete interaction) animals, respectively. There was a significant correlation (Spearman correlation test, $r = -0.0221$, $P=0.042$) between the presence/absence of renal digeneans and anthropic interactions.

Figure 1 *Puffinus puffinus* stranded on Paraná state with oil impregnation (demarked area).



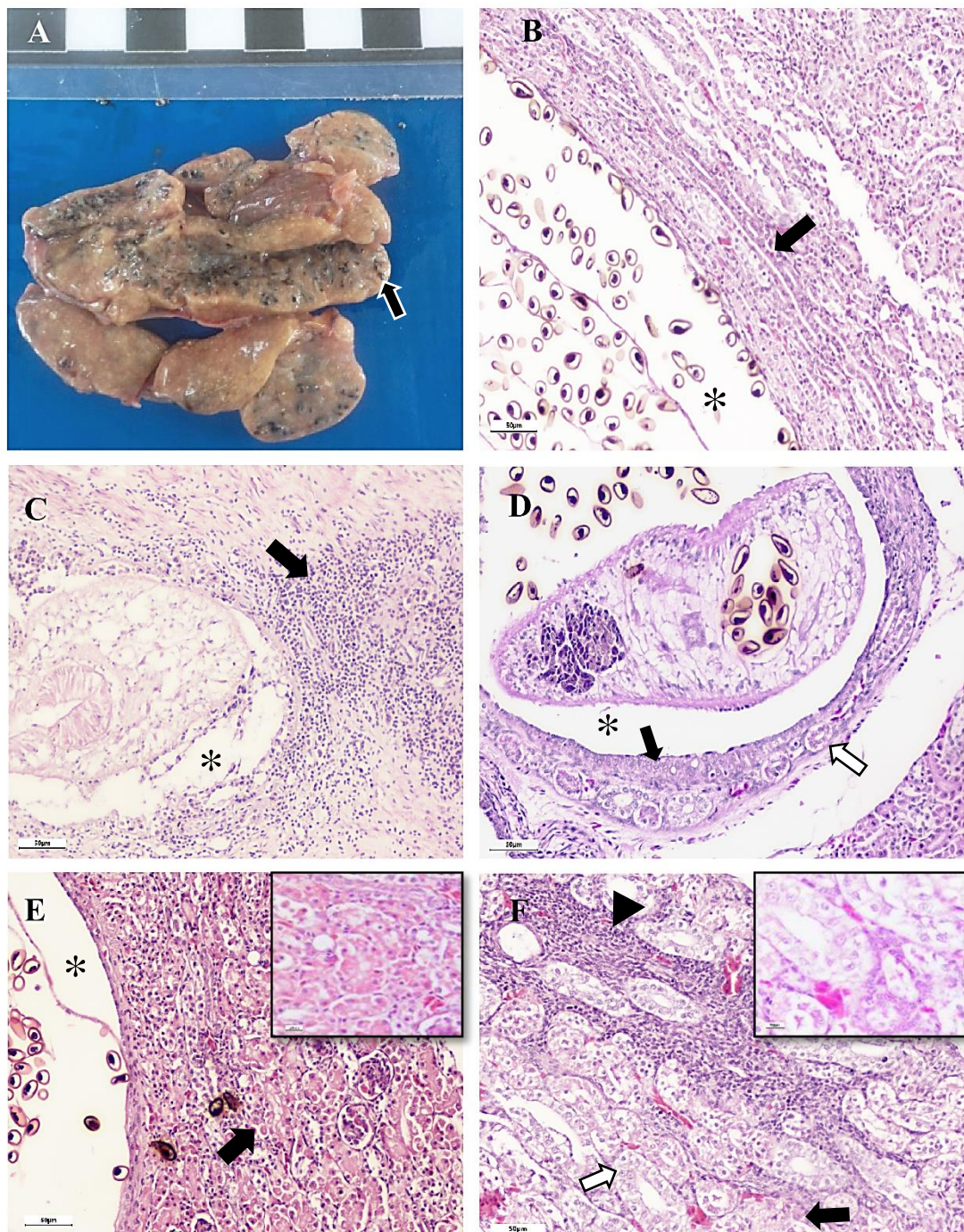
Source: Santos Basin Beach Monitoring Project

Histological analysis

Histological analysis was performed in 85 animals presenting a fresh condition of the carcasses. The kidney fragments evaluated had a mean size of 0.6 cm² (± 0.35 , min-max 0.24-2.3 cm²), and the mean number of digeneans per fragment was 7.4 (± 8.4 , min-max 1-50). Considering the variation in the kidney fragment size and in the number of digeneans per slide, these features were not used in the analysis of renal alterations.

Renal parasitism occurred in 71 animals (84%) (Figure 2A), while 14 were uninfected (16%). The total number and the mean abundance of renicolids were not evaluated in this study. From the 71 infected *P. puffinus*, 60 (85%) showed some level of histological changes. The main histological findings were mild to moderate inflammatory lymphocytic infiltrate ($n=53$) (Figure 2C), focal to multifocal tubular necrosis ($n=17$) (Figures 2E and 2F), cell tubular hyperplasia ($n=15$) (Figure 2D), epithelial cell tubular cytoplasmic degeneration ($n=10$) (Figure 2F), and ectasia ductal and consequently occlusion of neighbouring tubules (Figure 2B). The inflammatory infiltrate circumscribed the parasitized collecting ducts and/or in the interstitial medullar tissue (Figure 2C and 2F). In 13 cases an association between inflammatory infiltrate and necrosis was observed. A discrete tubular hyperplasia was mainly observed in the collecting ducts, with two or three cell layers (Figure 2D). In addition, dilatation and consequently occlusion of neighbouring tubules were also observed. Association of lesions was frequently observed; 2 animals have shown all alterations concurrently. The mean kidney lesional score was 4 (± 4) and 3 (± 3) for the parasitized and non-parasitized animals, respectively. No significant correlation was observed between the renal alterations and the presence/absence of renicolids ($r=-0.103$, $P=0.347$).

Figure 2 Kidney gross and microscopical aspects (HE, Bar 50 μm) from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state. (A) Gross findings showing renicolids (arrow) in the kidney with a score and health status of 6. (B) Parasitized tubule (*) leading to occlusion of neighbouring tubules (arrow). (C) Inflammatory infiltrate (arrow) surrounding a parasitized tubule (*). (D) Normal tubule (white arrow) and hyperplastic tubule (black arrow) with renicolid (*). (E) Tubular necrosis (black arrow) close to a parasitized tubule (*). The insert shows an area of necrosis (Bar 10 μm). (F) Inflammatory infiltrate (arrow head), tubular cytoplasmic degeneration (white arrow), and tubular necrosis (black arrow). The insert shows an area of cytoplasmic degeneration (Bar 10 μm).

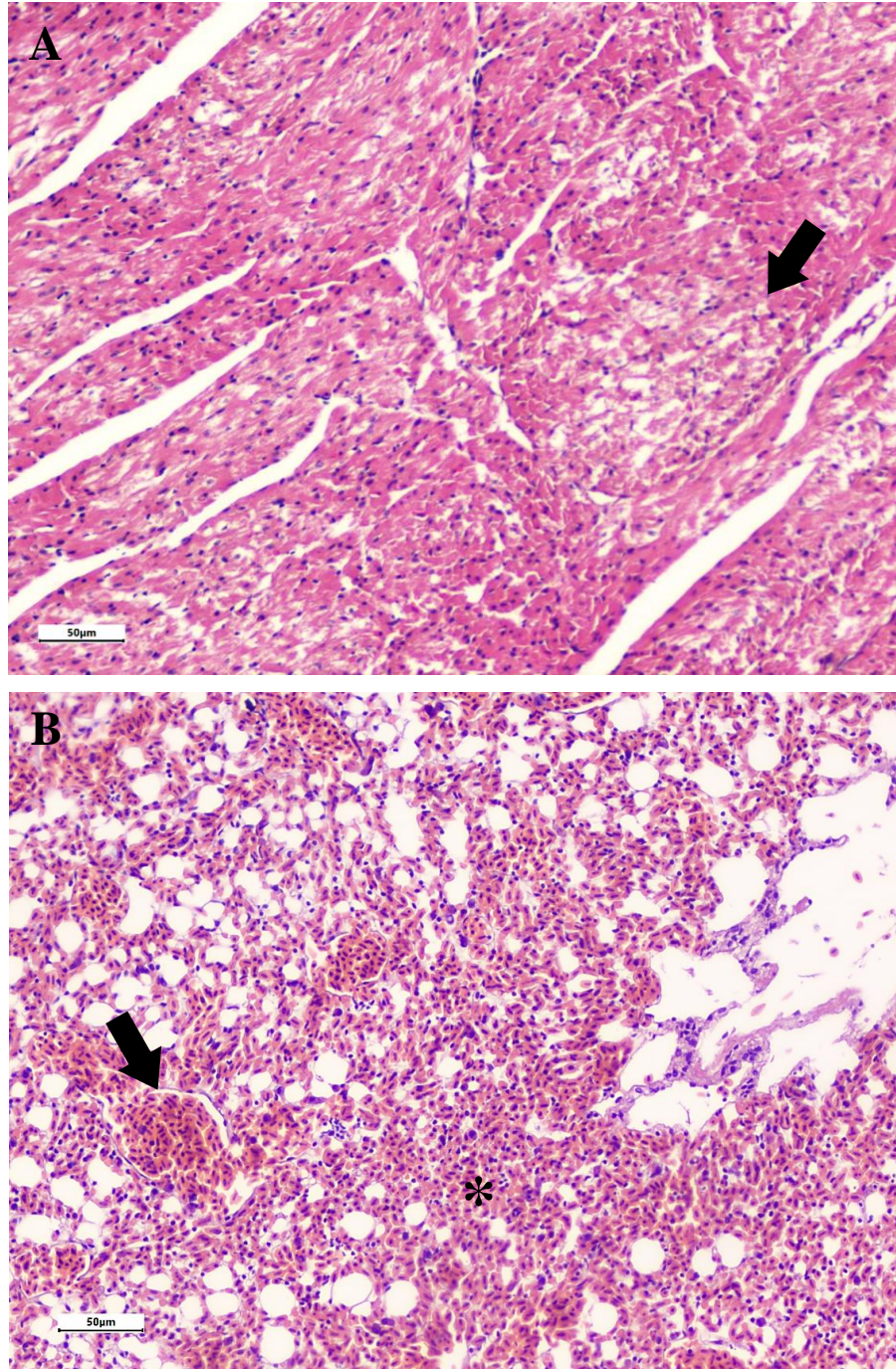


Health status

To understand the impact of the renicolid infection in the *P. puffinus* health, a health status index was established where body condition, integumentary lesions, systemic and organized lesions were considered. Poor (65 and 86% for parasitized and non-parasitized) and cachectic (27 and 14% for parasitized and non-parasitized) body conditions were commonly observed in *P. puffinus*. Parasitized (58/71) and non-parasitized (12/14) seabirds presented frequently lesions in other systems.

The main lesions detected in both parasitized and non-parasitized animals were cardiac (Figure 3A) and muscle necrosis, pulmonary congestion and haemorrhage (Figure 3B), and lymphocytic hepatitis. In addition, hepatic hemosiderosis was observed in seven seabirds and four of these presented oil externally. The frequency of systemic lesions in the animals is shown in the supplementary file. The mean health status index was $8 (\pm 2)$ for both parasitized and non-parasitized animals (in a maximum possible index of 24). The correlation between the presence of renicolids and the health status index showed no significance ($r=0.059$, $P=0.589$).

Figure 3 Microscopical aspects of the heart and lung from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná. (A) Cardiac muscle showing necrosis (black arrow). (B) Lung with congestion (black arrow) and haemorrhage (*) in state. (HE, Bar 50 μ m).



Digeneans histological characteristics and molecular analysis

The measurements were executed only in mature digeneans ($n=84$). In general, the most parasites presented a large uterus with numerous eggs. The parameters used for statistical analysis results were detailed in Table 3.

Histologically the digeneans showed a roughly oval body with a blunt anterior extremity that gradually tapered toward the other end (Figure 4). A large variation in the body length was observed (Table 3). The cuticle of some individuals presented little spines. The oral sucker was subterminal or terminal (Figure 4) and the pharynx was barrel-shaped. The excretory vesicle extended in the posterior end. The vitelline glands were arranged in extracaecal follicles, and were distributed in four-fifths of the body, from the distal pharynx region to the proximal ventral sucker area (Figure 4). The lobed ovary was located anterolateral to the ventral sucker, and the two lobed testes were placed on both sides of the ventral sucker (Figure 4). The genital pore was located at the median line. The uterus was long and coiled with a large uterine sac.

The observed morphological parameters lead to the characterization of digeneans renicolids (local of infection, body shape, large uterine sac, oral sucker and pharynx) (Wright, 1954a). In addition, features such as distribution of vitelline glands and size of the eggs were similar to the features previously described in *Renicola sloanei* from penguins (Wright, 1954a) and *Renicola glacialis* from *Fulmarus glacialis* (Riley and Owen, 1972).

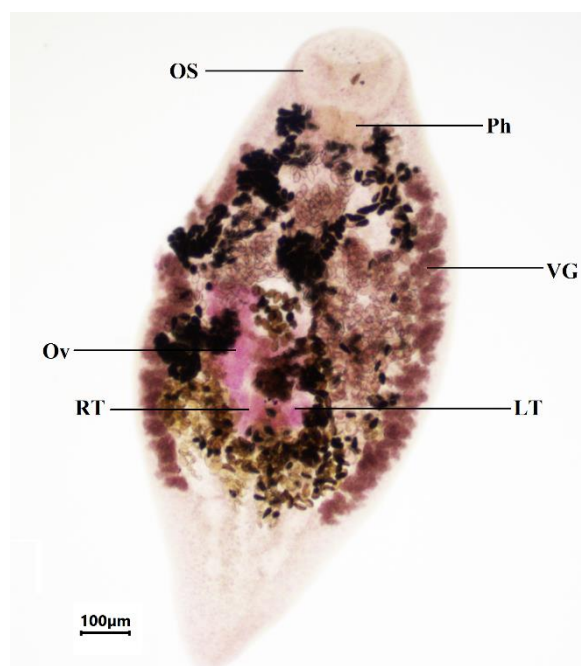
The measures of the eggs in the kidney's slides were obtained from 60 renicolids present in of 30 *P. puffinus*, and were similar to the eggs observed in parasite's slides (width 30 ± 1 (27-34); length 16 ± 1 (13-20) (Figure 5). The number of eggs measured per renicolid varied between two to 13.

Table 3 Morphological parameters of digeneans *Renicola sloanei* infecting *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state, Southern Brazil.

Measure	N	Mean \pm SD (Range)
Body length	20	1805 \pm 344 (1051-2338)
Body width ^a	17	851 \pm 166 (518-1130)
Body width ^b	4	711 \pm 41 (668-776)
Oral sucker length	53	212 \pm 53 (93-366)
Oral sucker width	54	243 \pm 62 (100-442)
Pharynx length	33	90 \pm 19 (31-130)
Pharynx width	35	97 \pm 16 (69-133)
Ventral sucker length	25	115 \pm 29 (96-165)
Ventral sucker width	24	117 \pm 21 (91-165)
Eggs length	653	30 \pm 2 (27-36)
Eggs width	653	16 \pm 1 (14-19)
Genital pore at ventral sucker ^c	3	78 \pm 33 (38-130)
Length:width body ratio	10	2.2 \pm 0.3 (1:1.7-2.7)
Oral:ventral sucker length ratio	16	1.8 \pm 0.3 (1:1.2-2.4)
Oral:ventral sucker width ratio	15	2.1 \pm 0.4 (1:1.1-2.6)

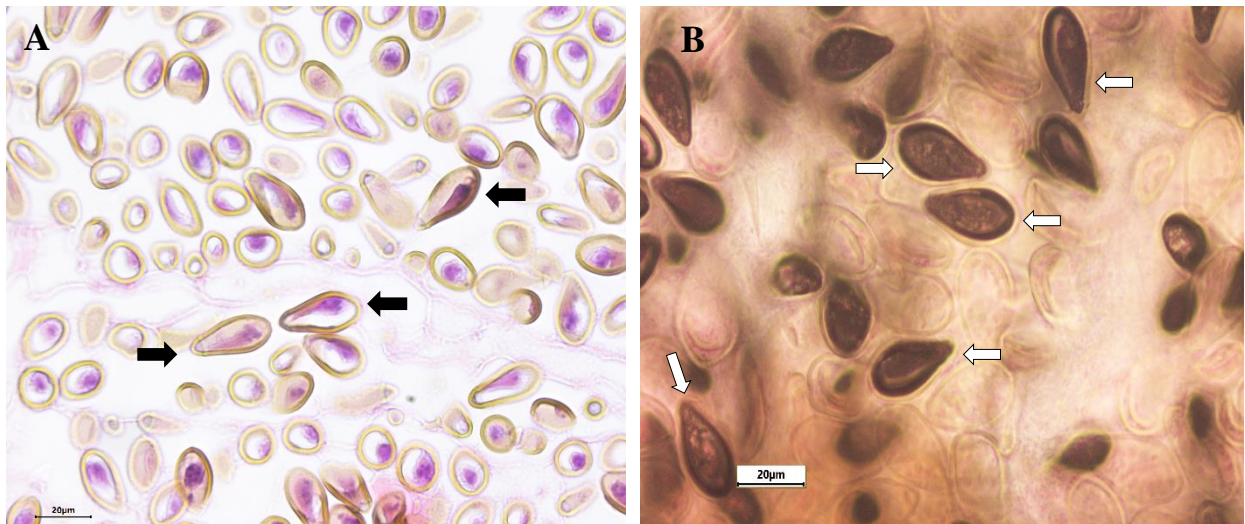
^a the maximum body width. ^b the width in the level of ventral sucker. ^c measured of the posterior end of the genital pore until the anterior end of ventral sucker. N number of measurements. SD Standard deviation.

Figure 4 Adult *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state. (Mayer's carmalum stain, Bar 100 μ m).



OS-Oral Sucker; Ph-Pharynx; VG-Vitelline Glands; LT-Left Testes; RT-Right Testes; Ov-Ovary

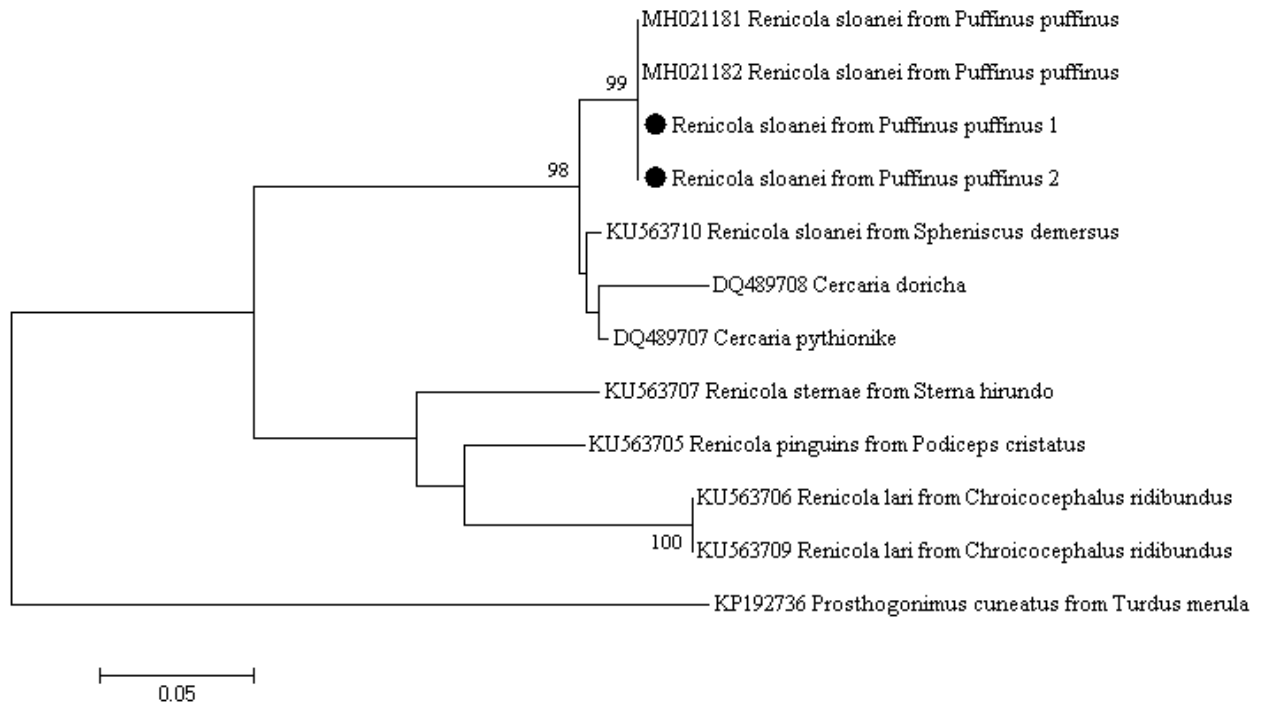
Figure 5 Mature eggs used to measurements (length and width) (black and white arrows) from *Renicola sloanei* from *Puffinus puffinus* stranded on the coast of Paraná state. (A) Histological kidney with *R. sloanei* (HE, Bar 20 μm). (B) Histological of *R. sloanei* (Mayer's carmalum stain, Bar 20 μm).



Renicolids from 14 *P. puffinus* were amplified and due the adequate quality and quantity of the nt, 2 samples were sequenced to ITS2 region.

Corroborating the morphological findings, the results of the molecular analysis have shown that renicolids from *P. puffinus* present a high nt identity with *Renicola sloanei* from *Spheniscus demersus* (95.9%) (accession number: KU563710; Heneberg *et al.*, 2016) and from *P. puffinus* (100%) (accession number: MH021181 and MH021182; Matos *et al.*, 2018, submitted), and with *Cercaria pythionike* (96.6%) (accession number: DQ489707). Moreover, the sequences exhibited a lower nt identity with other renicolids: *R. sterna* (68.8%; accession number: KU563707), *R. lari* (68.3%; accession number: KU563706 and KU563709), and *R. pinguins* (74.2%; accession number: KU563705) (Heneberg *et al.*, 2016). In addition, in this study the phylogenetic analysis of *R. sloanei* strains from *P. puffinus* clustered together with *R. sloanei* strains previously described (Heneberg *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2018, submitted) (Figure 6).

Figure 6 Phylogenetic analysis of the *Renicola sloanei* Brazilian field strains. The tree based on the ITS2 region was constructed using the Maximum Likelihood method with Kimura-two parameter model + gamma distribution (K2+G). The sequences from this study are marked with filled circle. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values < 80% are not shown). The scale bar at the bottom of the tree represent the number of nt substitutions per site. The GenBank accession numbers of the strains are provided and the *Prosthogonimus cuneatus* strain was used as an outgroup.



Discussion

Most of the helminths found in seabirds are considered the common parasitic faunal, leading to host death in severe infections (Galaktinov, 1996); thus, studies concerning these organisms might provide relevant information about host ecology (Hoberg, 1996). In our study, based on systematic and replicable evaluations, it was possible to observe an equilibrated host-parasite interaction where the absence of significant correlation between renal and systemic alterations and renicolids predominated.

Continuous monitoring programs are important strategies that contribute with the knowledge of abundance and diversity of marine animals. Results concerning ecological

aspects and health status in seabirds in the coast of Paraná state are scarce (Santos-Moraes and Krul, 1995; Krul, 2004; Carniel and Krul, 2012; Daudt *et al.*, 2017). In the present study the occurrence of stranded *P. puffinus* was evaluated in a period of two years where a daily monitoring was achieved. A greater frequency of this species was observed in the months of October and November in the two initial years of the monitoring program (2015 and 2016). In addition, the total number of stranded birds in 2016 and 2017 was similar. This frequency is probably related to the period of migration of *P. puffinus* to Southern Brazilian seawaters that commonly occurs between September to November (Vooren and Brusque, 1999). Interestingly, a high occurrence was also observed in January and February of 2017, possibly due to migration of reminiscent animals from 2016. On the other hand, in a similar monitoring program in the Brazilian northeast coast (Sergipe state) the number of stranded *P. puffinus* ($n=14$) showed no variation throughout the year (Mariani, 2016).

The increase or decrease in parasitism abundance might occur in response to stressful environmental conditions or host factors even in specific host-parasite interaction (Eiras, 1994; Lafferty and Kuris, 1999). In this study, the prevalence of renal digeneans was 84% (71/85). The first report in Brazil concerning renicolid prevalence in *P. puffinus* showed a prevalence of 80% (8/10) (Wright, 1956). Other study reported a prevalence of 70 (7/10 females) to 90% (9/10 males) of *Renicola thapari* in *Sula nebouxii* in Mexico (Rubio-Godoy *et al.*, 2011). In *Spheniscus demersus* from the east coast of South Africa, a prevalence range of kidney trematode of 21 (3/14) to 74% (17/23) during 4 years of study (2006-2009) was described (Horne *et al.*, 2011). In 2016, the prevalence of *Renicola* spp. in Brazilian stranded *Spheniscus magellanicus* was 5.5% (Jerdy *et al.*, 2016).

The sex and age maturity of seabirds showed no association with the presence of renal parasites, however, most of the animals were juveniles. Similar results were reported in *Sula nebouxii* parasitized by *R. thapari* (Rubio-Godoy *et al.*, 2011). Conversely, in *Somateria*

mollissima anseriforms (North Sea, Germany) the prevalence of renicolids was similar in juveniles and adult females (14.3%, 14/102), and lower in adult males (8.3%, 8/102) (Thieltges *et al.*, 2006).

There is a general recognition that age and sex influence in the community's structures of parasites; meanwhile, studies describing these associations are occasional (Gutiérrez *et al.*, 2017), especially in seabirds. The age-specific infection intensity and prevalence might result from differences in the susceptibility between juveniles and adults, acquired immunity or differential source of food (Thieltges *et al.*, 2006).

Most of seabirds helminths are common parasite fauna components, resulting in death when severe infections occur (Galaktionov, 1996). Moreover, an increase in parasite virulence might occur in response to changes in the host immune response (Penn, 2001). The lesions associated with *Renicola* spp. infection are of mild intensity and severity. Luminal dilatation of parasitized tubules and occlusion of neighbouring tubules were reported with apparently no clinical effect (Wright, 1956). Also, inflammatory infiltrate (lymphocytes, histiocytes and eosinophils) were observed (Campbell and Sloan, 1943; Jerdy *et al.*, 2016; Horne *et al.*, 2011). In the present study, the main histological changes similar to the previously described, including the mild intensity (Campbell and Sloan, 1943; Wright, 1956; Jerdy *et al.*, 2016; Horne *et al.*, 2011).

One of the aims of this study was to evaluate the correlation between *Renicola* infection and the *P. puffinus* health status. The severity of renal lesions showed no association with the presence of *R. sloanei* suggesting a balanced host-parasite relationship (Wright, 1956). The absence of severe lesions and the high occurrence of the parasite support this hypothesis. Similarly, no correlation (body condition and gross renal changes) was observed in *S. neboxii* infected with *R. thapari*, even in severe infections (Rubio-Godoy *et al.*, 2011).

Besides kidney histological changes, several characteristics were assessed to estimate the health status. Lesions in other systems were evaluated, and the most frequent in both parasitized and no parasitized birds were myocardium and skeletal muscle degeneration and necrosis. Causes of muscular necrosis might be nutritional deficiencies (mostly vitamin E and/or selenium deficiencies in piscivorous birds), excessive muscular effort, ischemia, metabolic disorders, and physical injuries (Vleet and Ferrans, 2007; Schmidt *et al.*, 2015).

Considering the muscle cell necrosis and the frequent poor corporal condition observed in juveniles *P. puffinus* in the present study, probably the cause of death is related to exercise-induced damage. This change occurs in association with pre-existing conditions such as selenium deficiency and severe electrolyte depletion (Valentine and McGavin, 2007). It is important also to consider that mass mortality is frequently observed in Procellariiformes, occurring predominantly during the migration. The mortality is related to weather and/or inadequate diet, and the affected birds shown emaciated, pectoral muscle and multi organs atrophy, and complete fat exhaustion (Sick, 1997; Stidworthy and Denk, 2018), reinforcing the exercise-induced damage as the main problem. In addition, pulmonary congestion was probably caused by the heart failure (López, 2007).

An interesting result was the correlation between anthropic interaction and *R sloanei* infection. Oil exposure was the main interaction described herein, whereas in São Paulo coast, solid residues (plastic fragments) in the digestive system were predominant (Barbieri, 2009). Different types of anthropic interactions (bycatch, habitat degradation, introduction of exotic species, climate changes, and oceanic pollution) have been associated with higher occurrence of infectious diseases (Sick, 1997; Quillfeldt and Masello, 2013; Wilcox *et al.*, 2015). Conversely, in the present study, the occurrence of the parasite showed no correlation with renal or systemic lesions. A point to consider, is the lower number of animals without parasites (and all of these showed no anthropic interaction) that could result

in a bias. Therefore, more investigation is required to a better understanding concerning renal parasitism and anthropic interactions.

Morphological characteristics of parasites species have been widely used for diagnosis and species identification. In this study, these features coincide with *R. sloanei*. An important parameter that can be used to distinguish *R. sloanei* from others species of renicolids is the connection between the arms of the excretory vesicle (Wright, 1954a). This parameter was observed in *Renicola* spp. from *P. puffinus* and *F. arctica* (Wright, 1956) and in *R. glacialis* from *F. glacialis* (Riley and Owen, 1972). However, in this study, due to the prominent uterine sacs, the excretory vesicles of the renicolids from *P. puffinus* were not observed.

Another parameter that can be used to characterize the parasites due to easy visualization is the vitelline gland (Wright, 1956). Worms of this study has vitelline gland organized in follicles extracaecal lead from the distal pharynx region to the proximal central sucker area. Similar extracaecal and extending of vitelline glands was observed in *R. glacialis* (Riley and Owen, 1972), *R. sloanei* (Wright, 1956), *Renicola* spp. from *F. arctica*, and *P. puffinus* (Wright, 1956).

Other morphological features showed a high variation for the *Renicola* species, except for the size of the eggs (Wright, 1954a; 1956; Riley and Owen, 1972; Jerdy *et al.*, 2016). Thus, the egg's size can be considered one of the main parameters to species' identification. In the present study, the eggs (30x16 μm) presented a high similarity with the egg's size of *R. sloanei* from *P. puffinus* (30x16 μm ; Matos *et al.*, 2018 submitted), *R. glacialis* from *Fulmarus glacialis* (30x17 μm ; Rylei and Owen, 1972), *Renicola* spp. from *S. magellanicus* (28x15 μm ; Jerdy *et al.*, 2016), and of *R. sloanei* from penguins (28-34x16-18 μm ; Wright, 1954a).

It is also possible to measure the egg's size in renal parenchyma of infected animals. However, it is important to note that the measurements have to be performed in the same type of egg (matures eggs, with dark brown shell and miracidium) in both tissue and parasite slides. Eggs of *Renicola* spp. from *S. magellanicus* also showed similar measurements in the specimen and the tissue (28.5x15.3 μm and 28.14x15.16 μm , respectively).

Morphological identification is a useful method to species identification. Meanwhile, depending on the parasite developmental stage or position in the renal tissue, the identification can be limited, requiring the use of molecular techniques (Routtu, 2014). In the present study, the morphological parameters (size of the eggs and distribution of vitelline glands) showed a high similarity with *R. sloanei* from British penguins (*P. antarctica*, *E. chrysolophus*, *U. aalge*) (Wright, 1954a), *R. glacialis* from *Fulmarus glacialis* (Riley and Owen, 1972), *Renicola* spp. from Brazilian *S. magellanicus* (Jerdy *et al.*, 2016), and Brazilian *P. puffinus* (Matos *et al.*, 2018 submitted). Nevertheless, the higher nt identity with *R. sloanei* from *S. demersus* (Heneberg *et al.*, 2016) and from *P. puffinus* (Matos *et al.*, 2018, submitted), and the lower nt identity with other renicolids, reinforce the morphological similarity with *R. sloanei*.

The systematic monitoring of the coast of Paraná, southern Brazil allowed the analysis of a significant number of stranded seabirds. In this study, *Puffinus puffinus* were frequently found showing a high prevalence of renicolids in the kidney. The parasites were identified as *Renicola sloanei* through morphological and molecular analysis. The presence of the parasite was not associated with renal or systemic changes, indicating a balanced host-parasite relationship. On the other hand, the parasitism was associated with anthropic interaction, and the factors involved in this association require more studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank the collaborators of the Beach Monitoring Project of the Santos Basin in Paraná, a requirement established by the federal environmental licensing division of the Brazilian Environmental Agency (IBAMA). Matos A. and Bracarense A. P are financed with grants from CNPq from de Brazilian government.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest with respect to the publication of this manuscript.

References

- Amato JFR, Amato SB (2010) Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*, S Von Matter, FC Straube, VQ Piacentini, IA Accordi, JF Cândido, Eds., Technical Books, Rio de Janeiro, pp. 369-393.
- Barbieri E (2009) Occurrence of plastic particles in procellariiforms, south of Sao Paulo State (Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **52**, 341-348.
- Bocher P, Cherel Y, Hobson KA (2000) Complete trophic segregation between South Georgian and common diving petrels during breeding at Iles Kerguelen. *Marine Ecology Progress Series*, **208**, 249-264.
- Byrd EE, Kellogg FE (1972) *Renicola hayesanniae*, a new kidney fluke (Digenea: Rencolidae) from the wild turkey, *Meleagris gallopavo silvestris* Vieillot, from Mississippi. *The Journal of Parasitology*, **58**, 99-103.
- Campbell JG, Sloan J (1943) A possible new species of trematode parasitic in the kidneys of the king penguin (*Aptenodytes longirostris*). *The Veterinary Journal*, **99**, 291-294.
- Cardoso MD, de Moura JF, Tavares DC, Gonçalves RA, Colabuono FI et al (2014) The Manx shearwater (*Puffinus puffinus*) as a candidate sentinel of Atlantic Ocean health. *Aquatic Biosystems*, **10**, 6.
- Carniel V L, Krul R (2012) Utilisation of discards from small-scale fisheries by seabirds in coastal waters of Paraná State, Brazil. *Seabird*, **25**, 29-38.
- Cribb TH (2005) Digenea (endoparasitic flukes). In: *Marine Parasitology*, Rohde K, Ed. CSIRO, Australia, pp. 76-87.

Daudt NW, Pereira A, Rechetelo J, Krul R, Mestre LAM (2017) Noteworthy seabird records from Paraná state, southern Brazil. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*, **137**, 195-205.

Eiras JC (1994) Platelminata. In: *Elementos de Ictioparasitologia*, Eiras JC Ed. Porto: Fundação Eng Antonio de Almeida, pp. 147-169.

Freeman R, Dean B, Kirk H, Leonard K, Phillips RA, Perrins, CM, Guilford T (2013) Predictive ethoinformatics reveals the complex migratory behaviour of a pelagic seabird, the Manx Shearwater. *Journal of the Royal Society Interface*, **10**, 20130279.

Galaktionov KV (1996) Impact of seabird helminths on host populations and coastal ecosystems. *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology*, **6**, 50-64.

Gibson DI (2005) Family Brachycladiidae Odhner, 1905. In: *Keys to the Trematoda Vol 2*, Bray RA, Gibson DI, Jones A, Eds. Publisher: CABI Publishing, pp. 641-652.

Gibson DI (2008) Family Rencolidae Dollfus, 1939. In: *Keys to the Trematoda Vol 3*, Bray RA, Gibson DI, Jones A, Eds. Publisher: CABI Publishing, pp. 591-594.

Guilford T, Meade J, Willis J, Phillips RA, Boyle D et al (2009) Migration and stopover in a small pelagic seabird, the Manx shearwater *Puffinus puffinus*: insights from machine learning. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb.

Gutiérrez JS, Rakhimberdiev E, Piersma T, Thieltges DW (2017) Migration and parasitism: habitat use, not migration distance, influences helminth species richness in Charadriiform birds. *Journal of Biogeography*, **44**, 1137-1147.

Heneberg P, Sitko J, Bizos J, Horne EC (2016) Central European parasitic flatworms of the family Rencolidae Dollfus, 1939 (Trematoda: Plagiorchiida): molecular and comparative morphological analysis rejects the synonymization of *Rencicola pinguis* complex suggested by Odening. *Parasitology*, **143**, 1592-1604.

Hoberg EP (1996) Faunal diversity among avian parasite assemblages: the interaction of history, ecology, and biogeography in marine systems. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology*, **6**, 65-89.

Horne EC, Bray RA, Bousfield B (2011) The presence of the trematodes *Cardiocephaloides physalis* and *Rencicola sloanei* in the African Penguin *Spheniscus demersus* on the east coast of South Africa. *Ostrich*, **82**, 157-160.

Jauniaux T, Brosens L, Coignoul F (1997) Lesions observed on stranded seabirds along the Belgian coast from 1992 to 1995. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, **54**, 714-717.

Jerdy H, Baldassin P, Werneck MR, Bianchi M, Ribeiro RB, Carvalho ECQ (2016) First report of kidney lesions due to *Rencicola* sp.(Digenea: Trematoda) in free-living Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) found on the coast of Brazil. *Journal of Parasitology*, **102**, 650-652.

- Krul R (2004) Aves marinhas costeiras do Paraná. In: *Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação*, JO Branco, Ed. Editora da UNIVALI, Itajaí, pp. 37-56.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular and Biology Evolution* **33**, pp. 1870-1874.
- Lafferty KD, Kuris AM (1999) How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography*, **44**, 925-931.
- López A (2007) Respiratory System In: *Pathology Basis of Veterinary Disease*, 4th Edit., MD McGavin, JF Zachary, Eds., Elsevier, Philadelphia, pp. 463-558.
- MacKenzie K, Campbell N, Mattiucci S, Ramos P, Pinto AL et al (2008) Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fisheries Research*, **89**, 136-145.
- Mariani DB (2016) *Causas de encalhes de aves marinhas no nordeste do Brasil*. MSc Thesis. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Matos AMRN, Lavorente FLP, Lorenzetti E, Meira-Filho MRC, Nóbrega DF et al (2018) Molecular identification and histological aspects of *Renicola sloanei* (Digenea: Rencolidae) in *Puffinus puffinus* (Aves: Procellariiformes): a first record. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, (submitted).
- de Melo CMF, de Oliveira JB, Athayde ACR, Dantas AFM, Feitosa TF et al (2012) Identification of parasites in *Puffinus puffinus* (Birds, Procellariiformes) from Northeastern Brazil. *Veterinary Research Communications*, **36**, 235-238.
- Munyer PD, Holloway Jr, HL (1990) *Renicola williamsi* n. sp. (Trematoda: Digenea: Rencolidae) from the south polar skua, *Catharacta maccormiki*. *Transactions of the American Microscopical Society*, **109**, 98-102.
- Neves T, Bugoni L, Rossi-Wongtschowski CLDB (2006) Aves oceânicas e suas interações com a pesca na região sudeste-sul do Brasil. T Neves, L Bugoni, CLDB Rossi-Wongtschowski, Eds., Série documentos Revizee-Score Sul.
- Odening K (1962) Neue trematoden aus vietnamesischen vögeln des Berliner Tierparks (mit einer Revision der Familie Rencolidae). *Bijdragen tot de Dierkunde*, **32**, 49-63.
- Onley D, Scofield P (2007) *Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters*. Christopher Helm, London, pp. 238.
- Pugliares KR, Bogomolni AL, Touhey KM, Herzig SM, Harry CT et al 2007 *Marine mammal necropsy: an introductory guide for stranding responders and field biologists*. Woods Hole Oceanographic Institution, pp. 132.
- Quillfeldt P, Masello JF (2013) Impacts of climate variation and potential effects of climate change on South American seabirds—a review. *Marine Biology Research*, **9**, 337-357.

Riley J, Owen RW (1972) *Renicola glacialis* sp. nov., a new trematode from the north sea fulmar, *Fulmarus glacialis* (L.), with observations on its pathology. *Journal of Helminthology*, **46**, 63-72.

Routtu J, Grunberg D, Izhar R, Dagan Y, Guttel Y, Ucko M, Ben-Ami F (2014) Selective and universal primers for trematode barcoding in freshwater snails. *Parasitology research*, **113**, 2535-2540.

Rubio-Godoy M, de León GPP, Mendoza-Garfias B, Carmona-Isunza MC, la Mora AND, Drummond H (2011) Helminth parasites of the blue-footed booby on Isla Isabel, México. *Journal of Parasitology*, **97**, 636-641.

dos Santos Moraes V, Krul R (1995) Composição e finalidade de agrupamentos heteroespecíficos de aves em ambientes naturais do Paraná e Santa Catarina. *Biotemas*, **8**, 63-73.

Schmidt RE, Reavill DR, Phalen DN (2015) *Pathology of pet and aviary birds*. 2th Ed. John Wiley & Sons, Iowa, pp. 127-144.

Sick H (1997) Ordem Procellariiformes. In: *Ornitologia Brasileira*, H. Sick. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, pp. 175-185.

Stacy BA, Frankovich T, Greiner E, Alleman AR *et al.* (2010) Detection of spirorchiid trematodes in gastropod tissues by polymerase chain reaction: preliminary identification of an intermediate host of *Learedius learedi*. *Journal of Parasitology*, **96**, p.752-757.

Stidworthy MF, Denk D (2018) Sphenisciformes, Gaviiformes, Podicipediformes, Procellariiformes, and Pelecaniformes. In: *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*, KA Terio, JSt Leger, D McAloose, Eds., Elsevier, Philadelphia, pp. 653-686.

Thieltges DW, Hussel B, Baekgaard H (2006) Endoparasites in common eiders *Somateria mollissima* from birds killed by an oil spill in the northern Wadden Sea. *Journal of sea research*, **55**, 301-308.

Thompson KR (1987) The ecology of Manx shearwater *Puffinus puffinus* on Rhum, West Scotland, PhD Thesis. University of Glasgow, Faculty of Science.

Valentine BA, McGavin MD (2007) Skeletal Muscle. In: *Pathology Basis of Veterinary Disease*, 4th Edit., MD McGavin, JF Zachary, Eds., Elsevier, Philadelphia, pp. 973-1039.

Vleet JF, Ferrans VJ (2007) Cardiovascular System. In: *Pathology Basis of Veterinary Disease*, 4th Edit., MD McGavin, JF Zachary, Eds., Elsevier, Philadelphia, pp. 559-611.

Vooren VM, Brusque LF (1999) *As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação*. Rio Grande: Fundação UFRG - Departamento de Oceanografia: Laboratório de Elasmobrânquios e Aves Marinhas.

Wilcox C, Van Sebille E, Hardesty BD (2015) Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 11899-11904.

WoRMS Editorial Board (2018) World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2018-12-11. doi:10.14284/170

Wright CA (1954a) Trematodes of the genus *Renicola* from birds in British zoos, with descriptions of two new species. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **124**, 51-61.

Wright CA (1954b) Trematodes of the genus *Renicola* from the kidneys of birds in Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, **14**, 61-64.

Wright CA (1956) Studies on the life-history and ecology of the trematode genus *Renicola* Cohn, 1904. In: *Proceedings of the Zoological Society of London*, **126**, 1-50.

6 CONCLUSÃO

Estudos com *Puffinus puffinus* são escassos no Brasil, inclusive relacionados à fauna parasitária dos mesmos. A partir das avaliações de características morfológicas e moleculares, utilizando genes ribossomais e mitocondriais, identificou-se o trematódeo *Renicola sloanei* em *Puffinus puffinus* encalhados no litoral do Estado do Paraná.

Além da identificação do trematódeo, estabeleceu-se o escore de lesão renal e o índice de saúde, sendo a nefrite e a necrose cardíaca as principais alterações observadas, respectivamente. Pelas análises estatísticas, não foi observada correlação significativa entre escore de lesão renal, índice de saúde e presença de trematódeos renais. Portanto, estes resultados indicam que há uma interação equilibrada entre *P. puffinus* e *R. sloanei*.

Observou-se correlação significativa entre presença de interação antrópica e parasitismo por *R. sloanei* em *P. puffinus*. No entanto, outros estudos devem ser conduzidos para confirmar estes resultados considerando a assimetria da frequência de animais parasitados e não parasitados.

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho, considerando inclusive os dados das frequências de encalhes dos animais, favorecem o conhecimento da mortalidade e consequente conservação de *P. puffinus* no litoral do Estado do Paraná.

ANEXOS

ANEXO 1

Normas para submissão de manuscritos em Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
ISSN 0103-846X

<http://rbpv.org.br/guia-do-autor>

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

"BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY"
REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

APRESENTAÇÃO

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral. O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, responsabilizando-se por todo o processo de tramitação e originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no

ANEXO 2

Normas para submissão de manuscritos em Journal of Comparative Pathology ISSN 0021-9975

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-comparative-pathology/0021-9975/guide-for-authors>



Browse journals > Journal of Co... > Guide for auth...

Guide for Authors

 [Author information pack](#)

> [Visit journal homepage](#)

[Submit your paper](#)

[Track your paper](#)

> [Order journal](#)

> [View articles](#)

BEFORE YOU BEGIN

- Ethics in publishing
- Animal Experimentation
- Declaration of interest
- Conditions of Acceptance
- Use of inclusive

• Submission

PREPARATION

- Peer review
- Format of Articles
- Reference Style
- Graphical Abstracts
- Tabulated Material

• Data visualization

- Supplementary material
- Research data

AFTER ACCEPTANCE

- Use of the Digital Object Identifier
- Proofs