

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Cristiane de Medeiros Campanha

**Caracterização molecular de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres
em diferentes gradientes de altitude no Parque Nacional de
Itatiaia, Brasil.**

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Caracterização molecular de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres em diferentes gradientes de altitude no Parque Nacional de Itatiaia, Brasil.

Cristiane de Medeiros Campanha

Sob a Orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos
e Co-orientação da Dr^a.
Patrícia Gonzaga Paulino

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Veterinárias no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Setembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C186c Campanha, Cristiane de Medeiros, 1976-
Caracterização molecular de Trypanosoma sp. em aves silvestres em diferentes gradientes de altitude no Parque Nacional de Itatiaia, Brasil. / Cristiane de Medeiros Campanha. - Itaguaí, 2023.
49 f.

Orientador: Huarrissom Azevedo Santos.
Coorientador: Patricia Gonzaga Paulino.
Coorientador: Luiz Carlos Massard.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2023.

1. Trypanosoma sp. 2. Aves silvestres. 3. Biologia molecular. 4. Análise filogenética. I. Azevedo Santos, Huarrissom, 1980-, orient. II. Gonzaga Paulino, Patricia, 1990-, coorient. III. Massard, Luiz Carlos, 1949-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 3975/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.065315/2023-20

Seropédica-RJ, 27 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CRISTIANE DE MEDEIROS CAMPANHA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/09/2023

(Assinado digitalmente em 28/09/2023 11:04)
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###014#2

(Assinado digitalmente em 29/09/2023 16:25)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ##034#8

(Assinado digitalmente em 03/10/2023 14:57)
ALINE MOREIRA DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.317-4#

Visualize o documento original em <https://sipsic.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3975, ano: 2023, tipo: ATA, data de emissão: 27/09/2023 e o código de verificação: e28e64f91a

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar às Forças do Universo, que alguns denominam Deus, por ter me guiado até este momento. A meu marido Alexandre pelo seu apoio ao longo de toda minha vida acadêmica. A meu filho, Alejandro Benício que é a luz da minha vida.

A todas as pessoas que cruzaram o meu caminho e me ajudaram nesta grande jornada.

Aos companheiros do Laboratório de Sanidade, Patrícia Gonzaga Paulino, Josemar Gonçalves, Rafaela Abdo, Léo Paulis, Talys Henrique Assumpção Jardim, Beatriz Bacelar Barbosa, Daniele S. Juliano, entre outros, por estarem ao meu lado me orientando e auxiliando com toda paciência do mundo. Expresso minha gratidão pelo suporte, companhia e orientações recebidas. Indubitavelmente, o sucesso deste empreendimento é atribuído à toda equipe do LASAVE. A expressão de gratidão é uma atitude que deve ser cultivada continuamente.

Sou extremamente grato ao Professor Doutor Huarrisson Azevedo Santos pela sua valiosa contribuição, orientação e paciência na condução da minha pesquisa, que desempenharam um papel fundamental do êxito deste trabalho e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

CAMPANHA, Cristiane de Medeiros. **Caracterização molecular de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres em diferentes gradientes de altitude no Parque Nacional de Itatiaia, Brasil.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Mata Atlântica é um dos maiores centros de biodiversidade e endemismo de espécies do mundo. O relevo é um dos elementos responsáveis por produzir tanta diversidade. As condições ambientais das montanhas são muito diferentes das áreas de baixada porque apresentam maior amplitude térmica, restrição hídrica e maior isolamento geográfico. Como resultado, as espécies experimentam adaptações que refletem as variações ambientais e podem interromper os intercâmbios bióticos com as planícies vizinhas. Parasitas hematozoários como *Trypanosoma* sp. são transmitidos por uma série de vetores dípteros abundantemente presente neste ambiente, acometendo a maioria dos hospedeiros locais e podendo exercer pressão seletiva sobre a avifauna, causando efeitos deletérios na saúde, no sucesso reprodutivo, comportamento e estrutura das comunidades. O objetivo deste trabalho foi correlacionar o gradiente de elevação do Parque Nacional do Itatiaia (PNI) à frequência e diversidade de *Trypanosoma* sp. no sangue de aves silvestres utilizando esfregaços sanguíneos em lâmina, PCR e sequenciamento. Dos 230 esfregaços em lâminas observados em microscopia foram encontrados em 17 (7,39%) a forma tripomastigota de *Trypanosoma* sp. e 42 (18,26%) amostras foram positivas em PCR. Todas as amostras positivas na citologia foram positivas na PCR. Ao correlacionar esses resultados com o gradiente de altitude teve-se uma frequência de 27,9% abaixo 1.000 metros e 9,2% acima de 2.000 metros. As análises filogenéticas revelaram 17 novas sequências muito próximas a *Trypanosoma Polygranularis* encontrado em *Peliperdix lathamii*, Camarões, África. Uma única sequência agrupou-se próximo ao clado de *Trypanosoma everetti* um ramo próximo a espécie *Trypanosoma everetti-like* encontrado no hospedeiro *dumetella carolinensis*, USA. Nosso estudo demonstrou a diversidade e prevalência de espécies de *Trypanosoma* em diferentes gradientes de altitude no PNI. Existe uma baixa diversidade genética entre as linhagens de *Trypanosoma* em aves silvestres no Parque Nacional de Itatiaia, onde 17 das 18 sequências obtidas neste estudo estão filogeneticamente relacionadas a *Trypanosoma polygranularis*. As linhagens de *Trypanosoma* sp. obtidas neste estudo possui baixa especificidade parasitária sendo identificadas em 12 espécies de aves.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos, Mata Atlântica, passeriformes, análise filogenética.

ABSTRACT

CAMPANHA, Cristiane de Medeiros. **Molecular characterization of *Trypanosoma* sp. in wild birds at different altitude gradients in Itatiaia National Park, Brazil.** 2023. Dissertation (Master of Science, Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The Atlantic Rainforest is one of the largest centers of biodiversity and species endemism in the world. Relief is one of the elements responsible for producing so much diversity. The environmental conditions in the mountains are very different from those in lowland areas because they have a greater temperature range, water restrictions and greater geographical isolation. As a result, species experience adaptations that reflect environmental variations and can disrupt biotic exchanges with neighboring plains. Hematozoan parasites such as *Trypanosoma* sp. are transmitted by a series of dipteran vectors abundantly present in this environment, affecting most local hosts and exerting selective pressure on avifauna, causing deleterious effects on health, reproductive success, behavior and community structure. The aim of this study was to correlate the elevation gradient of Itatiaia National Park with the prevalence and diversity of *Trypanosoma* sp. in the blood of wild birds using blood smears and PCR screening to verify the predominance of this hematozoan. Of the 230 slide smears observed under microscopy, the infective evolutionary form of *Trypanosoma* was found in 17 and 42 samples were PCR positive. Prevalence in the lower elevation gradient, below 1,000, was higher than in the higher elevation gradient, above 2,000, which suggests that temperature, environmental conditions, and vector diversity are more abundant in lower elevation areas, favoring transmission of the hematozoan. Phylogenetic analyses revealed 17 new sequences very close to *Trypanosoma Polygranularis* found in *Peliperdix lathamii* in Cameroon, Africa. A single sequence clustered close to the *Trypanosoma everetti* clade, a branch close to the *Trypanosoma everetti*-like species found in the host *Dumetella carolinensis*, USA. Our study demonstrated the diversity and prevalence of trypanosome species in different altitudinal gradients in the PNI. In Itatiaia National Park, the genetic diversity among *Trypanosoma* lineages in wild birds appears to be quite limited. Out of the 18 sequences obtained during this study, an impressive 17 are closely related to *Trypanosoma polygranularis* according to their phylogenetic analysis. Furthermore, the *Trypanosoma* sp. strains identified in this research exhibit a broad host range, as they have been observed in no fewer than 12 different bird species.

Keyword: Tripanosomatids, Atlantic Forest, Passerines, Phylogenetic analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão ilustrativa da Parte Baixa e Parte Alta adotadas no diagnóstico da Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional de Itatiaia. Fonte: ICMbio (2013)11

Figura 2: Esfregaços sanguíneos corado com Giemsa na magnitude de 1000x onde são visualizadas formas tripomastigota de *Trypanosoma* sp. em espécies de aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia (PNI). A) ITA135 - *Tachyphonus coronatus*; B) ITA139; C) ITA220; D) ITA240 - *Schiffornis virescens*; E) ITA142 - *Dysithamnus mentalis*; F) ITA 167 - *Conopophaga melanops*; G) ITA 218 - *Lochmias nematura*; H) ITA166; I) 166 - *Conopophaga melanops*; J) ITA145, L) ITA23; M) ITA238 - *Platyrinchus mystaceus*, N) ITA184; O) ITA229 - *Synallaxis ruficapilla*; P) ITA204 - *Mionectes rufiventris*; Q) ITA212 - *Penelope obscura*; R) ITA228, S) ITA236 - *Rhopias gularis*; T) ITA218.....21

Figura 3: Frequência de infecção por *Trypanosoma* sp. em aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia, Rio de Janeiro, nas altitudes abaixo de 1000 e acima de 2000 metros.....22

Figura 4: Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 660 pares de base de 18 sequências 18S rDNA de *Trypanosoma* sp. obtidas a partir de amostras de sangue de aves.....24

Figura 5: Reconstrução filogenética baseada em um fragmento de 660 pares de base da sequência 18S rDNA de espécies do gênero *Trypanosoma*. O método de reconstrução filogenética foi o Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros + G + I. O método de Bootstrap com 1000 réplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Trypanosoma rotatorium* (AJ009161) e *Trypanosoma mega* (AJ009157) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software MEGA X. Barra representa 1 substituição por posições de 100 nucleotídeos.....25

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

- Tabela 1:** Relação de amostras positivas para *Trypanosoma* sp. em aves capturadas no PNI em gradiente de altitude acima de 2.000, utilizando as técnicas de nested PCR e esfregação sanguíneo.....18
- Tabela 2:** Relação de amostras positivas para *Trypanosoma* sp. em aves capturadas no PNI em gradiente de altitude abaixo de 1.000, utilizando as técnicas de nested PCR e esfregação sanguíneo.....19
- Tabela 3:** Quantidade de aves silvestres amostradas no Parque Nacional de Itatiaia categorizadas por família e a frequência de *Trypanosoma* sp. obtida através da técnica de nPCR.....23

LISTA DE ABREVIATURAS

ANM	Acima do Nível do Mar
°C	Celsius
CBRO	Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CTF	Cadastro Técnico Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITA	Itatiaia
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
PNI	Parque Nacional do Itatiaia
PPGCV	Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SSU	Subunidade menor
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A família Trypanosomatidae	4
2.2 O gênero <i>Trypanosoma</i>	4
2.3 <i>Trypanosoma</i> sp. em aves e suas relações filogenéticas	7
2.4 O Parque Nacional de Itatiaia	10
2.4.1 A avifauna do Parque Nacional de Itatiaia	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Autorização de pesquisa.....	13
3.2 Coleta das Amostras	13
3.3 Análises microscópicas.....	14
3.4 Extração do DNA total a partir de FTA® card	14
3.5 Reação em Cadeia da Polímerase <i>aninhada</i>	15
3.6 Análise do sequenciamento	16
3.7 Análise filogenética	16
3.8 Análise Estatística.....	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Análise das amostras	18
4.2 Formas evolutivas de <i>Trypanosoma</i> sp. e seus respectivo hospedeiros	20
4.3 Análise de prevalência de aves infectadas em relação a gradiente de altitude	22
4.4 Prevalência de aves infectadas por <i>Trypanosoma</i> sp. por família	22
4.5 Análise do sequenciamento e filogenia.....	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO.....	30
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O ecossistema brasileiro detém a maior diversidade biológica do planeta, dispondo de mais de 103.870 espécimes de animais e 4.020 espécies vegetais (RENCTAS,2017), amplamente distribuídos nos seis biomas terrestres e nos três ecossistemas marinhos. As florestas neotropicais distribuídas pelo mundo, possuem uma grande diversidade de aves, que apresentam o segundo maior táxon em quantidade de exemplares registrados, para o Brasil registra-se uma avifauna de 1.919 espécies, distribuídas em 33 ordens, 103 famílias e 705 gêneros (PACHECO et al., 2021).

Nesse escopo, a Mata Atlântica é amplamente reconhecida como um dos maiores *hotspots* para espécies de aves no país, com aproximadamente 891 espécies documentadas. Dentro deste ecossistema existem 27 gêneros e 203 espécies de aves exclusivas da região (CBRO, 2015). A maioria das espécies registradas na Mata Atlântica pertence à ordem Passeriformes, que engloba 55% das espécies de aves conhecidas no globo e muitas dessas espécies estão sob ameaça de extinção (PIVETTA et al. 2014). Vários elementos combinados, como: fatores ambientais, climáticos, topográficos e antropogênicos, têm exercido consistentemente pressão sobre o bioma terrestre, impactando diretamente a composição da comunidade de aves silvestres (LOGIUDICE et al. 2003).

Somando-se a esses fatores temos as infecções parasitárias que têm potencial para serem patogênicas, levando à mortalidade indivíduos naturalmente infectados (FERREIRA JUNIOR et al., 2016) e que conseqüentemente, são considerados uma das principais pressões seletivas sobre a avifauna silvestre (ARRIERO et al., 2018). Essas infecções podem ser ocasionadas por hemoprotozoários, tais como o *Trypanosoma* sp. Desta forma, pesquisas sobre parasitismo em passeriformes da Mata Atlântica são necessárias para subsidiar ações conservacionistas na biodiversidade local da avifauna.

Os tripanossomas aviários são encontrados em todos os continentes, com exceção das regiões polares. Em 1885, Basil Danilewsky realizou descrição de *Trypanosoma avium* utilizando a coruja *Strix aluco*. Desde então, muitos tripanossomas aviários foram identificados e documentados (BENNETT et.al, 1994). A maioria das pesquisas e registros sobre a diversidade de tripanossomatídeos aviários são conduzidos na Europa e na América do Norte, enquanto pesquisas limitadas sobre aves são realizadas na América do Sul. Mesmo após um século de relatos desses parasitas, persiste a escassez de dados sobre a diversidade de tripanossomas aviários no Brasil e apenas o trabalho de Duarte (2022) explora a diversidade molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves silvestres no país.

A literatura indica que quatro espécies distintas de tripanossomas aviários podem ocorrer no Brasil, porém, a única espécie documentada como legítima é *Trypanosoma avium* (PLIMMER, 1911). Outros relatos de espécies de tripanossoma no Brasil como: *T. minus*, *T. schistochlamydis* e *T. zonotrichia* (CERQUEIRA, 1906; SPLENDORE, 1910) têm sido questionados quanto à sua validade porque acreditava-se que havia uma relação espécie-específica entre tripanossomas e espécies aviárias, mas esta teoria tem sido constantemente refutada (VOTPYKA et al., 2012; ZIDKOVA et al., 2012; GALEN et al., 2020). O desafio apresentado em pesquisas em relação a caracterização de espécies de *Trypanosoma* devido à baixa carga parasitária no sangue, a variação significativa nas formas parasitárias encontradas no sangue dos hospedeiros aviários e a complexidade taxonômica deste grupo (VALKIUNAS et al. 2011) justificam a escassez de informações sobre a diversidade de *Trypanosoma* presentes em aves do território brasileiro. Devido à falta de estudos abrangentes, é possível que haja outras espécies de tripanossomas na avifauna ainda não identificados no país. Portanto, mais pesquisas são necessárias para compreender a diversidade desses parasitos em aves na América do Sul, especialmente no Brasil. A partir da incorporação de análises de biologia molecular ao conjunto de métodos utilizados, foi possível obter uma compreensão mais aprofundada da diversidade de espécies do gênero *Trypanosoma*. Porém, estudos sugerem que o número de espécies de tripanossomas pode ser maior do que o previsto anteriormente (SVOBODOVA et al., 2004; VALKIUNAS et al., 2011; VOTÝPKA et al. 2012)

Estudos filogenéticos e moleculares recentes demonstraram que existem três cladogramas diferentes de tripanossomas aviários: *T. avium*, *T. corvi* e *T. bennetti* confirmados, recentemente utilizando marcadores moleculares SSU rRNA e gGAPDH. Novos grupos de tripanossomas aviários vem sendo propostos utilizando sequências genéticas encontradas em aves e vetores como por exemplos o clado de *Trypanosoma cullicavium*. Um último clado é formado por *Trypanosoma* spp. muito próximos de *Trypanosoma benetti* (HAMILTON et al., 2007; VOTÝPKA et al., 2012; ORTIZ S. et al., 2016; SLAPETA et al., 2016; MASLOV, et al., 2018 GALEN et al., 2020).

Uma característica específica da estrutura dos tripanossomatídeos é a presença de genes nucleares de DNA ribossomal (rDNA), os quais exibem um dos padrões mais complexos de moléculas de RNA. A presença de rDNA é onipresente em todos os organismos e exibe equivalência funcional, conseqüentemente, o gene rDNA (18S) tem sido considerado adequado para testes de inferência de relações filogenéticas. A subunidade menor (SSU) é normalmente escolhida para análise devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de amplificação usando PCR

e presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas. Sequências de rDNA SSU tem sido empregada para abordar as questões filogenéticas e evolutivas relativas ao gênero *Trypanosoma*. (VOTYPKA et al, 2004; HAMILTON et al., 2008; ZÍDKOVÁ et al., 2012) e as investigações revelam possíveis restrições e interações com os hospedeiros, estruturas eco geográficas, insetos vetores e transmissão por hospedeiros que compartilham o mesmo ambiente. Todos esses fatores desempenham um papel de relevância na evolução dos tripanossomatídeos (DUARTE, 2020).

O objetivo deste estudo foi estabelecer uma correlação entre a prevalência e diversidade de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres capturadas em diferentes gradientes de altitude no Parque Nacional de Itatiaia, Rio de Janeiro utilizando métodos citológicos e PCR baseado na sequência 18S rRNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) é composta por organismos protistas, eucariotos, unicelulares e flagelados, que em sua maioria são parasitas de células nucleadas de vários seres vertebrados, invertebrados e plantas. Os gêneros que compõe essa família são: *Trypanosoma*, *Blechnomonas*, *Sergela*, *Wallacemonas*, *Hepertomonas*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Crithidia*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Kentomonas* e *Leishmania* (VOTÝPKA et al., 2015).

Esses parasitas podem apresentar ciclo de vida monoxeno (ciclos dentro de um único hospedeiro) ou heteróxenos (ciclos dentro de dois ou mais hospedeiros), característica que distingue esses gêneros dos outros. Nos estágios evolutivos dos tripanossomatídeos, as morfologias celulares dos protozoários de ciclo heteróxeno mudam durante o desenvolvimento do parasito no interior do hospedeiro como adaptação a troca de hospedeiro. Isso permite que os protozoários se adaptem fisiologicamente e se preparem para o novo ciclo de vida (LUKEŠ et al., 2014).

A família Trypanosomatidae difere das outras famílias da ordem Kinetoplastidae na forma, comprimento e largura do corpo, comprimento do flagelo livre, tamanho e posição do núcleo e de uma única mitocôndria chamada cinetoplasto, que fornece energia para a manutenção dos organismos e que os torna distintos. (TANIFUJI et al., 2017). A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, bem como a presença ou não de membrana ondulante e flagelo livre, determinam as diferentes formas de desenvolvimento apresentadas por esses organismos ao longo do seu ciclo de vida. Essas formas incluem amastigota, promastigota, coanomastigota, epimastigota, tripomastigota e opistomastigota e variam conforme o gênero do tripanossomatídeo, o vetor hematófago que as abrigam e ao hospedeiro definitivo. Além disso, foram descritas as formas consideradas estágios de transição ou raras, como paramastigotas e endomastigotas (SIMPSON et al., 2006; STEVENS, 2008).

2.2 O gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* abrange espécies que fazem seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados ou invertebrados, e a variedade dos tripanossomas reflete a variedade desses hospedeiros. Os vetores podem ser dípteros, hemípteros, pulgas, carrapatos e sanguessugas (SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; STEVENS, 2008; ALVAREZ, 2017). Os

hospedeiros vertebrados podem ser aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos (SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; STEVENS et al., 2008).

Os representantes do gênero *Trypanosoma* foram inicialmente divididos em dois grandes grupos: Salivaria e Stercoraria. Esses grupos foram nomeados de acordo com seu desenvolvimento no inseto vetor e a forma como transmitiam (HOARE, 1972). A subdivisão salivaria refere-se às glândulas salivares ou probólide dos insetos vetores e ao tubo digestivo médio. Seus representantes são *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma rangeli*, e sua transmissão ocorre por meio da inoculação de formas tripomastígotas metacíclicas junto com a saliva durante o repasto sanguíneo. Os parasitos da secção Stercoraria crescem no intestino posterior de seu hospedeiro invertebrado e são eliminados pelas fezes, que é quando as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas, contaminam os dos vertebrados através das mucosas ou alguma lesão na pele; *T. cruzi* é um dos representantes mais estudados. (ESPINOSA,2015; RAMÍREZ-IGLESIAS et al., 2017; NANTES,2019).

Os clados compõem o gênero *Trypanosoma* atualmente são seis. Eles incluem o clado *T. brucei*, o clado *T. lewisi*, o clado *T. theileri*, o clado das aves, o clado aquático e o clado *T. cruzi* (VOTÝPKA et al., 2012; ESPINOSA, 2014; SLAPETA et.al., 2016; GALEN et. al., 2020).

Os subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*), *Duttonella* (*T. vivax*), *Pycnomonas* (*T. suis*), *Nannomonas* (*T. congolense* e *T. simiae*) compõem o clado *Trypanosoma brucei*, que é originário da África (HOARE, 1972; ESPINOSA,2014; NANTES, 2019).

O clado *T. lewisi* pertence ao subgênero *Herpetosoma*, onde os tripanosomas parasitam as ordens Rodentia e Lagomorpha. Está representado pela espécie tipo *T. lewisi*, um parasita encontrado em todo o mundo no rato doméstico. No Brasil, estes parasitas infectaram macacos (MAIA DA SILVA et al., 2010). Estudos recentes descobriram infecções humanas por *T. lewisi* na Ásia e na África (ESPINOSA, 2014; NANTES, 2019).

O subgênero *Megatrypanum* é responsável pelo clado *T. theileri*, e a espécie-tipo *T. theileri* consiste em tripanosomas isolados principalmente de ruminantes. Os parasitas são comuns em todo o mundo e geralmente encontrados em bovinos, bubalinos, ovinos, cervídeos e antílopes. As espécies deste grupo são significativamente distintas das espécies dos outros hospedeiros vertebrados, embora sejam muito relacionadas (RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; GARCÍA et al., 2011; ESPINOSA, 2014 e NANTES, 2019).

A maioria dos isolados de aves pertence ao clado *Trypanosoma avium*/*Trypanosoma corvi*, com exceção de *Trypanosoma benetti*, porém, estudos mais recentes, utilizando os marcadores moleculares 18S rRNA e gGAPDH descobriram além de uma origem polifilética dos tripanossomas três clados com suporte robusto, a saber :clado *Trypanosoma avium*, clado *Trypanosoma corvi* e um terceiro clado com linhagem de tripanossoma ainda não identificado que se aproximou do *Trypanosoma benetti*. Novas espécies de tripanossomas aviários foram encontrados em dípteros e aves como exemplo: *T. cullicavium* e *T. thomasbancrofti*, *T. anguiformis* e *T. polygranularis*, revelando avanços nos estudos filogenéticos do gênero *Trypanosoma* que parasitam aves (VOTÝPKA et al., 2012; SLAPETA et.al., 2016; PORNANOM et al., 2019; GALEN et. al., 2020).Estes clados, juntamente com os isolados de serpentes e lagartos (triplanosomas de répteis), ainda carecem de estudos mais abrangentes que permitam elucidar as relações filogenéticas e o posicionamento desses grupos diante aos demais clados de tripanossomas (VIOLA et al., 2008; NANTES, 2019; GALEN et al., 2020).

2.2.1 Ciclo de vida e transmissão em animais

O ciclo de vida dos parasitas do gênero *Trypanosoma* é de natureza complexa, envolvendo uma série de estágios de desenvolvimento que se distinguem por mudanças estruturais e metabólicas nas células desses protozoários. As alterações são consequências de adaptações que os parasitas sofrem nos diferentes organismos que lhes servem de hospedeiros: invertebrados e vertebrados. Os tripanossomatídeos apresentam uma variedade de formas que apresentam capacidade infecciosa ou reprodutiva, dependendo do hospedeiro em que se encontram e da fase do ciclo celular. Este fenômeno está associado à necessidade dos parasitas sobreviverem em seus respectivos ambientes. Portanto, uma mudança no ambiente acarreta alterações morfológicas significativas. As formas infecciosas para o hospedeiro vertebrado são denominadas tripomastígotas metacíclicas, enquanto as formas reprodutivas são amastigotas e epimastígotas (SOUTO-PADRÓN et al., 2002).

Os tripanossomas possuem uma morfologia tipicamente fusiforme, com extremidades posteriores mais ou menos arredondadas, com um flagelo e uma única mitocôndria ocupando longitudinalmente o corpo. Eles são compostos por um corpo basal do flagelo, ou blefaroplasto, e um DNA mitocondrial, ou corpo parabasal. Seu complexo cinetoplástico está relacionado ao movimento. A pinocitose e, principalmente, a saprocitose são responsáveis pela nutrição. Estes parasitas também apresentam um amplo polimorfismo ao longo de seu ciclo evolutivo. Dependendo da espécie, cada parasita pode passar de várias formas durante seu ciclo de vida

que são tripomastigota, epimastigota, promastigota e amastigota (SOUTO-PADRÓN et al., 2002; OROZCO, 2004; LUKEŠ et al. 2014; SIMPSON et al., 2006; STEVENS, 2008).

A forma tripomastigota tem um complexo cinetoplastídico posterior com um flagelo recorrente que está preso à parede celular por uma membrana ondulante. Esse flagelo permanece como um flagelo livre quando atinge a extremidade anterior do corpo. Já a forma evolutiva epimastigota possui um complexo cinetoplastídico próximo ao núcleo, no qual o flagelo forma uma membrana ondulante curta. Até atingir sua extremidade anterior, o flagelo forma uma membrana ondulante curta. A forma promastigota possui uma parte do flagelo livre, resultado de um complexo cinetoplástico anterior. Por fim, no início do ciclo temos a forma amastigota que possui forma esférica ou subesférica, apresentando um núcleo e complexo cinetoplastidial próximo não possuindo flagelo (REY, 2001; OROZCO, 2004; VARGAS, 2014; ALVAREZ, 2017).

Segundo Hamilton et al. (2007), a transmissão de tripanossomas por vetores hematófagos garante que pelo menos uma parte do ciclo de vida ocorra no hospedeiro vertebrado. Isso inclui invasão de tecidos e células. O desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados é complicado e variado, e inclui migrações para diferentes locais de desenvolvimento e ciclos de diferenciação e multiplicação no trato digestivo. As formas infectantes podem ser desenvolvidas nas regiões bucais e então transmitidas de forma inoculativa durante uma alimentação via saliva, ou na parte posterior do intestino, onde são transmitidas via contaminação pelas fezes de forma mecânica (transmissão cíclica). A ingestão do vetor também pode transmitir o patógeno. A transmissão também pode ser acíclica ou mecânica, sem as transformações do protozoário no vetor, por contaminação direta entre hospedeiros.

Várias espécies de tripanossomatídeos heteroxênicos causam doenças em humanos e animais como o *Trypanosoma brucei gambiense*, que causa a doença do sono ou tripanossomíase humana africana e tem pouca importância em animais apesar de infectar ungulados bovinos regularmente; *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas na América Latina; *Trypanosoma vivax*, que infecta ungulados na África e América do Sul (ALVAREZ, 2017).

2.3 *Trypanosoma* sp. em aves e suas relações filogenéticas

A tripanossomíase aviária ocorre em todos os continentes, exceto nas regiões polares. Em 1885, o professor Basil Danilewsky descreveu o tripanosoma em aves, usando a coruja

Strix aluco e diagnosticou o *Trypanosoma avium* (BENNETT et al., 1994). Cerca de 20% das espécies já conhecidas de tripanossoma foram descritas em aves e na maioria dos casos, esses parasitas não possuem alta patogenicidade em seus hospedeiros (BAKER, 1976; HAMILTON et al., 2007; FIALOVA et al., 2021), permanecendo pouco estudados, embora não sejam menos admirável.

Trypanosoma spp. infecta mais frequentemente rapinantes e aves canoras, mas também é encontrado em muitas outras espécies de aves (APANIUS, 1991). Os insetos (como mosquitos, borrachudos e hipoboscídeos) funcionam como vetores quando se alimentam do sangue de aves infectadas, quando são ingeridos pela ave ou quando a mucosa ocular ou feridas da ave são contaminadas com fezes do inseto (SEHGAL et al., 2011; MASLOV et al., 2018). Morfologicamente, as formas tripomastigotas dos tripanossomas das aves geralmente são muito grandes com uma extremidade posterior pontiaguda que se estende por trás do cinetoplasto. Após fixação e coloração, algumas espécies apresentam estrias longitudinais na superfície do corpo. A membrana ondulante é normalmente visível e, em algumas espécies, o flagelo livre se estende anteriormente além da terminação do citoplasma. Todas as organelas comuns ao gênero estão presentes no tripanossoma aviário, e não há evidências de que tenham alguma estrutura específica.

As formas evolutivas conhecidas de tripanossoma aviário são amastigota, epimastigota e tripomastigota sanguínea. Porém, somente a forma tripomastigota é a forma infectante sendo encontrada no sangue periférico das aves. O ciclo do protozoário se inicia no tubo digestivo do vetor, onde os tripanossomas sofrem uma mudança morfológica. Isso resulta em uma forma alongada chamada tripomastigota metacíclico, que é a forma infectante do parasita. Quando o vetor é ingerido ou se alimenta das aves as fezes ou a saliva do vetor liberam os tripomastigotas metacíclicos. No ciclo intracelular quando os tripomastigotas atingem o hospedeiro aviário, eles são internalizados pelos macrófagos ou pelas células do sistema linfático. Dentro das células, eles se transformam em amastigotas, que são formas arredondadas e não flageladas. As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária dentro das células hospedeiras aviárias. Posteriormente, eles podem ser excretados no sangue, onde são novamente convertidos em tripomastigotas. Eles podem infectar outras células neste ponto ou ser ingeridos por vetores hematófagos durante o processo de alimentação (HAMILTON et al., 2007; VALKIŪNAS et al., 2011; SEHGAL, et al., 2015; ŠLAPETA et al., 2016; ORTIZ et al., 2016; MASLOV et al., 2018; SANTOLIKOVA, 2022).

As questões de ancestralidade e evolutivas do gênero *Trypanosoma* continua sendo objeto de controvérsia. Os primeiros estudos filogenéticos sugeriram uma origem parafilética para os organismos desse grupo (MASLOV et al., 1996; ESPINOSA, 2015; SLAPETA et al., 2016; NANTE, 2019). Com base nesses estudos e com a descoberta de novas espécies, foi possível determinar as relações evolutivas entre espécies distantes observando que o gênero *Trypanosoma* tinha uma origem monofilética, ou seja, independentemente de sua espécie hospedeira, esses organismos tinham um ancestral comum (LUKES et al. 2014; VALKIUNAS et al., 2011; LIMA et al., 2014; ESPINOSA, 2015; SLAPETA et al., 2019; NANTES, 2019).

Utilizando sequências dos genes de SSU rRNA alguns autores sugeriram a polifilia do gênero *Trypanosoma* (VOTÝPKA et al., 2004, 2012; PORN PANOM, 2019). Demais estudos baseados em análises filogenéticas de um maior número de espécies baseadas em sequências independentes e combinadas dos genes SSU rRNA e gGAPDH relataram a monofilia do gênero *Trypanosoma* e que as inúmeras espécies a ele pertencentes provavelmente compartilham um ancestral comum e exclusivo (LUKES et al, 2014; STEVENS et al., 1998; PORN PANOM et al., 2019; GALEN et al., 2020). Essas análises apontam a hipótese de uma origem comum para todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes e sugerem a existência de uma divisão do gênero em dois: tripanossomas do clado aquático (hospedeiros vertebrados de hábito aquático) e outra que elenca os outros tripanossomas terrestres (HAMILTON et al., 2007; LUKES et al., 2014; SIMPSON et al., 2008; STEVENS et al., 2011). Outros estudos utilizando análises filogenéticas baseadas em diversos genes sugeriram a existência de três grandes clados dentro do gênero *Trypanosoma*: clado *Trypanosoma brucei*, clado *Trypanosoma cruzi* e o clado aquático (HAMILTON et al., 2007; STEVENS et al., 1999a, b, 2001).

Considerando os tripanossomas que infectam as aves, de acordo com estudos de Galen et al. (2020) os tripanossomas aviários possuem origem polifilética e podem pertencer aos subgêneros do clado dos mamíferos *Megatrypanum* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma theileri*) ou ao clado dos tripanossomas aviários: *Trypanosoma avium*, *Trypanosoma corvi*, *Trypanosoma benetti* e outro *Trypanosoma* sp. ainda não nomeado próximo ao *T. benetti* (VOTÝPKA et al., 2012; SLAPETA et al., 2016; PORN PANOM et al., 2019; GALEN et al., 2020).

Apenas três espécies de tripanossomas aviários descritas possuem material de culturas depositadas disponíveis: *T. bennetti*, *T. corvi* e *T. culicavium* (ZIDKOVA et al., 2012). A partir do sequenciamento dos genes (SSUrRNA, gGAPDH) e das análises filogenéticas atualmente

conhecemos oito espécies de tripanossomas: *T. anguiformis*, *T. avium*, *T. bennetti*, *T. corvi*, *T. culicavium*, *T. thomasbancrofti*, *T. gallinarum* e *T. polygranularis* (VALKIUNAS et al., 2011; ZIDKOVA et al., 2012; SLAPETA et al., 2016; PORNANOM et al., 2019; GALEN et al. 2020).

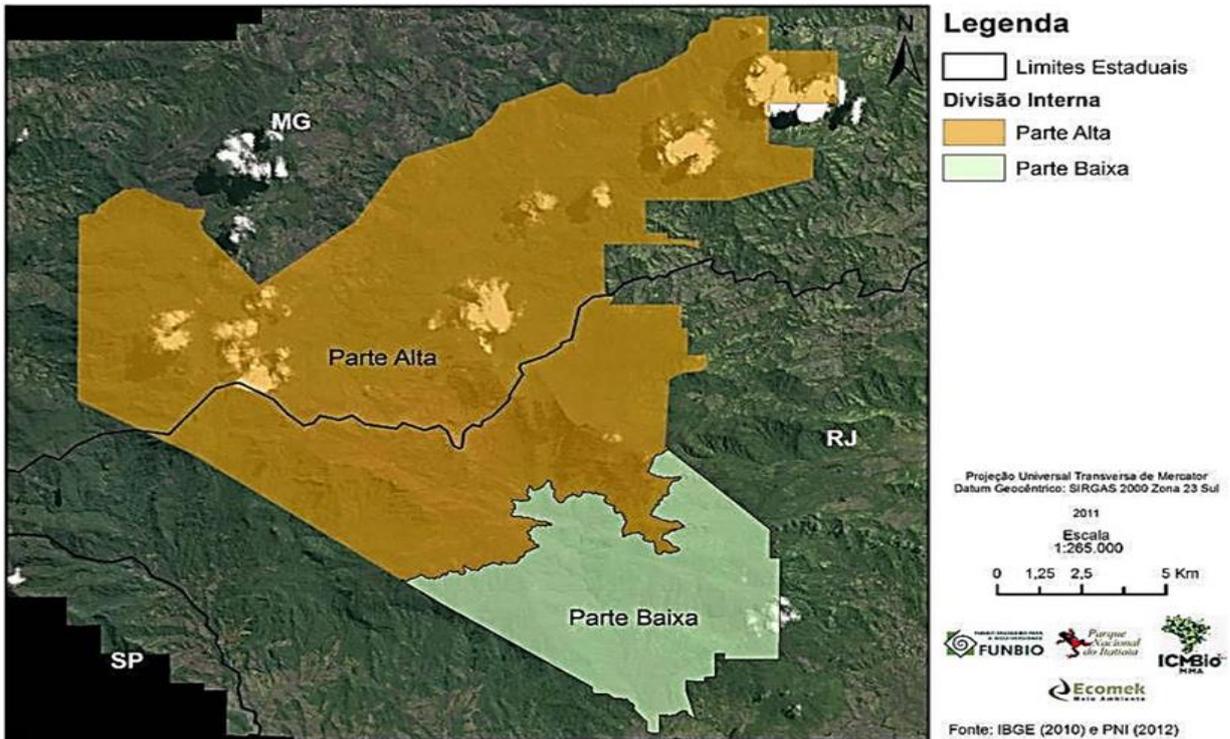
Para além da monofilia ou polifilia do gênero *Trypanosoma*, até aqui conclui-se que as espécies de tripanossoma que infectam aves pertencem ao grupo *Stercoraria*, e que aparentemente o vetor tem desenvolvido papel importante no processo de disseminação e manutenção do parasita no ambiente (ESPINOSA, 2015; SLAPETA et al., 2019; NANTES, 2019, PORNANOM et al., 2019; GALEN et al., 2020).

É importante mencionar que contexto ecológico das interações parasito-hospedeiro pode influenciar na transmissão e persistência de doenças. Dentre os fatores ambientais, a sazonalidade das estações de seca e chuva podem influenciar na prevalência de doenças veiculadas por vetores (LOPEZ-VÉLEZ & MORENO et al., 2005; ZAMORA et al., 2012), uma vez que em períodos chuvosos, cria-se condições favoráveis de umidade, temperatura e disponibilidade de locais de acúmulo de água necessários para a proliferação de mosquitos transmissores. Segundo Lobato (2012) a degradação do meio ambiente pode aumentar ou diminuir a prevalência do parasita, na medida em que pode alterar a proporção de hospedeiros intermediários ou definitivos.

2.4 O Parque Nacional de Itatiaia

O Parque Nacional de Itatiaia criado em 1937, sendo o primeiro do país. Situado na Serra da Mantiqueira entre os Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, a área abrange parte dos municípios de Itatiaia/RJ, Resende/RJ, Itamonte/MG e Bocaina de Minas/MG. O Parque tem relevo montanhoso, com o Pico das Agulhas Negras (Itatiaiaçu) como o 5º mais alto do Brasil, com altitudes que variam de 540 a 2.791 metros (figura 1). Desde a Floresta Ombrófila Densa Montana até os Campos de Altitude e Campos Ruprestes, o acentuado gradiente altitudinal permite a existência de vários ecossistemas no Bioma Mata Atlântica. Muitas espécies de flora e fauna estão lá, muitas delas endêmicas ou ameaçadas. A parte baixa caracteriza-se principalmente pela exuberante cobertura vegetal (floresta ombrófila densa), pelas belas cachoeiras e facilidade de observação de fauna. Na parte alta possui a paisagem formada por florestas alto-montanas, campos de altitude e impressionantes florações rochosas (ICMBIO, 2023).

Segundo CBRO (2015) o clima predominante na região do PNI é o subquente úmido. Os outros dois domínios são mesotérmicos brando-superúmido, mesotérmico brando-úmido. A área tem características de um clima ameno com umidade constante em todo o ano. Os climas do domínio Subquente têm temperaturas médias ligeiramente baixas, o que significa que o



verão tem menos temperaturas elevadas e o inverno tem mais temperaturas baixas. O efeito da altitude explica principalmente por que os meses mais frios têm temperaturas médias entre 15 e 18°C.

Figura 1. Divisão ilustrativa da Parte Baixa e Parte Alta adotadas no diagnóstico da Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional de Itatiaia. Fonte: ICMbio (2013).

As superfícies mais altas da região compõem o domínio mesotérmico, que é característico das latitudes mais altas, onde os climas são mais frios, com a média mensal dos meses mais quentes abaixo de 17°C e a média anual abaixo de 14°C). As chuvas durante o ano são mais extensas e uniformes. A geada é um fenômeno comum nessas áreas, especialmente nos pontos mais elevados geada. A precipitação na região dos cinco municípios da Região do PNI varia de 1.250 a 2.250 mm de precipitação mínima a 1.500 a 2.500 mm de precipitação máxima. Desta forma entre dezembro e março está o maior índice de precipitação de chuva 74%, com temperaturas médias entre 13 e 21°C, dependendo do local e da altitude.

2.4.1 A avifauna do Parque Nacional de Itatiaia

Atualmente, o Parque Nacional de Itatiaia (PNI) possui uma riqueza de espécies catalogadas de 384 espécies de aves. A avifauna da Mata Atlântica neste local foi estimada em 21 Ordens em 56 famílias diferentes na região do Itatiaia. As ordens mais representativas são: Passeriformes (228 spp.), Apodiformes (29 spp.), Accipitriformes (19 spp.), Piciformes (16 spp.) e Psittaciformes (15 spp.). Tyrannidae (43 spp.), Thraupidae (30 spp.), Trochilidae (26 spp.), Thamnophilidae (22 spp.), Furnariidae e Accipitridae (19 spp.) são as famílias com os representantes mais numerosos (ICMBIO, 2013; WIKIAVES, 2023).

As aves possuem características como plumagens, vocalizações, comportamentos e morfologias variadas de acordo com as espécies e adaptados a sobrevivência. Geralmente possuem o voo como a principal forma de deslocamento, fuga de predadores, acasalamento e captura de alimentos, podendo alcançar altitudes elevadas. A dieta das aves pode ser bastante variada, podendo ser composta por frutos, insetos, pequenos roedores e anfíbios; algumas aves podem se alimentar somente de frutas (frutívoras) ou de frutas e insetos, sendo consideradas generalistas (WIKIAVES, 2023).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Autorização de pesquisa

O Parque Nacional de Itatiaia concedeu permissões para a captura de aves para pesquisas de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos órgãos ambientais competentes, incluindo Lei Complementar no 140/11; Portaria no 12/2011, bem como a inscrição e regularidade dos participantes no Cadastro Técnico Federal do Ibama (CTF) e no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 80027 (Anexo A) conforme a Instrução Normativa. Além disso, o parecer que aprova o projeto foi emitido pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com o número de parecer 4863180222 (Anexo B).

3.2 Local do estudo e Amostragem

As coletas de amostras de sangue das aves foram realizadas no Parque Nacional de Itatiaia (PNI), RJ em áreas de altitudes que variam de 600 a mais de 2000 metros. Os períodos de coleta foram: de 17 a 20 de março de 2020 (20 espécimes); de 03 a 10 de fevereiro de 2021 (99 espécimes); e de 30 de março a 5 de abril de 2022 (111 espécimes) totalizando um número amostral de 230 indivíduos. Para as análises empregadas nesse estudo apenas dois níveis de altitude foram analisados. Os níveis de altitude foram estratificados da seguinte maneira: aves capturadas abaixo de 1000 metros e aves capturadas acima de 2000 metros.

A captura das espécies de aves silvestres foi efetuada utilizando entre 10 a 20 redes de neblina (12 metros de comprimento por 3 metros de altura com 36 milímetros de malha), estas foram mantidas armadas desde o amanhecer até as 13 horas, sendo verificadas num intervalo de 15 minutos. Todas as aves capturadas foram manejadas de forma cuidadosa para evitar o estresse do animal e acondicionadas em sacos de contenção de tecido para garantir o seu bem-estar no transporte para o local da coleta do material biológico.

Os exemplares foram pesados ainda nos sacos de contenção e contidos de forma adequada. Foram anotados dados biológicos como muda, estágio de vida e presença de ectoparasitos, seguidos pela coleta de amostra de sangue da ave, aplicação de pó hemostático na punção (para identificação no caso de recaptura) e imediata soltura.

Em todo material coletado foram utilizados materiais estéreis para acondicionamento da amostra e descartáveis quando luvas e agulhas. A coleta de sangue foi realizada por profissional

treinado por meio de uma única punção na veia ulnar da asa utilizando agulha hipodérmica descartável (25/7 mm) seguido da realização de esfregaço em lâmina e coleta de sangue em um cartão de papel de filtro, Whatman FTA® Cards (Sigma®), próprio para coleta e preservação do sangue para análise molecular.

Uma numeração correspondente à ficha de identificação da ave foi usada para identificar corretamente as amostras biológicas coletadas durante a captura de aves no Parque Nacional de Itatiaia. As lâminas foram fixadas por três minutos em metanol 100% e após secagem foram colocadas em embalagens especiais para transporte. Os FTA® cards foram acondicionados em embalagens plásticas fechadas por fita. As amostras foram processadas no Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) após a conclusão das coletas.

3.3 Análises microscópicas

Os esfregaços sanguíneos, foram secos ao ar e posteriormente fixados em metanol absoluto por três minutos e corados em Giemsa (1:9) por 40 minutos (Valkiunas et al., 2008). As lâminas foram examinadas em sua totalidade sob objetiva de imersão em óleo, em microscópio Olympus BX 53, em aumento de 100x. As imagens dos tripanosomas foram capturadas câmera Motic8 (Software Motic Images Plus 3.1).

3.4 Extração do DNA total a partir de FTA® card

O DNA genômico foi extraído a partir do FTA® Card da seguinte forma: a amostra no papel filtro foi cortada em pequenos círculos utilizando punch de 3 mm ou 6 mm de acordo com o tamanho da amostra no papel. Para extração, após vários testes foi criado um protocolo onde foram utilizadas 1 amostra de 6 mm ou duas de 3 mm de cada de ave, que foram colocadas em um tubo de 2 µL com tampa de rosca seguida pela adição de 200 µL de solução de salina tamponada com fosfato, com pH de 7,2 e de 3 beads (esferas). Os tubos foram colocados no aparelho homogeneizador de amostras (Disruptor de células e tecidos – L-BEADER) utilizando microesferas (beads) com objetivo de rompimento mecânico do FTA® card para extração das amostras de sangue.

O homogeneizador de amostras foi configurado para 2 ciclos de 3400rpm de 60 segundos. A amostra foi retirada do tubo e transferida a um novo tubo de 2 µL. O DNA total da amostra foi extraído utilizando o kit comercial (Kit de purificação de DNA genômico

PureLink™ (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante com alteração protocolar apenas no tempo de incubação da amostra no termobloco para 1h30min.

O DNA extraído foi quantificado por espectrometria (Nanodrop ND-2000) e as amostras que continham concentração de DNA superior a 60 ng/uL foram diluídas em tampão de eluição do kit de extração, ficando a quantificação das amostras variando entre 20 ng/uL a 60 ng/uL nas alíquotas. As amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 µL e acondicionadas na temperatura de -80 °C.

3.5 Reação em Cadeia da Polímerase *aninhada*

As amostras de DNA das aves silvestres foram submetidas à amplificação do fragmento de 780pb do 18S do rDNA ribossomal de *Trypanosoma* spp. por *nested* PCR. As reações foram realizadas utilizando dois pares de primers de acordo com o protocolo modificado de Valkiūnas et. al. (2011).

Na primeira reação foram utilizados os primers forward Tryp763 (CAT ATG CTT GTT CAA GGA C) e reverse Tryp1016 (CCC CAT AAT CTC CAA TGG AC). O volume da mistura utilizada na reação foi 25 µL, contendo: 1X de tampão de enzima (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 3 mM de Cloreto de magnésio, 0,4mM de dNTP (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 0,6 µM de cada primer e 1,5 U de enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA) e 2,0µL de DNA genômico.

As condições de termociclagem foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 5 ciclos nas temperaturas de 95°C/60s, 45°C/60s e 72°C/60s seguido por 35 ciclos nas temperaturas de 95°C/60s, 50°C/60s e 72°C/60s e extensão final a 72°C por 5 minutos. Na segunda reação foram utilizados os primers forward Tryp99 (TCA ATC AGA CGT AAT CTG CC reverse e Tryp957 (CTG CTC CTT TGT TAT CCC AC).

Na segunda reação foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes da primeira e 3,0µL do produto da primeira PCR. As condições de termociclagem da segunda reação foram desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por 35 ciclos na temperatura a 96°C/30s, 53°C/60s, 72°C/60 se extensão final de 72°C por 7 minutos. O termociclador utilizado nas reações foi ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Foram utilizados como controle positivo o DNA extraído do sangue de aves positivas para *Trypanosoma* sp. na visualização em lâminas e como controle negativo água ultrapura.

Os produtos da segunda etapa da nPCR foram separados e visualizados em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta. As amostras

positivas para *Trypanosoma* sp. foram purificadas utilizando o kit comercial ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) nas condições indicadas pelo fabricante e armazenadas no freezer em placa de PCR de 0,2ml em temperatura de -20°C. As amostras foram enviadas para sequenciamento tipo Sanger na Rede de Plataforma Tecnológica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. O sequenciamento foi realizado utilizando os primers Tryp99 e Tryp957.

3.6 Análise do sequenciamento

As sequências obtidas foram submetidas a um teste de triagem de qualidade utilizando o software Phred-Phrap (versão 23) (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998) para avaliar a qualidade dos eletroferogramas e obter as sequências consenso a partir do alinhamento das sequências sensu e anti-sensu. O programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para comparar as sequências obtidas com sequências previamente depositadas no banco de dados GenBank (BENSON et al., 2002). As sequências foram salvas no formato “FASTA” e alinhadas com outras sequências 18S rDNA de *Trypanosoma* spp. recuperadas do banco de dados (Genbank), utilizando o software MAFFT (KATO e STANDLEY, 2013).

3.7 Análise filogenética

A reconstrução filogenética foi realizada usando um conjunto de dados 18 sequências 18S rDNA de *Trypanosoma* spp. obtidas no presente estudo e sequências recuperadas no Genbank. A escolha das sequências e grupos externos utilizados nas análises filogenéticas baseou-se na topologia descrita por Votýpka et al. (2004), e atualizado por trabalhos realizados por Zídková et al. (2012), Pornpanom et al. (2010) e Galen et al. (2020). O alinhamento das sequências foi analisado na plataforma Gblocks para resolver posições mal alinhadas (TALAVERA & CASTRESANA, 2007). Após a análise obteve-se uma matriz com aproximadamente 660 pb. A inferência das relações filogenéticas de *Trypanosoma* spp. foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança implementada no programa MEGA X (Tamura et al, 2021), utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros + GAMMA + I (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994). Para a escolha do melhor modelo de substituição foi empregado o software JmodelTest implementado no MEGA x (KUMAR et al., 2016). Os índices de suporte dos clados foram avaliados através de análises de Bootstrap com 1000 repetições. As árvores filogenéticas foram editadas usando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (Stover e Muller, 2010).

3.8 Análise Estatística

A frequência de *Trypanosoma* sp. em aves capturadas em diferentes estratos de altitude foi analisada pelo teste de Qui-Quadrado em nível de 95% de significância. A probabilidade de infecção por *Trypanosoma* sp. em aves capturadas nos diferentes gradientes de altitude foi calculada através da razão de chance (Odds Ratio) admitindo um erro de 5%. O desempenho do nPCR e do esfregaço sanguíneo para a detecção de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres foram comparados através do teste de McNemar admitindo um erro de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no software BioEstat v.5.3 (AYRES, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Análise das amostras

No Parque Nacional de Itatiaia foram amostradas o total 230 indivíduos em dois gradientes de altitude abaixo de 1.000 metros (111 espécimes) e acima de 2.000 metros (119 espécimes), distribuídos entre sete ordens, 24 famílias e 67 espécies (Tabela 1). Dentre as amostras positivas para *Trypanosoma* sp. obtivemos exemplares de três Ordens: Galiformes (uma espécie), Piciformes (uma espécie) e Passeriformes (26 espécies), sendo a última de maior relevância, somando um total de 13 famílias positivas em PCR e esfregaço sanguíneo ou somente em PCR (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Relação de amostras positivas para *Trypanosoma* sp. em aves capturadas no PNI em gradiente de altitude acima de 2.000 utilizando as técnicas de *nested* PCR e esfregaço sanguíneo

Família	Espécies	Altitude	PCR	Esfregaços
Fringillidae	<i>Spinus magellanicus</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Furnariidae	<i>Asthenes moreirae</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Pipridae	<i>Neopelma chrysolophum</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Rhynchocyclidae	<i>Hemitriccus diops</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Thraupidae	<i>Stephanophorus diadematus</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
	<i>Tangara desmaresti</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
	<i>Myiarchus swainsoni</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
Tyrannidae	<i>Elaenia mesoleuca</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
	<i>Phyllomyias fasciatus</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo
	<i>Knipolegus nigerrimus</i>	Acima de 2000	Positivo	Negativo

Tabela 2. Relação de amostras positivas para *Trypanosoma* sp. em aves capturadas no PNI em gradiente de altitude abaixo de 1000 utilizando as técnicas de *nested* PCR e esfregaço sanguíneo

Família	Espécies	Altitude	PCR	Esfregaços
Conopophagidae	<i>Conopophaga melanops</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Conopophaga melanops</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
Cracidae	<i>Penelope obscura</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Euphonia pectoralis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Fringillidae	<i>Euphonia pectoralis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Euphonia pectoralis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Euphonia pectoralis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Furnariidae	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Lochmias nematura</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
Picidae	<i>Picumnus cirratus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Pripridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Manacus manacus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Platyrinchidae	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Mionectes rufiventris</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Rhopias gularis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
Thamnophilidae	<i>Rhopias gularis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Coereba flaveola</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Schiffornis virescens</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
	<i>Schiffornis virescens</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
	<i>Schiffornis virescens</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Positivo
Troglodytidae	<i>Troglodytes musculus</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo
Turdidae	<i>Turdus flavipes</i>	Abaixo de 1000	Positivo	Negativo

No exame citológico 7,39% (n=17/230) das amostras analisadas apresentaram formas tripomastígotas de *Trypanosoma* sp. Na análise por nPCR 18,26% (n=42/230) foram consideradas positivas. Todas as amostras positivas no exame citológico foram positivas na nPCR. Como esperado, o teste de nPCR foi mais sensível que o exame citológico (p=0,0001) na detecção de *Trypanosoma* sp. em sangue de ave silvestre.

4.2 Formas evolutivas de *Trypanosoma* sp. e seus respectivo hospedeiros

Foi possível visualizar no exame citológico características morfológicas como o flagelo (na maioria das lâminas), cinetoplasto na região apical e núcleo com variações morfológicas que vão de fusiforme, arredondados ou em forma mais alongada e delgada. Algumas formas evolutivas apresentaram manchas roxas na região apical e posterior e com grânulos azurófilos. Essas características são semelhantes a *Trypanosomas polygranularis* (VALKIUNAS et al., 2011) (Figura 2). Não foi possível realizar morfometria devido ao pleomorfismo do parasita e a baixa parasitemia observada nas lâminas.

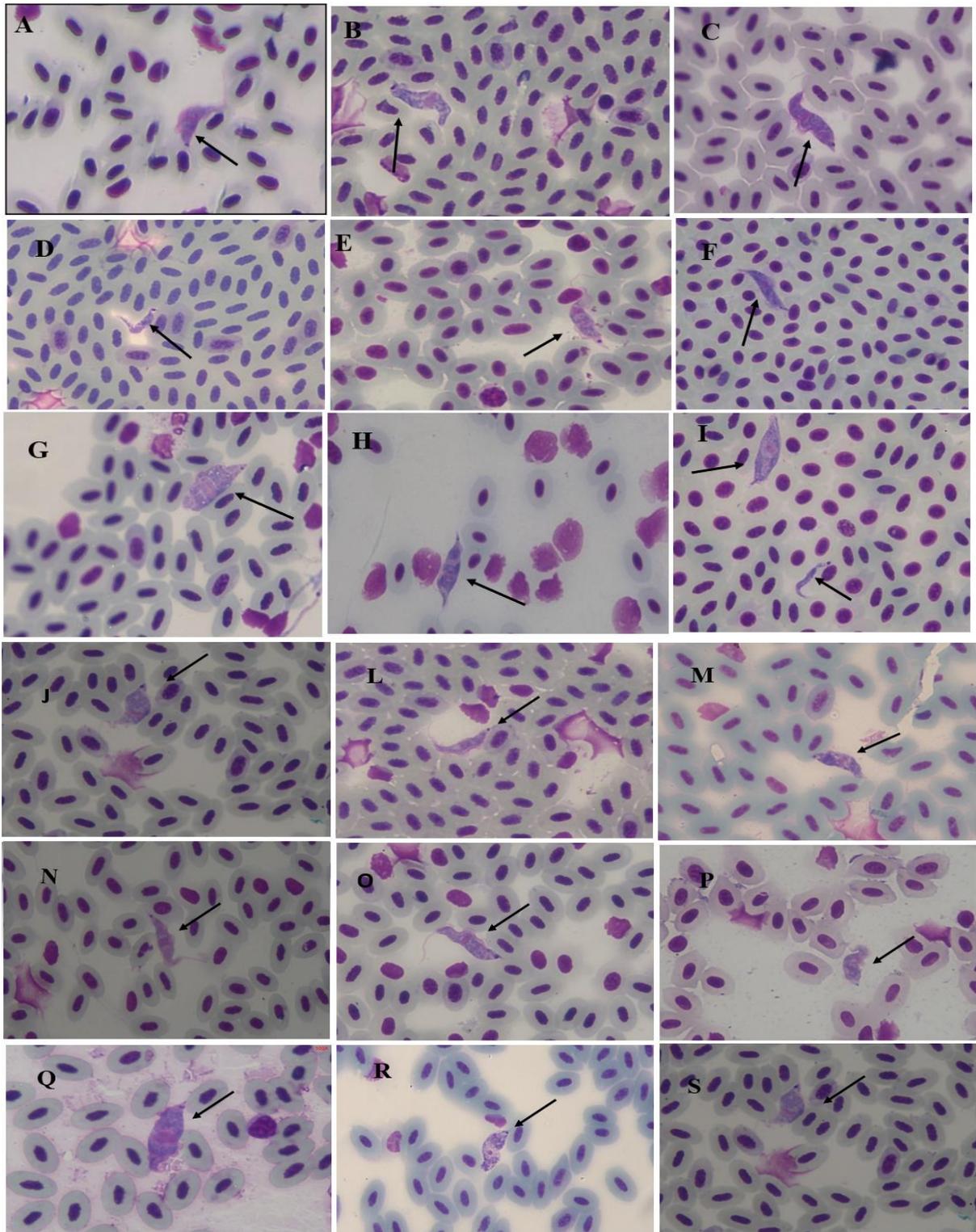


Figura 2. Esfregaços sanguíneos corados com Giemsa na magnitude de 1000x onde são visualizadas formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. em espécies de aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia (PNI). A) ITA135 - *Tachyphonus coronatus*; B) ITA139; C) ITA220; D) ITA240 - *Schiffornis virescens*; E) ITA142 - *Dysithamnus mentalis*; F) ITA167 - *Conopophaga melanops*; G) ITA218 - *Lochmias nematura*; H) ITA166; I) 166 - *Conopophaga melanops*; J) ITA145, L) ITA23; M) ITA238 - *Platyrinchus mystaceus*; N) ITA184; O) ITA229 - *Synallaxis ruficapilla*; P) ITA204 - *Mionectes rufiventris*; Q) ITA212 - *Penelope obscura*; R) ITA228; S) ITA236 - *Rhopias gularis*; T) ITA218.

4.3 Análise de prevalência de aves infectadas em relação a gradiente de altitude

A partir do gradiente de altitude analisado nota-se a influência diretamente na infecção por parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves silvestres no PNI. A predominância observada de aves silvestres naturalmente infectados por *Trypanosoma* sp. em relação a altitudes abaixo de 1000m foi de 27,9% (n = 31/111) no teste de nPCR, no entanto, em altitudes acima de 2000m a frequência de *Trypanosoma* sp. foi de 9,2% (n = 11/119) ($p < 0,005$). A probabilidade de encontrar uma ave infectada por parasitos do gênero *Trypanosoma* é cerca de 3 vezes maior em altitude inferior a 1000m, quando comparado a altitude superior a 2000m (RP=3,02; IC: 1,60 – 5,71; $p = 0,0002$).

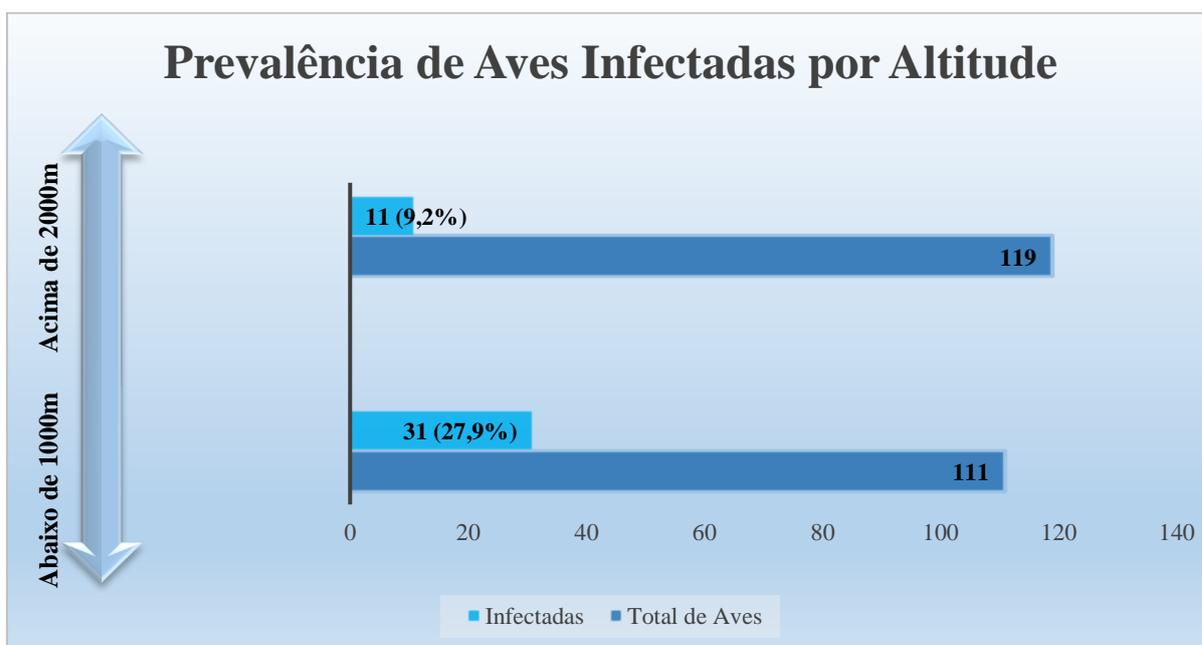


Figura 3. Frequência de infecção por *Trypanosoma* sp. em aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia, Rio de Janeiro, nas altitudes abaixo de 1.000 e acima de 2.000 metros.

Com relação a diversidade de espécies de aves silvestres positivas em PCR para *Trypanosoma* com o gradiente altitudinal observou-se que Abaixo de 1000metros foram capturadas 17 espécies e acima de 2.000 metros 11 espécies.

4.4 Prevalência de aves infectadas por *Trypanosoma* sp. por família

Os dados das amostras de aves foram agrupados em família para o cálculo de prevalência devido à baixa amostragem de algumas espécies (Tabela 2). A frequência de *Trypanosoma* sp. obtido na análise molecular para cada família de aves capturadas variou de 6,6 até 66,6%.

Tabela 3. Quantidade de aves silvestres amostradas no Parque Nacional de Itatiaia categorizadas por família e a frequência de *Trypanosoma* sp. obtida através da técnica de nPCR.

ORDEM PASSERIFORMES POR FAMÍLIA			
FAMÍLIA	N° de aves	Positivos em PCR	Frequência (%)
CONOPOPHAGIDAE	5	2	40
FRINGILLIDAE	13	4	30,7
FURNARIIDAE	20	4	20
PASSERELLIDAE	15	1	6,6
PIPRIDAE	19	6	31,5
PLATYRINCHIDAE	7	3	43
RHYNCHOCYCLIDAE	15	2	13,3
THAMNOPHILIDAE	16	2	12,5
THRAUPIDAE	48	5	10,4
TITYRIDAE	6	4	66,6
TROGLODYTIDAE	3	1	33
TURDIDAE	5	1	14,3
TYRANNIDAE	16	4	25

4.5 Análise do sequenciamento e filogenia

As 18 sequências do 18S rRNA de *Trypanosoma* sp. obtido de aves silvestres no presente estudo apresentou um percentual de identidade entre e 97,8-100%, já a distância evolutiva variou entre 0,00 – 0,02. A linhagem ITA212- *Penélope obscura* foi a que demonstrou maior distância evolutiva (0,02) em relação a outras sequências, e um percentual de identidade de 97,89%. As sequências ITA135 e ITA130, ITA238 e ITA142, ITA228 e ITA236 foram 100% idênticas entre si. Dessa forma, o presente estudo acrescenta a base de dados 15 novas linhagens genéticas de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres no Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
ITA229	1	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA205	2	99,70	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA167	3	98,95	98,95	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA130	4	99,40	99,25	99,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA139	5	99,85	99,70	98,95	99,55	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA226	6	99,70	99,55	98,80	99,40	99,85	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA240	7	99,10	99,10	98,95	99,55	99,10	98,95	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02
ITA142	8	99,40	99,10	98,95	99,70	99,25	99,10	99,40	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02
ITA238	9	99,40	99,10	98,95	99,70	99,25	99,10	99,40	100,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02
ITA135	10	98,95	98,95	100,00	99,10	98,95	98,80	98,95	98,95	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
ITA166	11	98,80	98,80	98,65	99,25	98,80	98,65	99,10	99,10	98,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA236	12	99,25	99,25	99,10	99,70	99,25	99,10	99,55	99,55	99,55	99,10	99,25	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA228	13	99,25	99,25	99,10	99,70	99,25	99,10	99,55	99,55	99,55	99,10	99,25	100,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA204	14	99,10	99,10	98,95	99,55	99,10	98,94	99,40	99,40	98,95	99,10	99,85	99,85	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA184	15	99,10	99,10	98,95	99,55	99,10	98,94	99,40	99,40	98,95	99,10	99,85	99,85	99,85	0,00	0,01	0,01	0,01
ITA145	16	98,34	98,19	98,04	98,94	98,49	98,34	98,49	98,64	98,64	98,04	98,50	98,64	98,64	98,64	98,79	0,00	0,01
ITA218	17	98,04	98,04	97,89	98,49	98,04	97,89	98,34	98,34	98,34	97,89	98,35	98,79	98,79	98,79	98,94	99,55	0,02
ITA212	18	98,04	98,04	97,89	98,49	98,04	97,89	98,34	98,34	98,34	97,89	98,35	98,49	98,49	98,49	98,64	98,49	98,34

Figura 4. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 660 pares de base de 18 sequências 18S rDNA de *Trypanosoma* sp. obtidas a partir de amostras de sangue de aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia, RJ. As análises foram realizadas no software CLC Main Workbench v.7.9. A sequência ITA229 foi utilizada como referência.

A reconstrução filogenética apontou que 14 linhagens formaram um grupo constituído por pequenos tripanossomas e agruparam-se junto a espécime *Trypanosoma Polygranularis* descrito por Valkiunas et al. (2011) na África. A sequência ITA212- obtida de *Penelope obscura* agrupou-se com a sequência MT276438.1 de *Trypanosoma everetti*-like, observado em *Dumetella carolinensis* descrito por Galen et al. (2020) na América do Norte

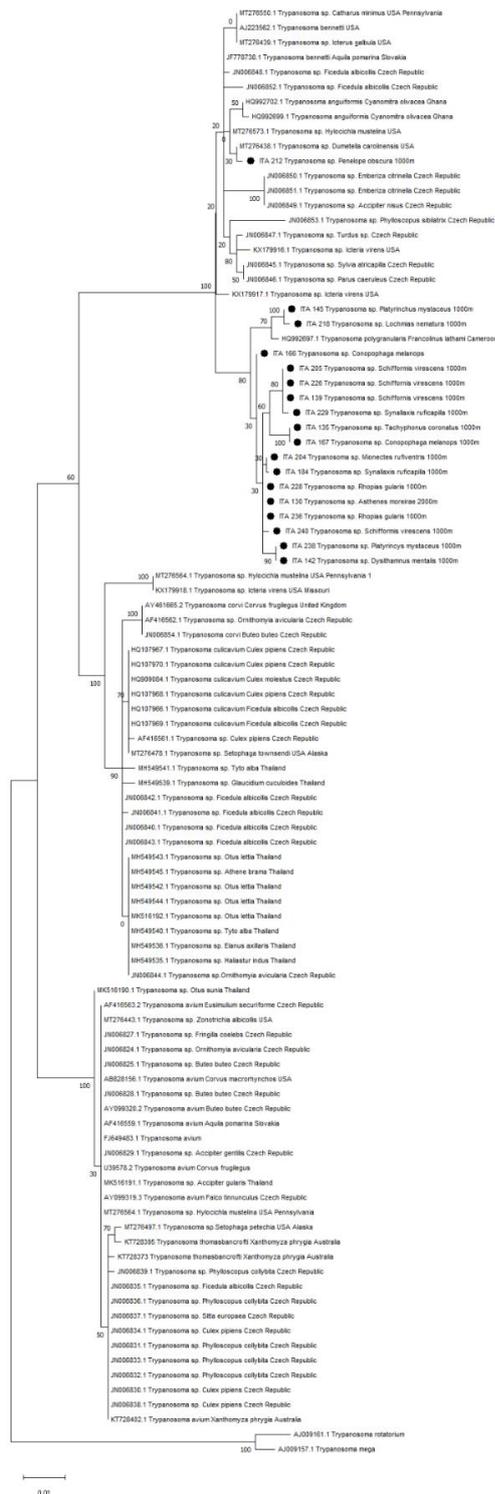


Figura 5. Reconstrução filogenética baseada em um fragmento de 660 pares de base da sequência 18S rDNA de espécies do gênero *Trypanosoma*. O método de reconstrução filogenética foi o Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros + G + I. O método de Bootstrap com 1000 réplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Trypanosoma rotatorium* (AJ009161) e *Trypanosoma mega* (AJ009157) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software MEGA X. Barra representa 1 substituição por posições de 100 nucleotídeos.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro no Brasil ao correlacionar a frequência de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres nos diferentes gradientes de altitude de áreas altimontanas da Mata Atlântica, PNI. Utilizando a técnica de nPCR e o método Sanger de sequenciamento foi possível identificar 15 novas linhagens de *Trypanosoma* sp. baseadas na sequência 18S rRNA obtidas a partir de espécies de aves silvestres até o presente momento inéditas, para esse bioma.

A taxonomia do grupo dos tripanossomas evoluiu de forma lenta e complicada, apesar dos estudos sobre tripanossomas aviários datarem de mais de 100 anos. No Brasil, os estudos sobre o gênero *Trypanosoma* foram baseados no relato da presença desses hematozoários por meio de análises microscópicas de esfregaços sanguíneos (Cerqueira, 1906; Splendore, 1910; Pilmmer, 1914; BENNETT, 1970; Woodworth-Lynas et al., 1989; Ribeiro et al., 2005; Sebaio et al., 2012). Alguns autores questionam a validade das análises morfológicas de esfregaços sanguíneos em lâminas devido à baixa parasitemia observada, não oferecendo um número amostral de parasitos cientificamente satisfatório para identificação de espécimes de tripanossomas (APANIUS, 1991; ATKINSON et al., 2008; SVOBODOVÁ et al., 1998; VOTÝPKA et al., 1998).

Segundo Duarte (2020) devido aos poucos estudos focados no estudo da diversidade molecular de *Trypanosoma* sp. no Brasil, são necessários mais estudos antes de relacionar as novas linhagens a espécies já reconhecidas ou a novas espécies. Isso ocorre porque a maioria das descrições originais de espécies não foi bem ilustrada e foi publicada em revistas não específicas (APANIUS, 1991; VALKIUNAS et al., 2011), o que torna a maioria das descrições originais pouco acessíveis para comparação morfológica. A carência nos estudos moleculares aliado a baixa parasitemia em esfregaços sanguíneos e a escassez de sequências genéticas de tripanossomas aviários em bancos de dados públicos refletem a necessidade de realização de trabalhos como o do presente trabalho.

As técnicas de biologia molecular possuem alta sensibilidade e especificidade, tornando-se indispensáveis para diagnóstico de *Trypanosoma* sp. A maioria dos trabalhos publicados nas últimas décadas utilizaram a PCR como método de detecção de *Trypanosoma* sp. e outros hemoparasitos, mesmo em baixa concentração de DNA na amostra é possível um diagnóstico positivo (GALEN et al., 2020; PORNPANOM et al., 2019; ZAMORA et al., 2012; ZÍDKOVÁ et al., 2012; SEHGAL et al., 2006; VALKIUNAS et al., 2006). A adição das técnicas de biologia molecular aos estudos morfológicos são as ferramentas utilizadas

atualmente, para estudos taxonômicos integrativos com resultados fortemente apoiados para a classificação de *Trypanosoma* sp.

Estudos moleculares realizados por autores têm procurado demonstrar a diversidade de tripanossomas aviários pelo mundo. Sehgal et al. (2006) estudaram a espécie *Trypanosoma gallinarum* identificada por morfologia e com sequências genéticas caracterizadas e disponíveis em bancos de dados. Votpyka et al. (2011) realizaram a descoberta de *Trypanosoma culicavium*, espécie encontrada em hospedeiros dípteros (mosquitos) na República Tcheca. Valkiunas et al. (2011) identificaram *Trypanosoma anguifomis* e *Trypanosoma poligranularis* na África, essas espécies posicionaram em um novo clado, diferente de *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma corvi* (PORNANOM et al., 2019; VOTYPKA et al., 2004).

No Brasil, Duarte (2020), utilizando a biologia molecular identificou 7 novas sequências de *Trypanosoma* sp. (dados ainda não publicadas no GenBank) em aves silvestres no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG). Em seus estudos foram detectadas infecções por *Trypanosoma* sp. em espécies passeriformes *Tachyphonus coronatus*, *Turdus rufiventris* e *Turdus flavipes*. Em nosso estudo obtivemos uma maior variedade de espécie de aves infectadas (Tabelas 1 e 2) e 15 novas sequências genéticas obtidas em aves silvestres no PNI. Estes dados corroboram com a discussão sobre a diversidade e a baixa especificidade parasitária de *Trypanosoma* sp. em relação ao hospedeiro aviário. Somando estes resultados haverá uma contribuição significativa nos estudos científicos de *Trypanosoma* sp. em aves silvestres em todo Brasil, haja visto a extensão territorial brasileira e a abundância de biomas pouco explorados, a diversidade destes parasitas certamente é subestimada no Brasil (GALEN et al., 2020; DUARTE, 2020). É provável que exista um número considerável de parasitos importantes ainda não descobertos.

Fatores ambientais como a temperatura altitude, clima e disponibilidade de vetores podem favorecer a prevalência da infecção em aves por tripanossoma. Segundo Maslov et al. (2012) nos ambientes naturais a prevalência de infecção por hematozoários nas aves está intimamente relacionada a diversidade de vetores competentes para transmissão de tais patógenos. Porém pouco se sabe sobre a relação parasita-vetor-hospedeiro no bioma da Mata Atlântica. Zídková et al. (2012), Votypka et al. (2004) e Svobodová et al. (2017) realizaram estudos na República Tcheca utilizando amostras de *Trypanosoma* sp. encontradas em aves, mosquitos culicídeos, simulídeos, ceratopogonídeos e moscas hipoboscídeas para experimentos em culturas e infecções experimentais. Dessa forma comprovaram a eficiência desses dípteros na transmissão de *Trypanosoma* sp.

Estudos de Zamora et al. (2012) em região de floresta tropical na Austrália comprovaram que as baixas temperaturas em gradientes mais elevados podem ajudar a reduzir o desenvolvimento de hematozoários aviários e a abundância de vetores, na medida em que a não ingestão pelas aves de possíveis vetores resulta em uma menor prevalência de parasitas. Por outro lado, as áreas baixas têm temperaturas altas, o que favorece o desenvolvimento e a transmissão de hematozoários. O aumento da temperatura provavelmente resultará em um aumento na prevalência de parasitas nas aves e pode forçar mudanças na distribuição das aves para maiores altitudes propagando a infecção em outros locais (Zamora et al., 2012). Em nosso estudo, não foi possível realizar a correlação em relação aos fatores climáticos com a frequência de *Trypanosoma* sp., o que aponta para a necessidade de mais pesquisas relacionadas a biogeografia, sazonalidade e a índices pluviométricos para determinação de seus impactos sobre a frequência da infecção por *Trypanosoma* sp. e sobre a abundância de vetores e suas tendências de distribuição ao longo do gradiente de elevação do PNI.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com o estudo de Zamora et al. (2012). Neste estudo avaliou-se a prevalência da infecção por *Trypanosoma* sp. por meio de análises citológicas e moleculares em aves no PNI, os dados obtidos demonstram que aves em menores altitudes tem maior probabilidade adquirir infecção por *Trypanosoma* sp. No gradiente de altitude abaixo de 1000m a frequência da infecção foi de 27,9% (n = 31/111). Todas as espécies de aves infectadas apresentam hábitos alimentares insetívoros (RIDGELY et al., 2015) o que pode explicar a maior taxa de infecção devido a maior abundância de vetores dípteros nestes locais. Em contraponto, na altitude de 2.000m a frequência de *Trypanosoma* sp. foi de 9,2 % (n = 11/119).

Para o sequenciamento genético foram utilizadas as amostras que apresentaram melhor qualidade na banda de amplificação no gel de eletroforese. Das 42 amostras positivas em PCR 26 foram para sequenciamento; 18 obtiveram cromatograma com alta qualidade no sequenciamento. Das 18 sequências, 17 pertenciam as aves capturadas abaixo de 1.000m e apenas uma amostra pertencia a aves capturadas altitude acima de 2.000 metros. Apenas uma amostra, ITA 233, positiva em esfregaço sanguíneo não obteve um cromatograma de boa qualidade com excessivos picos duplos, provavelmente devido a infecções múltiplas. Outras 7 amostras não apresentaram um sequenciamento de alta qualidade devido à baixa intensidade de amplificação, o que gerou picos baixos e sequências curtas.

Em um dos esfregaços sanguíneos (Figura 2: H) ITA166) foi possível observar em microscópio imagens com formas tripomastigotas com caracteres morfológicos distintos,

levando a hipótese de pleomorfismo inerente a espécie ou coinfeção. Porém, na análise filogenética desta amostra obtivemos a sequência de um parasita. De acordo SEHGAL et al. (2011), TASÇI et al. (2018), PORNPANON et al. (2019) e BERNOTIENÉ et al. (2020) os tripanosomas são generalistas, infectando uma variedade de espécies de aves sendo transmitidos através de espécies diferentes de vetores Hipoboscidae, Simuliidae, Culicidae, Ceratopogonidae (Diptera) e Dermanyssidae (Arachnida). Estudos de Votypka et al. (2004) demonstraram que *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma corvi* podem parasitar o mesmo hospedeiro de aviário, sendo transmitidos ao mesmo tempo por diferentes espécies de ceratopogonídeos.

As análises das 18 sequências obtidas no presente estudo somadas as de Duarte (2020) indicaram uma baixa diversidade de espécies de *Trypanosoma* entre as aves silvestres. A partir destes dados pode-se deduzir que esta diversidade pode ser atribuída a biogeografia de Mata Atlântica.

Duarte (2020) relatou que a mesma linhagem de tripanossoma pode estar infectando aves de diferentes espécies, logo parasitos podem ser distribuídos pelos movimentos migratórios das aves, a ação humana pode introduzir os parasitos através de aves infectadas ou vetores inseridos no meio, ou pode ocorrer o episódio de especiação do parasita. Nossos resultados demonstram a proximidade de sequências de *Trypanosoma* sp. que foi obtida neste estudo com sequências da América do Norte (*T. everetti-like*) descrita por Galen et al. (2020) e a proximidade em relação a tripanossomas da África (*T. polygranularis*) descrito por Valkiunas et al. (2011). Esses fatos indicam a distribuição global desse hematozoário. Dessa forma, há uma necessidade de mais estudos focados em tripanossomas em aves silvestres no Brasil para que possamos compreender a sua biologia, distribuição e relação parasita-vetor-hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

A altitude no Parque Nacional de Itatiaia é um importante fator ambiental que afeta a frequência de infecções naturais por *Trypanosoma* sp. em aves silvestres. No presente estudo a probabilidade de capturar uma ave infectada em gradiente de altitude inferior a 1000 metros é três vezes maior quando comparado a aves capturas em altitudes superiores a 2000 metros.

Existe uma baixa diversidade genética entre as linhagens de *Trypanosoma* em aves silvestres no Parque Nacional de Itatiaia, onde 17 das 18 sequências obtidas neste estudo estão filogeneticamente relacionadas a *Trypanosoma polygranularis*.

As linhagens de *Trypanosoma* sp. obtidas neste estudo possui baixa especificidade parasitária sendo identificadas em 12 espécies de aves.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, O. E. **Spliced Leader (SL) RNA: análises de genes e regiões intergênicas com aportes na filogenia, taxonomia e genotipagem de Trypanosoma spp. de todas as classes de vertebrados.** 2017. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.42.2018.tde-15022018-161025. Acesso em: 2023-07-17.
- APANIUS V. Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. **Parasitology today**, v.7, p. 87-90, 1991.
- ARGILLA, L. S. **Master of Veterinary Science in Wildlife Health.** Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2015
- ARRIERO, E.; PÉREZ-TRIS, J.; RAMÍREZ, A.; REMACHA, C. Trade-off between tolerance and resistance to infections: an experimental approach with malaria parasites in a passerine bird. **Oecologia**, v.188, p. 1001-1010, 2018. DOI:10.1007/s00442-018-4290-4
- ATKINSON, C.T; THOMAS, N.; CAÇADOR, B. **Parasitic Disease of Wild Birds.** John Wiley & Sons: Ames, IA, EUA, 2008.1
- BAKER, J. R. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885, II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. **Parasitology** 46, 321–334, 1956
- BAKER, J. R. Studies on *Trypanosoma avium*. IV. The development of infective metacyclic trypanosomes in cultures grown in vitro. **Parasitology** 56, 15–19, 1966.
- BAKER, J. R. (1976). Biology of the trypanosomes of birds. **In Biology of the Kinetoplastidae**, v. 1, pp. 131–174. Edited by W. H. Lumsden & D. A. Evans. London: Academic Press, 1976.
- BENNETT, G. F. Development of trypanosomes of the *T. avium* complex in the invertebrate host. **Canadian Journal of Zoology**, v.48, p. 945–957,1970.
- Bennet, G., Lopes, O.S. Blood parasites of some birds from São Paulo State, Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. v.75, p.117–134,1980.
- BENNETT, G. F., *et. al.* Trypanosomes of some Fennoscandian birds. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, pp. 531–537,1994 .doi.org/10.1590/S0074-02761994000400007
- BERNOTIENĖ, R.; IEZHOVA, TA; BUKAUSKAITĖ, D.; CHAGAS, CRF; KAZAK, M.; VALKIŪNAS, G. Development of *Trypanosoma everetti* in *Culicoides* biting midges, **Acta Tropica**, v. 210,2020.
- CERNÝ O, VOTÝPKA J, SVOBODOVÁ M. Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. **Medical and Veterinary Entomology** v.25, pp.104-8. 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00875.x. PMID: 20497315.

CBRO - COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Lista das aves do Brasil**. 11ª Edição. 2015. Acesso em: 9/07/2023.

CERQUEIRA, A. D. C. **Contribuição ao estudo dos Trypanosomas das aves**. These. Rio. L.Malafaia Jr. 1906.

CHAGAS CRF et al. Lankesterella (Apicomplexa, Lankesterellidae) Blood Parasites of Passeriform Birds: Prevalence, Molecular and Morphological Characterization, with Notes on Sporozoite Persistence In Vivo and Development In Vitro. **Animals**. v.11, n.5, p.1451, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11051451>

DIAS, R. M. D. S.; CHIEFFI, P. P.; TOLEZANO, J. E. & LUPETTI, N. -Hemoparasitas de aves capturadas em duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n.44, v.1, p. 41-46, 1984.

DUARTE, R. G. **Caracterização molecular de novas linhagens de Trypanosoma em aves no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG), Brasil** 2020 62p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

SPLENDORE, A. Trypanosoma di ucelletti e di pesei brasiliani. **Revista Sociedade**. Scient S. Paulo, 5: 6-13, 1910.

FECCHIO, A; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Low prevalence of blood parasites in Cerrado birds, Central Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v.2, p.127-135, 2007.

FERREIRA-JÚNIOR, F. C. **Prevalência, riqueza e sazonalidade de hemosporídeos aviários em diferentes estágios de sucessão ecológica no Parque Estadual da Mata Seca, Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2016.

FUFA I. G. et al. Prevalence of Trypanosome and Microfilaria Parasites in Slaughtered Chicken in Jalingo Chicken Market, **Taraba state North East Nigeria** AJVS. v.59, n.2, p.148-153, 2018.

FULLER, MARK R., WILLIAM S. SEEGAR, AND LINDA S. SCHUECK Routes and Travel Rates of Migrating Peregrine Falcons Falco Peregrinus and Swainson's Hawks Buteo Swainsoni in the Western Hemisphere. **Journal of Avian Biology** v.29, n.4, p. 433-40,1998. Accessed July 9, 2023. doi:10.2307/3677162.

GALEN SC, BORNER J, PERKINS SL, WECKSTEIN JD. Phylogenomics from transcriptomic “bycatch” clarify the origins and diversity of avian trypanosomes in North America. **PLoS ONE**. 2020;15:e0240062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240062>

GODFREY, R. D.; FEDYNICH, A. M. & PENCE, D. B. Quantification of hematozoa in blood smears. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 558–565, 1987.

Guia de Aves Mata Atlântica paulista – Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba /
Coordenação Geral: Luciana Lopes Simões WWF Brasil, São Paulo, 1ª edição, 2010

GUIMARAES, A., *et. al.* Molecular detection and phylogenetic analysis of *Trypanosoma* spp. in Neotropical primates from Rio de Janeiro State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**. v. 42, p. e07059-e07059, 2022.

HAMILTON PB, GIBSON WC, STEVENS JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.44, n.1, p.15-25, 2007.

HERNÁNDEZ, R. *et al.* Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 41, p.207-212, 1990.

LAINSON, R., Shaw, J. J. & Humphrey, P. S. Preliminary survey of the blood parasites of birds of the ecological research areas of Guamá, Belém, Pará, Brasil. **Journal of Parasitology**, v.56, p.197-198, 1970.

LÓPEZ-VÉLEZ, R., MORENO, R. M. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. Revista. Esp. **Salud Pública** v.79, pp. 177-190. 2005.

ICMBio. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Itatiaia**. 2013. Disponível em:http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/pm_parna_itatiaia_enc3.pdf. Acesso em: maio 2023.

LIMA, V. S.; JANSEN, A. M.; MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. *Parasit Vectors*. 2014;7(1):263

LOGIUDICE, K. R. S.; OSTFELD, K. A.; SCHMIDT, F. K. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 567-571, 2003.

LUKEŠ, J.; SKALICKÝ, T.; TÝČ, J., VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V. Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2., p. 115-22, 2014.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; ORTIZ, P. A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAO-DIAS, J. L.; SHAW, J. J.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *lewisii* from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol*. 2010;10(4):522-9.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.02.005>

MASLOV, D. A.; OPPERDOES, F. R.; KOSTYGOV, A. Y.; HASHIMI, H.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, v.146, n.1, p.1–27, 2018
<https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>

MASLOV, D. A.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol Biochem Parasitol**, v. 75, n. 2, p. 197-205, 1996.

MELCHIOR, L. A. K. et al. **Atualidades em medicina tropical na América do Sul: veterinária**. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021.

MERINO, S.; MORENO, J.; SANZ, J. J.; ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). **Proc Biol Sci**. v. 267, n. 1461, p. 2507-10, 2000. DOI: 10.1098/rspb.2000.1312. PMID: 11197126; PMCID: PMC1690848.

MOENS, M. A. J. & PÉREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 1, p. 41-49, 2016.

NANTES, W. et al. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **IJP: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 16-20, 2019. DOI 10.1016/j.ijppaw.2019.03.015

NJABO K.Y, CORNEL A.J, SEHGAL R.N, *et al.* Coquillettiidae(Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. **Malaria Journal**. v. 8, p. 193, 2009.

OLSSON-PONS, S.; CLARK, N.J.; ISHTIAQ, F.; CLEGG, S.M. Differences in host species relationships and biogeographic influences produce contrasting patterns of prevalence, community composition and genetic structure in two genera of avian malaria parasites in southern Melanesia. **The Journal of Animal Ecology**, v. 84, n. 4, p. 985-998, 2015.

OROZCO, M. M. Hemoparasites in birds of the order Passeriformes in cold climate, under captivity conditions. **Uniandes**. 2004. [Accessed: 25 October 2023]

ORTIZ S, SOLARI A. Trypanosome parasites and its diverse hosts: A Review. **International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)**, Vol-2, Issue-11, 2016.

PERKINS, S. L. & SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Parasitology journal**. 2002,88:972–8.

PIACENTINI, V. Q *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. **Brazilian Journal of Ornithology**, v. 23, n. 2, p. 90-298, 2015.

PLIMMER H. G. Report on the deaths which occurred in the Zoological Gardens during 1913, together with a list of the bloodparasites found during the year. **Proceedings of the Zoological Society**, p.181-190, 1914.

PIVETTA, M. Asas da mata atlântica. **Pesquisa FAPESP**, Pinheiros – SP, v. 217, p. 36-41, 2014.

PORNPANOM P, *et al.* Morphological and molecular characterization of avian trypanosomes in raptors from Thailand. **Parasitology Research**, 118:2419–2429, 2019.

RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A. & CONSTATINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Editora Holos, Ribeirão Preto, SP. 810p, 2012.

RAMÍREZ-IGLESIAS, J. R.; ELEIZALDE, M. C.; REYNA-BELLO, A.; MENDOZA, M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J Parasit. Dis.* v. 41, n. 2, p. 450-458. 2017

RENTAS - **Rede Nacional de combate ao tráfico de animais silvestres. Relatório nacional sobre gestão e uso sustentável da fauna silvestre**. 2017. Disponível em <<http://www.rentas.org.br/trafico-de-animais/>> Acesso em 09 de julho de 2023>

REY, L. **Parasitologia**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856p.

RIBEIRO, S. F. *et al.* Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261–267, 2005.

RIDGELY *et al.* **Guia Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste / Brazil Birds Guide Atlantic Forest South-East**, São Paulo; Horizonte Geográfico; 2015. 424 p.

RODRIGUES A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**. 2006;132(Pt 2):215-24

ROSS, D. H. & R. W. Merritt. **Factors affecting larval black fly distributions and population dynamics**. In: k. C. Kim & r. W. Merritt, R. W. Black flies: Ecology, population management and annotated world list. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA. p. 90-108, 1987.

SANTOLIKOVA, A.; BRZONOVA, J.; CEPICKA, I.; SVOBODOVA, M. Avian louse flies and their trypanosomes: new vectors, new lineages and host-parasite associations. **Microorganisms**, v. 10, n. 584-90, 2002. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030584>.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO JUNIOR, R. P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.6, p.895-903, 2008.

SCHOENER, E.; UEBLEIS, S. S.; CUK, C.; NAWRATIL, M., OBWALLER, A. G., ZECHMEISTER, T. *et al.* (2018) Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. **PLoS ONE**, V.13(4), 2018. e0196052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196052>

ŠLAPETA J, MORIN-ADELIN V, THOMPSON P, *et al.* Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*. 2016;143(8):1012-1025. doi:10.1017/S0031182016000329

SEBAIO, F. et al. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 7–15, 2012.

SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I. & SMITH, T. B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v.10, p.2319–2327, 2001.

SEHGAL, R. N. M. Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** v. 4, p. 421-430, 2015.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

ŠLAPETA, J.; MORIN-ADELINÉ, V.; THOMPSON, P., MCDONELL, D.; SHIELS, M.; GILCHRIST, K; VOTÝPKA, J.; VOGELNEST, L. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic regent honeyeater (*Anthochaera phrygia*). **Parasitology**, v.143,1012-025,2016.

SOUTO-PADRÓN, S. The surface charge of Trypanosomatids. An. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v.74, n.4, p.649-675, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000400007>

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; DOVER, G. A.; GIBSON, W. C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. Pt 118, pp. 107- 16 ,1999b. DOI: 10.1017/s0031182098003473.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*, v.48, pp1-56, 2001. doi:10.1016/s0065-308x (01)48003-1

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**. 2008 Sep;15(3):226-32. doi: 10.1051/parasite/2008153226. PMID: 18814685.

SVOBODOVA, M.; ZI'DKOVA', L.; ČEPIC~, K. A. I.; OBORNÍK, M.; LUKES~, J. & VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.423–432, 2007.

SVOBODOVAÂ, M., DOLNIK, O. V., ČEPIČKA, I.; RAÂDROVAÂ, J. Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. **Parasites & Vectors**, v.10, n.1, p.224. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2158-9> PMID:28482865.

TANIFUJI, G.; CENCI, U.; MOOG, D. et al. Genome sequencing reveals metabolic and cellular interdependence in an amoeba-kinetoplastid symbiosis. **Scientific Reports**, v.7, 11688 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11866-x>

TANIGAWA M, SATO Y, EJIRI H, IMURA T, CHIBA R, YAMAMOTO H, et al. Molecular identification of avian haemosporidia in wild birds and mosquitoes on Tsushima Island, Japan.

Journal Veterinary Medicine and Science, v.75, p.319–26, 2013;75:319–26. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0359>.

TAŞCI G.T, et al. Prevalence and molecular characterization of *Trypanosoma* spp. in domestic geese (*Anser anser domesticus*) from the North-East Anatolia Region of Turkey. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v.24, n.4, 539- 543, 2018. Doi: 10.9775/kvfd.2018.19488.

VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., BROOKS, D. R., HANELT, B., BRANT, S. V, SUTHERLIN, M. E., CAUSEY, D. Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, v.40, n.3, p.555–561,2004, <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.555>

VALKIŪNAS G.; IEZHOVA T. A.; KRIZANAUSKIENE A, PALINAUSKAS V, SEHGAL RN, BENSCH S. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites.**Journal of Parasitology**, v.94,n.6,p1395-4012008doi: 10.1645/GE-1570.1. PMID: 18576856.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA T.A; CARLSON J.S; et al. Two new *Trypanosoma* species from Africa birds, with notes on the taxonomy of avian trypanosomes. **Journal of Parasitology**. v.97, p. 924-930,2011.

VALKIŪNAS G, IEZHOVA TA, SEHGAL RNM. Deforestation does not affect the prevalence of a common trypanosome in African birds. **Acta Tropical**. 2016 Oct; 162:222-228. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.07.003. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27421797.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds - **Ecological monographs**, 1986.

VELLEND, M. Conceptual synthesis in community ecology. **The Quarterly Review of Biology**, v..85, n.2, pp.183-206, 2010.doi: 10.1086/652373. PMID: 20565040.

VARGAS, P. A. O. Cysteine protease genes of mammalian *Trypanosoma* spp.: Polymorphism and phylogenetic relationships. Doctoral Dissertation .**University of São Paulo**.2014

VILLAR, C.M.; BRYAN, A.L.; LANCE, S.L.; BRAGA, E.M.; CONGRAINS, C.; DEL LAMA, S.N. Blood parasites in nestlings of wood stork populations from three regions of the american continent. **The Journal of Parasitology**, v. 99, n.3, p. 522-527, 2013.

VIOLA LB, CAMPANER M, TAKATA CS, FERREIRA RC, RODRIGUES AC, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis.**Parasitology**. V.135(5):595-605, 2008. doi:10.1017/S0031182008004253

VOTYPKA, J.; SVOBODOVA, M. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. **Parasitology Reserch**, v. 92, p.147–151,2004.

VOTÝPKA, J; SZABOVÁ, J.; RÁDROVÁ, J.; ZÍDKOVÁ, L.; SVOBODOVÁ, M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes."

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.62, n. 3, p.745-754, 2012.

VOTYPKA, J. et al. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description. **Trends Parasitology**, v.31, n.10, p.460-469, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015> PMID: 26433249.

ZAMORA-VILCHIS et al. “Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate.” **PloS one vol. v.7**, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0039208

ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; SZABOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, M. Biodiversity of avian trypanosomes. **Infection, Genetics and Evolution**, p.102-120, 2012. Doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.022.

WIKIAVES. WikiAves - **A Enciclopédia das Aves do Brasil, 2023. Disponível em:**https://www.wikiaves.com.br/wiki/areas:pn_itatiaia:inicio. Acesso em: 22 jul. 2023.

WILL, K. R.; PETER, H. A.; RÄTTI, O. MALMQVIST, B.; STRASEVICIUS, D. Molecular Detection of Trypanosoma (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Black Flies (Diptera: Simuliidae). **Comparative Parasitology**, v.74, n.1, p.171-175, 2007.

WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNETT, G. F. Prevalence of avian Haematozoa in São Paulo state, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.515-526, 1989.

YURCHENKO, V.; HOBZA, R.; BENADA, O.; LUKES, J. Trypano-marrow of a raven, *Corvus frugilegus* (1979, Prague, Czech Republic) soma avium: Large minicircles in the kinetoplast DNA. Experimental and a blackbird, *Turdus merula* (1977, Lindava, Czech Republic), **Parasitology**, v. 92, p. 215–218, 1999.

ANEXOS

Anexo A – Autorização para atividades com finalidade científica, gerada pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) autorizando a realização do trabalho de pesquisa, cumprindo as diretrizes éticas de uso animal.

Anexo A



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 68906-4	Data da Emissão: 16/02/2022 12:58:20	Data da Revalidação*: 01/11/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tatys Henrique Assumpção Jardim	CPF: 130.997.757-70
Título do Projeto: MALÁRIA AVIÁRIA NAS MONTANHAS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA: UM ESTUDO SOBRE A DIVERSIDADE DOS HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS EM AMBIENTES AINDA POUCO EXPLORADOS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material biológico	11/2019	03/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Huanisson Azevedo Santos	Pesquisador	983.833.295-04	Brasileira
2	NELSON MEIRELES DA SILVA	Colaborador	140.173.727-75	Brasileira
3	CRISTIANE DE MEDEIROS CAMPANHA	Colaboradora	076.323.067-73	Brasileira
4	CARLA ALVES RABELLO	Colaboradora	186.559.907-79	Brasileira

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

Código de autenticação: 0689060420220216

Página 1/7



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MALÁRIA AVIÁRIA NAS MONTANHAS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA: UM ESTUDO SOBRE A DIVERSIDADE DOS HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS EM AMBIENTES AINDA POUCO EXPLORADOS", protocolada sob o CEUA nº 4863180222 (ID 002308), sob a responsabilidade de **Huarrisson Azevedo Santos e equipe; Talys Henrique Assumpção Jardim; Nelson Meireles da Silva; Cristiane de Medeiros Campanha; Carla Alves Rabello** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 04/07/2022.

We certify that the proposal "AVIAN MALARIA IN THE MOUNTAINS OF THE BRAZILIAN ATLANTIC FOREST: A STUDY ON THE DIVERSITY OF AVIAN HEMOSPORIDS IN ENVIRONMENTS THAT HAVE BEEN LITTLE EXPLORED", utilizing 384 Birds (males and females), protocol number CEUA 4863180222 (ID 002308), under the responsibility of **Huarrisson Azevedo Santos and team; Talys Henrique Assumpção Jardim; Nelson Meireles da Silva; Cristiane de Medeiros Campanha; Carla Alves Rabello** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 07/04/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **07/2026**

Área: **Microbiologia E Imunologia Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 600 meses**

N: **384**

Linhagem: **Não se aplica**

Peso: **05 a 3000 g**

Local do experimento: As coletas ocorrerão em Unidades de Conservação Federais e Estaduais. São elas: Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Parque Nacional de Itatiaia, Parque Nacional do Caparaó, Parque Nacional da Bocaina, Parque Nacional das Semprevivas, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Estadual do Papagaio, Parque Estadual do Ibitipoca, Parque Estadual do Brigadeiro, Parque Estadual do Itacolomi e Parque Estadual da Serra Negra da Mantiqueira. A triagem e amostragem dos animais ocorrerá em Base de Pesquisa montada pela equipe.

Seropédica, 04 de julho de 2022

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro