

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES:
APLICABILIDADE DE ALGUMAS REGIÕES GÊNICAS
MITOCONDRIAIS NA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E
ANÁLISE FILOGENÉTICA**

ERICSON RAMOS DE MELLO

2023



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

**IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES
SILVESTRES: APLICABILIDADE DE ALGUMAS
REGIÕES GÊNICAS MITOCONDRIAS NA
DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E ANÁLISE
FILOGENÉTICA**

ERICSON RAMOS DE MELLO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Bruno Pereira Berto

e coorientação da Professora

Dra. Viviane Moreira de Lima

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Junho, 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)

M527i Mello, Ericson Ramos de, 1985-
IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES:
APLICABILIDADE DE ALGUMAS REGIÕES GÊNICAS
MITOCONDRIAS NA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E ANÁLISE
FILOGENÉTICA / Ericson Ramos de Mello. - Rio de
Janeiro, 2023.
235 f.: il.

Orientador: Bruno Pereira Berto.
Coorientador: Viviane Moreira de Lima.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2023.

1. coccídios. 2. biologia molecular. 3. Isospora.
4. PCR. 5. COI. I. Berto, Bruno Pereira , 1984-,
orient. II. Lima, Viviane Moreira de, 1974-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS. IV. Título.



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



ATA N° 1868/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.040481/2023-13

Seropédica-RJ, 26 de junho de 2023.

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

ERICSON RAMOS DE MELLO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em **Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 26/06/2023

(Assinado digitalmente em 27/06/2023 09:01)

BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: ###715##

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 18:18)

MICHELLE DANIELE DOS SANTOS CLAPP
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: ###088##

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 17:44)

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.237-##

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 16:07)

LUCIO ANDRÉ VIANA DIAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.651-##

(Assinado digitalmente em 27/06/2023 17:05)

SERGIAN VIANNA CARDOZO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.777-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1868**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **26/06/2023** e o código de verificação: **f697f1b0a8**

Dedico essa conquista a Deus, a minha filha Alice que é a luz da minha vida, meus pais e a minha companheira que me apoiaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde, oportunizado o conhecimento e por me sustentar.

A minha família que sempre esteve presente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Pereira Berto, pela oportunidade dada, por seus ensinamentos, pela paciência, orientação, disponibilidade e amizade no decorrer destes anos.

A Prof^a. Dr^a. Viviane Moreira de Lima por seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes pelo conhecimento compartilhado.

Ao secretário da pós-graduação em Ciências Veterinárias Arthur Santiago Junior pela atenção e disponibilidade durante todo período do curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Ildemar Ferreira do Laboratório de Ornitologia (LABOR), pela orientação no mestrado e por todo auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC) e Laboratório de Atividade Genotóxica de Plantas (LAGEP) que foram fundamentais para a concretização deste estudo.

Aos professores dos Programas de Pós-graduação em Biologia Animal e Ciências Veterinárias que ministraram as aulas e agregaram conhecimento.

Aos membros da banca.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A Pró-reitoria de Assuntos Estudantis (PROAES).

Ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS).

A todos que de alguma forma auxiliaram o estudo e não foram citados aqui.

A equipe do Parque Nacional do Itatiaia, principalmente aos coordenadores de pesquisa Dr. Léo Nascimento (anterior) e Marcelo Souza Motta (atual); o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Pinheiral; O Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais que nos permitiu acessar e usar algumas instalações durante as expedições.

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.

BIOGRAFIA

Ericson Ramos de Mello, filho de Ricardo Rosa de Mello e Marialva Ramos Rosa de Mello, nasceu em 18 de maio de 1985, no município do Rio de Janeiro, RJ. Concluiu o Ensino Médio no Colégio Fernando Costa, na cidade de Seropédica/RJ, no ano de 2002. Em agosto de 2003 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de graduação em Zootecnia onde foi bolsista da disciplina Forragicultura e Pastagens. Em março de 2006 ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), através do Consórcio CEDERJ, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Após obter o título de bacharel, em agosto de 2006 e o título de licenciado em agosto de 2010, lecionou as disciplinas de Ciências e Biologia em colégios particulares dos Municípios de Seropédica e Nova Iguaçu no Rio de Janeiro. Em 2011 prestou concurso e foi convocado para ser Zelador Patrimonial, no Município de Seropédica/RJ. No ano seguinte, prestou concurso para UFRRJ, sendo convocado somente no ano de 2014 para o cargo de Assistente em Administração. Em 2016 ingressou no Mestrado em Biologia Animal no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do Profº. Dr. Ildemar Ferreira. Foi professor voluntário da disciplina IB-151 Zoologia Geral no ano de 2019. Em sua trajetória profissional na Pró-reitoria de Assuntos Estudantis (PROAES), esteve como Diretor da Divisão de Gestão de Suprimentos da Assistência Estudantil (DIGSAES) até o ano de 2018. Em 2019 assumiu a Direção do Setor de Residência Estudantil (SERE). Em 2020 ingressou no curso de doutorado no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob orientação do professor Dr. Bruno Pereira Berto e coorientação da Professora Dra. Viviane Moreira de Lima. Durante o doutorado também teve a oportunidade de integrar o projeto de pesquisa taxonomia e ecologia de coccídios: identificação morfológica e molecular de espécies em aves silvestres da reserva biológica de Poço das antas, Rio de Janeiro e o projeto de Extensão Coleções Biológicas: Coleção Parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios. Em sua trajetória participou e publicou artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais. Atualmente é Coordenador do Setor de Restaurantes Universitários (SRU), Restaurante Universitário *campus* Seropédica e do projeto de Melhoria da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos fornecidos no Restaurante Universitário da UFRRJ, *campus* Seropédica (BIEXT 2022).

RESUMO

MELLO, Ericson Ramos de. **Identificação molecular de coccídios de aves silvestres: Aplicabilidade de algumas regiões gênicas mitocondriais na diferenciação de espécies e análise filogenética.** 2023. 235p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Os coccídios são protozoários intracelulares obrigatórios que infectam a maioria dos invertebrados, todas as classes dos vertebrados, incluindo os animais domésticos, silvestres e seres humanos. Apresentam ciclos de vida intestinais, embora sejam observados, em algumas espécies, estágios de vida extra-intestinais. São geralmente identificados a partir de amostras fecais. O Brasil apresenta uma diversa avifauna representada atualmente por 1.971 espécies de diferentes ordens, dentre as quais destacam-se os Passeriformes, ordem mais representativa que é frequentemente positiva para diferentes espécies de coccídios parasitas, principalmente dos gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875. O estudo das interações entre esses parasitos e hospedeiros nos permite entender diversos processos ecológicos, evolutivos e comportamentais, incluindo seleção sexual, sucesso reprodutivo, migração, competitividade, dentre outras. Atualmente, existem diversas técnicas e metodologias que podem ser aplicadas para identificação de uma espécie coccidiana além da análise morfológica, desde a confirmação da suscetibilidade do hospedeiro, determinação da densidade parasitária, grau de patogenicidade e identificação de diferenças inter e intra-específicas que fornecem ajustes taxonômicos relevantes. Finalmente, o advento da Biologia Molecular, prática reconhecida e estabelecida, principalmente no estudo de parasitas coccidianos dos animais de produção, oferece informações complementares as de microscopia e métodos imunológicos, por exemplo, pois o sequenciamento do DNA do microrganismo, serve como estudo adicional para a taxonomia e filogenia. Baseando-se nestes fatos, este trabalho, nos capítulos I, II, III e IV teve por objetivos, identificar geneticamente coccídios parasitas de aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro, demonstrando o isolamento de oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres, com posterior extração de DNA a fim de amplificar e sequenciar diferentes regiões gênicas dos genes *cox1*, *cox3* e fragmentos da subunidade pequena e grande do rDNA do DNA mitocondrial, avaliando a aplicabilidade destas novas sequências na diferenciação de espécies e estudos filogenéticos.

Palavras-chave: biologia molecular, coccídios, COI, 18S, *Isospora*.

ABSTRACT

MELLO, Ericson Ramos de. **Molecular identification of coccidia of wild birds: Applicability of some mitochondrial gene regions in species differentiation and phylogenetic analysis.** 2023. 235p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Coccidia are obligate intracellular protozoa that infect most invertebrates, all classes of vertebrates, including domestic, wild, and human animals. They have intestinal life cycles, although extra-intestinal life stages are observed in some species. They are usually identified from fecal samples. Brazil has a diverse avifauna currently represented by 1.971 species of different orders, among which the Passeriformes stand out, a more representative order that is often positive for different species of parasitic coccidia, mainly of the genera *Isospora* Schneider, 1881 and *Eimeria* Schneider, 1875. The study of the interactions between these parasites and hosts allows us to understand several ecological, evolutionary and behavioral processes, including sexual selection, reproductive success, migration, competitiveness, among others. Currently, there are several techniques and methodologies that can be applied to the identification of a coccidian species beyond morphological analysis, from the confirmation of host susceptibility, determination of parasite density, degree of pathogenicity and identification of inter- and intra-specific differences that provide relevant taxonomic adjustments. Finally, the advent of Molecular Biology, a recognized and established practice, especially in the study of coccidian parasites of production animals, offers complementary information to that of microscopy and immunological methods, for example, because the sequencing of the DNA of the microorganism, serves as an additional study for taxonomy and phylogeny. Based on these facts, this work, in chapters I, II, III and IV, aimed to identify genetically parasitic coccidia of wild birds captured in Atlantic Forest regions of Southeastern Brazil, demonstrating the isolation of coccidia oocysts from fecal samples of wild birds, with subsequent DNA extraction in order to amplify and sequence different gene regions of *cox1*, *cox3* and fragments of the small and large rDNA subunit of mitochondrial DNA genes, evaluating the applicability of these new sequences in species differentiation and phylogenetic studies.

Keywords: molecular biology, coccidia, COIx, 18S, *Isospora*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada no Novo Mundo tiranídeos Tyrannoidea).....	49
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 Dados morfológicos comparativos para oocistos de <i>Isospora</i> spp. registrados de toutinegras (Parulidae).....	62
Tabela 2 Dados morfológicos comparativos para esporocistos de <i>Isospora</i> spp. registrados de toutinegras (Parulidae).....	63

CAPÍTULO III

Tabela 1 Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada de aves Tyrannida.....	75
Tabela 2 Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada de aves Tyrannida. (continuação).....	76

CAPÍTULO IV

Tabela 1 <i>Primers</i> e condições de ciclismo para amplificação por PCR de quatro loci do genoma mitocondrial.....	89
Tabela 2 Comparative morphology of <i>Eimeria</i> spp. recorded from Columbiformes of the World.....	94
Tabela 3 Análise estatística das comparações médias de oocistos e esporocistos relacionados a caracteres taxonômicos aleatoriamente presentes ou ausentes em oocistos de <i>Eimeria patagioenasae</i>	100

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- Composição do desenho do oocisto esporulado para redescrição de *Isospora ferox* de papa-moscas, destacando a camada externa da parede oocisto com rugosidade moderada (A) ou mínima (B). Barra de escala: 10 µl.....47

Figura 2 - Oocistos esporulados de *Isospora ferox* de fotomicrografias (A, B) e de novas amostras de um papa-moscas, *Myiarchus ferox* (C-G) e de bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurens* (H-J). Para observação: camadas internas (il) e ásperas (rol) da parede oocisto; micrópila (m); núcleo (n); granulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 µl..... 48

Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números dos nós, representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas valores > 40% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....50

CAPÍTULO II

Figura 1 - Desenho do oocisto esporulado de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Barra de escala: 10 µm.....59

Figura 2 - Fotomicrogramas de oocistos esporulados de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Para observação: camadas interiores (il) e exteriores lisas (sol) da parede ovócito; grânulo polar (pg); Corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo do esporocisto (sr); corpos refráteis posteriores (prb) e anteriores (arb). Todos para a mesma escala. Barra de escala: 10 µm.....60

Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança para *Isospora* spp., estimada a partir das sequências *cox1*. Os números nos nós representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas os valores > 50% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....61

CAPÍTULO III

Figura 1 - Desenho de linha do oocisto esporulado de *Isospora leptopogoni* de papa-moscas, na América do Sul. Barra de escala: 10 lm..... 74

Figura 2 - Fotomicrografias de *Isospora leptopogoni* recuperadas de papa-moscas na América do Sul. Observe a camada interna (il) e externa lisa (sol) da parede do cisto oo, micrópila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refratário (rb), resíduo de esporocisto (sr) e corpo de Stieda (sb) e sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 lm.....75

Figura 3 - Árvore pelo método de “Neighbor-Joining” estimada a partir das sequências gênicas COI de espécies de *Isospora*. *Bootstrap* a 1.000 replicações (>40%) para “Neighbor-Joining” (NJ) e “Máxima verossimilhança” (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....75

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Organização do genoma mitocondrial de *Eimeria* spp de aves (baseado no genoma mitocondrial completo de *Eimeria dispersa* disponível no GenBank/BLAST sob o número de acesso KJ608416): Os loci MAVCOXI (posicionados entre ~1.600–2.200 nt) e COIBF1 (posicionados entre ~2.250–2.500 nt) ocupam o gene *cox1*; o locus MARI (posicionado entre ~2.950–3.750 nt) ocupa fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU) e subunidade grande (LSU); e o locus MACOI (posicionado entre ~4.200–4.750 nt) ocupa o fragmento LSU/1 rDNA e o gene *cox3*..... 88

Figura 2 - Desenhos de linhas de oocistos elipsoidais, ovóides e subesferóides de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*, com presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. Barra de escala: 10 µm.....91

Figura 3 - Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*: oocistos elipsoidais (A–H), ovóides (I–N) e subesferóides (O–R). Observe a camada interna (il), camada externa lisa (sol) e/ou véu externo/camada externa áspera (ov/rol) na parede do oocisto, micrópila lateral (lm), micrópila (m), capa de micrópila (mc), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpos Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala: 10 µm.....92

Figura 4 – Perfil eletroforético de PCR para os locos COIBF1 (A), MACOIII (B, C), MAVCOXI (D) e MARI (E) do genoma mitocondrial de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*, obtido em gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular (m) Escada de DNA Promega 1 kb (250–10.000 pb). Os morfotipos “subesferoidal-c”, “ovóide-e”, “elipsoidal-i” e “elipsoidal-k” referem-se à extração de DNA de oocistos individuais subesferóides com micrópila; ovóide com capa de micrópila e micrópila; elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....93

Figura 5 -Histogramas de diâmetro maior e menor (A) and índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*..... 97

Figura 6 - Histogramas de diâmetro maior e menor (A) and índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*..... 97

Figura 7 - Distribuição dos oocistos subesferóides (cinza-claro), ovóides (cinza-escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 40). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfotipos): (a) parede do oocisto lisa e sem estruturas morfológicas associadas; b) Com véu exterior/parede áspera; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; f) Com véu exterior/parede áspera e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.....98

Figura 8 - Distribuição dos esporocistos em oocistos subesferóides (cinza-claro), ovóides (cinza-escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 27). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfotipos): (b) com véu externo/parede rugosa; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila

e micrópila lateral.....99

Figura 9 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (COIBF1) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'ovoidal-e' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; ovulais com capuz polar e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....102

Figura 10 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MACOIII) que cobre parcialmente o gene *cox3* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....102

Figura 11 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MAVCOXI) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos elipsoidais com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....103

Figura 12 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MARI) que ocupa fragmentos de pequenas e grandes subunidades rDNA do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. O morfotipo 'elipsoidal-k' refere-se a um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.....103

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Certificado da proposta intitulada “TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO” protocolada sob CEUA nº: 6606250616.....	117
ANEXO II - Autorização para atividades com finalidade científica. Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO...119	119
ANEXO III – Licença permanente para coleta de material zoológico. De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).....	132
ANEXO IV - ORIGINAL PAPER: <i>Isospora oliveirai</i> n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the Greenish Schiffornis Schiffornis virescens (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America.....	135
ANEXO V - ORIGINAL PAPER: Redescription and molecular identification of <i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America.....	146
ANEXO VI - ORIGINAL PAPER: Distribution, redescription, and molecular identification of <i>Isospora striata</i> McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America.	155
ANEXO VII - ORIGINAL PAPER: <i>Isospora leptopogoni</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sepia-capped flycatcher <i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi, 1846 (Passeriformes: Rhynchocyclidae) in South America.....	164
ANEXO VIII - ORIGINAL PAPER: Worldwide Dispersion of Coccidia from Migratory Birds: First Report of Eimeria bazi Chauhan et Bhatia, 1970 (Eimeriidae) Outside Ásia from Buff-Necked Ibises <i>Theristicus caudatus</i> (Boddaert, 1783) (Threskiornithidae) in South America.....	174
ANEXO IX - ORIGINAL PAPER: Molecular identification of <i>Isospora coerebae</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit <i>Coereba flaveola</i> (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil... 185	185
ANEXO X - ORIGINAL PAPER: <i>Isospora</i> spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators <i>Saltator similis</i> d’Orbigny; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil.....	194
ANEXO XI - SHORT COMMUNICATION: Observations on an <i>Eimeria</i> sp. (Apicomplexa) from the green kingfisher <i>Chloroceryle americana</i> (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) in Southeastern Brazil: an example of how the ecological aspects of the host can be essential for the identification of its coccidians.....	207
ANEXO XII - ORIGINAL PAPER: <i>Isospora basileuterusi</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae)	

from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America.....212

ANEXO XIII - ORIGINAL PAPER: Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: A case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (Columbiformes) in South America.....218

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

A - adenina

AFLP - (Amplified Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados.

ANOVA - Análise de Variância

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

bp pares de bases

PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

C - citosina

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health*

CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres

CEL - camada exterior lisa

CI - camada interior

CINZ - Código Internacional de Nomenclatura Zoológica

COI - gene citocromomo mitocondrial C oxidase subunidade 1

CPS - corpo de parastieda

CRA - corpo refrátil anterior

CRP - corpo refrátil posterior

CS - corpo de Stieda

CSS - corpo de substieda

dATP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Adenina

dCTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Citosina

dGTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Guanina

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatos

DM - diâmetro maior do oocisto

dm - diâmetro menor do oocisto

dTTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Timina

DPA - Departamento de Parasitologia Animal

EEcoE - Espaço Ecológico Educativo

EM - diâmetro maior do esporocisto

em - diâmetro menor do esporocisto

EUA - Estados Unidos da América

G - guanina

g - gramas

GenBank - *Genetic Sequence Data Bank*

GP - grânulo polar

ICBS - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IFRJ - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

IM - índice morfométrico do oocisto

IME - índice morfométrico do esporocisto

ITS - espaçadores internos transcritos

IV - Instituto de Veterinária

JAVF - *primer forward*

JAVR - *primer reverse*

Kb - quilobase

K₂Cr₂O₇ - dicromato de potássio
LABOR - Laboratório de Ornitologia
LABICOC - Laboratório de Biologia de Coccídios
LAGEP - Laboratório de Atividade Genotóxica de Plantas
LSID - *The Life Science Identifier*
M - micrópila
Mb - megabase
MgCl₂ - cloreto de magnésio
ML - máxima verossimilhança
mtDNA - ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N - núcleo
nested PCR - *nested Polymerase Chain Reaction*
NJ - Neighbor Joining
n.sp. - nova espécie
NTS - espaçadores não transcritos
O – oeste
pb – pares de bases
PBS - *Phosphate-buffered saline*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP
PO - espessura da parede do oocisto
RE - resíduo do esporocisto
RFLP - (Restriction Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RNA - ácido ribonucleico
RO - resíduo do oocisto
S - sul
spp - espécie
rs - resíduo do esporocisto
Sb - Stieda
ssb - substieda
T - timina
U - uracila
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV - radiação ultravioleta
ZooBank - *Official Registry of Zoological Nomenclature*
5.8s - subunidade DNA ribossômico
18s - subunidade RNA, Ribosomal
28s - subunidade RNA, Ribosomal
µl - microlitros
> maior
° Graus
' minutos
" segundos
® marca registrada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
OBJETIVOS	23

CAPÍTULO I

REDESCRIBÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Isospora ferox* BERTO, LUZ, FLAUSINO, FERREIRA; LOPES, 2009 (Eimeriidae) DE PAPA-MOSCAS *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Tyrannoidea) NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO	42
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Coleta de amostras	45
2.2. Análises morfológicas	45
2.3. Análises moleculares	45
2.4. Análises da sequência de DNA	45
3 RESULTADOS	46
3.1 Oocisto esporulado	47
3.2 Esporocisto e Esporozóitos	47
3.3 Observações	47
3.4 Análise filogenética	48
4 DISCUSSÃO	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO II

***Isospora basileuterusi* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PULA-PULA *Basileuterus culicivorus* (DEPPE) (PASSERIFORMES: PARULIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO	55
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1. Coleta de amostras	57
2.2. Análises morfológicas	57
2.3. Geração de dados moleculares	58
2.4 Análise de sequência de DNA	58
3 RESULTADOS	59
3.1 Descrição	60
3.2 Observações	60
3.3 Análise filogenética	61
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÃO	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPÍTULO III

***Isospora leptopogoni* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PAPA-MOSCAS *Leptopogon amaurocephalus*, Tschudi, 1846 (PASSERIFORMES: RHYNCHOCYCLIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO	69
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1. Coletas de amostras	71
2.2. Análises morfológicas	72
2.3. Análises moleculares	72
2.4. Análise de sequência de DNA	72
3 RESULTADOS	73
3.1. Descrição	73
3.2. Análise filogenética	73
4 DISCUSSÃO	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

CAPÍTULO IV

ABORDAGENS MOLECULARES E ESTATÍSTICAS PARA A DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE EIMERIIDAE: UM CASO DE EXTREMO POLIMORFISMO EM OOCISTOS EIMERIANOS DE POMBAS-AMARGOSAS *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (COLUMBIFORMES) NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO	84
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	86
2.1. Coletas de amostras	87
2.2. Análises morfológicas	87
2.3. Análise Estatística	87
2.4. Análise molecular	87
2.5. Análise de sequência de DNA	88
3 RESULTADOS	89
3.1 Prevalência e Descrição	89
3.1.1 Diagnóstico	90
3.1.2 Resumo Taxonômico	91
3.2 Análise morfométrica e estatística	97
3.3 Análise molecular e filogenética	101
4 DISCUSSÃO	104
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

CONCLUSÕES GERAIS	113
-------------------	-----

CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
----------------------	-----

INTRODUÇÃO GERAL

Os coccídios são protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao infra-filo Apicomplexa, predominantemente encontrados no trato intestinal dos vertebrados e frequentemente observados em amostras fecais. Entretanto, algumas espécies de coccídios foram relatadas em invertebrados e em outros órgãos além do intestino. Considerados emergentes e oportunistas, apresentam como características principais a presença de oocisto resistente, dotado de uma parede protetora e um complexo apical, composto por microtúbulos subpeliculares, organelas secretórias especializadas e o conóide completo, oco e truncado, este último responsável pela sua adesão e invasão à célula hospedeira e estágios que ocorrem dentro do hospedeiro, chamados estágios endógenos, e estágios exógenos que ocorrem fora do hospedeiro.

Apesar de sua distribuição cosmopolita, certas espécies de coccídios são homoxênicas, nas quais todos os estágios endógenos do parasita ocorrem em um único hospedeiro. Podem operar como “espécies-chave”, apresentando extrema importância para a biodiversidade e conservação, impactando diretamente na manutenção da diversidade em comunidades ecológicas, ecossistemas e em sistemas de produção.

Por consequência, estudos sobre prevalência e densidade de coccídios são extremamente importantes, devido ao fato de que vertebrados, como as aves silvestres, com estresse imunitário em decorrência da ação humana, por características ecológicas como migração, período reprodutivo, e outras características ambientais, serem mais suscetíveis a processos infecciosos e colonização por estes microrganismos.

Dentro do infra-filo Apicomplexa, aproximadamente um terço das espécies existentes pertencem à subordem Eimeriorina e dentro da ordem Eimeriida Léger, 1911 formam um grupo heterogêneo, com diferentes complexidades, apresentando classificação em famílias, gêneros e espécies (MASSEY, 2003).

Estudos demonstraram que, dentre os coccídios, o gênero mais encontrado infectando aves é *Eimeria* Schneider, 1875, mas quando se trata de Passeriformes, *Isospora* Schneider, 1881 é o mais detectado, porém, existem poucos dados disponíveis sobre sua caracterização genética.

As relações interespecíficas de parasitismo são relevantes para o estudo da biologia das espécies da ordem Passeriformes, uma vez que podem abrigar inúmeros parasitos como bernes, piolhos, diversos outros ectoparasitos, nematoides, trematódeos e cestoides, hemoprotozoários e protozoários intestinais.

Em relação ao genótipo, a maioria dos Apicomplexa apresentam dois genomas extracromossômicos presentes na mitocôndria e no apicoplasto ou plastídio (organela exclusiva do Filo Apicomplexa). A mitocôndria possui um genoma constituído de segmentos de DNA lineares composto por unidades repetidas em série de 6 kb. Este genoma caracteriza-se pela presença de três genes, citocromo b (*cit b*), citocromo oxidase subunidade 1 (*cox I*) e citocromo oxidase subunidade 3 (*cox III*), além de sequências fragmentadas de RNA ribossômico. O apicoplasto que é circular, rico em conteúdo adenina e timina possui um genoma de 35 kb composto por 60 genes tRNAs, subunidades maior e menor de rRNA, e genes codificadores de proteínas.

As infecções causadas por coccídios, em aves silvestres estão associadas a diversos fatores, tais como impactos diretos na microbiota, fauna e flora, que indiretamente otimizam e favorecem a transmissão de doenças parasitárias aos animais silvestres. Como na maioria dos tipos de coccidiose, existe um equilíbrio natural entre o parasita e seu hospedeiro, porém, o parasitismo pode levar à morte celular no hospedeiro durante o desenvolvimento do parasita, causando sinais clínicos crônicos e agudos de gravidade variável, podendo surgir quando há um

desequilíbrio associado à baixa imunidade no hospedeiro.

Estudos que envolvam Biologia e Genética Molecular, poderão futuramente elucidar os diferentes mecanismos moleculares até então desconhecidos, possibilitando a proposição de novas estratégias de controle das coccidioses, por exemplo, em animais de produção e um maior conhecimento da ecologia destes microrganismos em animais silvestres, bem como uma melhor e maior diferenciação entre espécies.

Visto isso, o presente estudo, abordará em quatro capítulos a identificação molecular de coccídios de aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro, análise filogenética e a aplicabilidade de algumas regiões gênicas mitocondriais na diferenciação de espécies.

REVISÃO DE LITERATURA

Os Apicomplexa Coccídios

Historicamente, em 19 de outubro de 1674, Antonie Philips van Leeuwenhoek, utilizando-se de um pequeno microscópio, observou minúsculos corpúsculos ovais presentes na bile de coelhos não conseguindo identificá-los adequadamente. A não observação de lesões ou anomalias no fígado e na vesícula biliar desses animais, a baixa quantidade de corpúsculos e o uso de um equipamento rudimentar, podem ter influenciado na descrição e a não publicação da descoberta em suas cartas (DOBELL, 1922; DUSZYNSKI et al., 1999; WAGGONER, 2005; KARAMANOU et al., 2010).

Séculos após, mais precisamente no ano de 1839, o doutor Thomas Gordon Hake, pode ter sido o primeiro a visualizar, com mais riqueza de detalhes, as estruturas observadas por Leeuwenhoek, denominando-as de glóbulos de pús. Porém, somente em 1845, Lieberkühn observou alguns organismos com características semelhantes às gregarinas, denominando-os coccídios (DOBELL, 1922).

Atualmente, a comunidade de protozoologistas reconhece que os microrganismos observados por Leeuwenhoek tratavam-se na verdade de estruturas denominadas oocistos, que Lindemann denominou *Monocystis stiedae*. Em 1875, a espécie foi incluída por Schneider no gênero *Eimeria* (HAMMOND; LONG, 1973 *apud* TEIXEIRA, 2007), tendo a sua nomenclatura alterada para *Eimeria stiedae* (Lindemann, 1865) Kisskalt e Hartmann, 1907 (WENYON, 1926; DUSZYNSKI et al., 1999).

Ao longo do tempo diversos coccídios foram descobertos. Em 1878, Rivolta descreveu algumas espécies parasitando rãs, bezerros e cães (WENYON, 1926). De fato, de acordo com Levine (1985), estes microrganismos podem parasitar a maioria dos invertebrados, todas as classes dos vertebrados, incluindo os animais domésticos e silvestres. Entretanto, algumas espécies são capazes de parasitar também o organismo humano, especificamente as células epiteliais do intestino (WENYON, 1926, SMITH, 1993, LINDSAY et al., 1997, XIAO et al., 2004). Ainda em 1878, Rivolta nomeou a espécie de *Isospora* encontrada em humanos de *Isospora hominis*. Em 1923, Wenyon sugeriu o nome de *Isospora belli* (*belli* do latim: guerra) para as espécies descritas por Woodcock e *I. hominis* para as redescritas por Virchow. (MEIRA; CORRÊA, 1950).

Os coccídios, são microrganismos pertencentes ao infra-filo Apicomplexa, classe Coccidiomorphea, juntamente com as gregarinas, dentro da subclasse Coccidia (DUSZYNSKI, 2011). Formam um grupo diversificado de protozoários intracelulares obrigatórios cuja característica principal é a presença de um complexo apical, composto por microtúbulos subpeliculares, organelas secretórias especializadas, róptrias e micronemas e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide completo, truncado e oco, responsável pela sua adesão e invasão à célula hospedeira (PERIZ et al., 2007; RUGGIERO et al., 2015).

Dentro do filo Apicomplexa, aproximadamente um terço das espécies existentes pertencem à subordem Eimeriorina e dentro da ordem Eimeriida Léger, 1911 formam um grupo heterogêneo, com diferentes complexidades, apresentando classificação em famílias, gêneros e espécies (MASSEY, 2003). Alguns, como os dos gêneros: *Atoxoplasma*, *Caryospora*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* são prejudiciais a saúde de animais silvestres, causando morbidade e mortalidade em alguns casos (FRIEND; FRANSON, 1999; MASSEY, 2003; YABSLEY, 2008; SANTOS et al., 2021).

Após a infecção pela ingestão de oocistos esporulados no ambiente ou através de fômites contaminados observamos o parasitismo intracelular obrigatório no hospedeiro, principal

característica deste grupo, apresentando ciclos biológicos alternados entre reprodução sexuada, fase em que são originados os oocistos e assexuada, originalmente descrita por Eimer, em 1870 (BERTO et al., 2014). De acordo com Belli et al. (2006) e Roberts e Janovy, (2009) a característica morfológica responsável pela definição destes microrganismos é a presença de uma estrutura globular; denominada oocisto, resistente e dotada de uma parede protetora, geralmente identificados em amostras fecais (DOLNIK et al., 2010; BERTO; LUZ, 2016).

Os ciclos de vida intestinais são os mais observados, embora também existam estágios de vida extraintestinais, como na isosporose sistêmica (atoxoplasmosse) em passeriformes, por exemplo (DUSZYNSKI et al., 1999; BERTO et al., 2010; BARTA et al., 2012; BERTO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2023).

O desenvolvimento de um número geneticamente determinado de esporocistos e esporozoítos dentro de cada oocisto ocorrem fora do hospedeiro em condições ambientais favoráveis como: saturação de oxigênio, umidade e temperatura apropriados (DUSZYNSKI, 2011). Em relação ao genótipo, a maioria dos Apicomplexa apresentam dois genomas extracromossômicos presentes na mitocôndria e no apicoplasto ou plastídio (organela exclusiva do Filo Apicomplexa) (WILSON et al., 1997). A mitocôndria possui um genoma constituído de segmentos de DNA lineares composto por unidades repetidas em série de 6 kb. (CHAPMAN; SHIRLEY, 2003). Este genoma caracteriza-se pela presença de três genes, citocromo b (*cit b*), citocromo oxidase subunidade 1 (*cox I*) e citocromo oxidase subunidade 3 (*cox III*), além de sequências fragmentadas de RNA ribossômico (HIKOSAKA et al., 2010). O apicoplasto que é circular, rico em conteúdo adenina e timina possui um genoma de 35 kb composto por 60 genes tRNAs, subunidades maior e menor de rRNA, e genes codificadores de proteínas (CAI et al., 2003; KALANON; MCFADDEN, 2010).

As infecções causadas por coccídios em aves estão associadas a diversos fatores, tais como impactos diretos a fauna, flora e microbiota, que indiretamente otimizam e favorecem a transmissão de doenças parasitárias aos animais silvestres (BERTO; LUZ, 2016). Como na maioria dos tipos de coccidioses, há um equilíbrio natural entre o parasita e seu hospedeiro, porém, o parasitismo pode levar à morte celular no hospedeiro durante o desenvolvimento do parasita, causando sinais clínicos crônicos e agudos de gravidade variável, podendo surgir quando há um desequilíbrio associado à baixa imunidade no hospedeiro (MARQUES et al., 2011).

Para Novaes et al. (2011) estudos que envolvam Biologia e Genética molecular, genoma, expressão gênica, poderão futuramente elucidar os diferentes mecanismos moleculares até então desconhecidos possibilitando a proposição de novas estratégias de controle das coccidioses em animais de produção e na descoberta de novas espécies.

Coccídios e Aves Silvestres

Segundo Hawkins et al. (2003) a região neotropical é conhecida por possuir aproximadamente metade da avifauna mundial, e somente no Brasil foram descritas 1.971 espécies de aves dentre as quais 1.742 são consideradas residentes ou migrantes reprodutores, 126 visitantes sazonais, não reprodutores e 103 errantes. (CBRO, 2021). Segundo Berto (2010), os pássaros da região neotropical são predominantemente endêmicos e na América do Sul ocupam inúmeros nichos ecológicos, assim como em outros continentes, são ocupados por outras aves.

A ordem Passeriformes, mais representativa da classe Aves, inclui mais de 5.000 espécies em todo o mundo, e no Brasil foram descritas aproximadamente 1.119 espécies, o que representa mais de 50% de todas as espécies de aves (BERTO, 2010; CBRO, 2021). Em sua maioria, são classificadas como endêmicas e ocupam, no caso da América do Sul, muitos nichos ecológicos, que, em outros continentes, são habitados por outros grupos de aves (BERTO et al.,

2010).

As aves da ordem Passeriformes estão relacionadas a três grupos principais: Neotropicais, representadas pelas famílias, Dendrocolaptidae, Furnariidae, Formicariidae, Rhinocryptidae, Cotingidae e Pipridae; do Continente americano, representado pelas famílias Tyrannidae, Troglodytidae, Mimidae, Vireonidae, Emberizidae, Parulidae, Coerebidae, Thraupidae, Cardinalidae e Icteridae e do Velho Mundo, Corvidae, Muscicapidae, Turdidae e Sylviidae e Motacillidae (SICK, 1997).

Os Columbiformes são um grupo de aves com ampla distribuição, que provavelmente se originaram nas regiões tropicais do Velho Mundo e migraram recentemente para as Américas (SICK, 1997). Há grande variedade de columbídeos na América do Sul, com ocorrências ao nível do mar, nos Andes, em zonas temperadas, regiões desérticas, bem como em florestas tropicais (MEYER DE SCHAUENSEE, 1982).

Estudos demonstraram que, dentre os coccídios, o gênero mais encontrado infectando aves é *Eimeria* Schneider, 1875, mas quando se trata de Passeriformes, *Isospora* Schneider, 1881 é o mais detectado (PAGE; HADDAD, 1995; BERTO, et al., 2011; KNIGHT et al., 2018), porém, existem poucos dados disponíveis sobre sua caracterização genética (CARRENO; BARTA, 1999; YANG et al., 2021). Estas relações interespecíficas de parasitismo são relevantes para o estudo da biologia das espécies da ordem Passeriformes, uma vez que podem abrigar inúmeros parasitos como bernes, piolhos (BENELLI et al., 2017), diversos outros ectoparasitos, nematóides, trematódeos e cestóides, hemoprotozoários e protozoários intestinais (SOULSBY, 1987).

Recentes estudos como os de Ortúzar-Ferreira et al. (2020) identificaram morfológica e molecularmente *Eimeria columbinae* pelo gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e pelo gene 18S subunidade ribossomal pequena RNA (18S) da uma rolinha-roxa, *Columbina talpacoti* Temminck, 1809, além de promover uma revisão taxonômica detalhada de eimerídeos descritos em Columbiformes de todo o mundo.

O parasitismo de aves migratórias apresenta espécies ubíquas, presentes nos hospedeiros ao longo do ano, que infectam aves apenas no inverno, que infectam aves apenas no verão e de migração, que infectam aves ao longo das rotas migratórias (DOGIEL, 1962). A coccidiose, uma importante doença em Passeriformes, confere sintomas caracterizados por diarreia e desidratação, promotores da redução do ganho de peso provocada pela diminuição da reabsorção intestinal, provocadas pela destruição principalmente de células intestinais do hospedeiro (LONG, 1982), redução da fertilidade, imunossupressão, alterações fisiológicas, problemas nutricionais, infecções concomitantes, dentre outras, que podem predispor a recidivas e surgimento de quadro clínico agudo, podendo levar o animal à óbito (SOULSBY, 1987, FREITAS et al., 2003).

A avaliação das enfermidades em pássaros silvestres é complexa e apesar das frequentes descrições de espécies de *Isospora* spp. parasitando aves, não se observaram sinais clínicos graves (MASSEY, 2003).

Dentre as áreas utilizadas para este estudo, o Parque Nacional de Itatiaia considerado unidade de conservação de proteção integral fazendo parte do Mosaico de Unidades de Conservação da Serra da Mantiqueira, abrigando uma grande biodiversidade de pássaros que representam uma amostragem dos pássaros brasileiros observados na Mata Atlântica (BERTO & LUZ (2016) e a Ilha de Marambaia utilizada para uso militar restrito e também protegida como Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba SEMADS (2001).

Parque Nacional de Itatiaia

O Parque Nacional do Itatiaia (PNI) (22°15'e 22°30'S; 44°30'e 44°45'O) possui 28.156

hectares e está localizado nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e apresenta altitudes diversificadas. Tanto Itatiaia como Itamonte têm a maior parte de seus territórios dentro da unidade de conservação e considerado uma Unidade de Conservação com alto grau de vulnerabilidade (AXIMOFF, 2011; MARONEZI et. al., 2022).

Diversos estudos estão sendo realizados no PNI como os de Oliveira et al. (2021) que redescreveram *Isospora striata* McQuiston et al. (1997), em dois novos hospedeiros, revelando novas localidades de parasitismo e fornecendo identificações genotípicas preliminares por meio do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) de ambas as espécies hospedeiras. O estudo morfológico e a similaridade de 100% no sequenciamento do gene COI entre amostras de diferentes espécies de dendrocolaptídeos confirmaram a identificação de uma única espécie, que corroborou a identificação de *I. striata* e ratificou a sua ampla distribuição na Região Neotropical.

Isospora ferox Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 foi redescreta por Ortúzar-Ferreira et al. (2021) a partir de fotomicrografias e de novas amostras de um novo hospedeiro, o bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphureus* Spix. Este estudo forneceu uma caracterização genotípica preliminar, via sequenciamento do gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade 1 (COI).

Maronezi et al. (2022) identificaram três *Isospora* spp. registradas a partir de amostras fecais de trinca-ferro *Saltator similis* (d'Orbigny; Lafresnaye) no entorno do Parque Nacional do Itatiaia, a saber: *Isospora saltatori* Berto, Balthazar, Flausino; Lopes, 2008, *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino; Lopes, 2008 e *Isospora similis* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino; Lopes, 2013, todas compatíveis fenotipicamente com suas respectivas descrições originais. Este estudo forneceu uma identificação genotípica preliminar dos isosporídeos através do sequenciamento do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial, que foi adequado para a diferenciação genotípica desses coccídeos.

Ilha da Marambaia

De acordo com Lorenço et al. (2010) a Ilha da Marambaia situada no litoral da Costa Verde, está localizada na Baía de Sepetiba, no litoral sul do Rio de Janeiro (23°03'39"S, 43°58'48"W), possui 42 km² e uma zona de areia chamada Restinga da Marambaia, que está ligada ao continente no município do Rio de Janeiro (CONDE et al., 2005). Apresenta parte de sua área coberta por remanescentes florestais, semelhantes aos de áreas contínuas ao da região continental, com áreas de manchas de manguezais, dunas e areia costal-arbustiva de restinga sendo considerada uma área de preservação ambiental e de segurança nacional, ocupada pelo Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais (MENEZES; ARAÚJO, 2005).

Lopes (2018) demonstrou em seu estudo que tanto a Ilha da Marambaia, que comporta espécies das famílias Thraupidae, Turdidae e Tyrannidae, Pripridae, Vireonidae, Parulidae e Hirundinidae, e o Parque Nacional do Itatiaia (PNI) onde foi observado as famílias Thraupidae, Thamnophilidae, Dendrocolaptidae, Rhynchocyclidae, Turdidae, Pipridae e Columbidae, apresentando uma grande biodiversidade de Passeriformes, propiciando estudos de ecologia e relações entre parasito/hospedeiro.

Isospora attilae, do hospedeiro tipo o capitão-de-saíra *Attila rufus* (Vieillot, 1819), foi descrita morfológicamente por Rodrigues et al. (2015) e ao ser comparada com espécies de isosporídeos de hospedeiros semelhantes foi classificada como nova para a ciência.

Andrade et al. (2022) forneceram um estudo morfológico e genotípico de uma espécie de *Eimeria* sp. recuperada de um martim-pescador verde *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) capturado na Ilha da Marambaia. A densidade coccídica, alguns aspectos morfológicos de seus oocistos, os resultados moleculares e, principalmente, o nicho ecológico de *C. americana* no manguezal da Ilha da Marambaia sugerem que esta espécie de coccídio seja um

pseudoparasito. A identificação molecular pelo gene COI reforçou a hipótese de que este *Eimeria* sp. está distante de *Eimeria* spp. das aves, já que as maiores semelhanças genotípicas foram de apenas 93% com *Eimeria* spp. de roedores, primatas, canídeos, morcegos, psitacíformes e galíformes. Assim, a análise filogenética colocou *Eimeria* sp. de *C. americana* separada de um clado com *Eimeria* spp. de mamíferos e aves.

Classificação e diversidade de coccídios

Os coccídios da Família Eimeriidae Minchin, 1903, são representados pelos gêneros *Acroeimeria*, *Atoxoplasma*, *Caryospora*, *Choleoeimeria*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Eumonospora*, *Globidium*, *Goussia*, *Isospora*, *Wenyonella* que parasitam todos os grupos de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e invertebrados, infectando diversas células, principalmente no intestino, vesícula biliar, sangue e fígado. (Berto, 2010). Possuem na sua maioria ciclo biológico do tipo monoxênico, em que todas as fases do desenvolvimento parasitário ocorrem no mesmo hospedeiro (ROBERTS; JANOVY, 2009). Segundo Ruggiero et al. (2015) possuem a seguinte classificação:

Super-Reino: Eukaryota Whittaker; Margulis, 1978

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Sub-Reino: Harosa Cavalier-Smith, 2010

Infra-Reino: Halvaria Cavalier-Smith, 2010

Super-Filo: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Sub-Filo: Myxozoa Cavalier-Smith; Chao, 2004

Infra-Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Super-Classe: Sporozoa Leuckart, 1879

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Ordem: Eimeriida Léger, 1911

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

A Ordem Eimeriida é subdividida em Adeleorina Léger, 1911 e Eimeriorina. A Subordem Eimeriorina compreende todos coccídios superiores que apresentam gametogonia. Os gêneros de Eimeriorina taxonomicamente foram separados de acordo com a proporção de esporocistos e esporozoítos por oocisto, no entanto, atualmente, outras características incluindo dados moleculares, são utilizadas para diferenciação genérica (BERTO et al., 2014). Dentre estas características, a presença de corpo de Stieda, parastieda e subStieda as quais são estruturas de excistamento do esporocisto, podem ser componentes básicos da Família Eimeriidae. Os únicos gêneros classificados como Eimeriidae são: *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* e *Caryospora* em aves e répteis (JIRKU et al., 2002), porém outros ainda são especificamente incluídos nessa família.

Este estudo terá uma maior abordagem dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* Schneider, 1881 visto que estão presentes em várias famílias de Passeriformes no Brasil.

Gênero *Eimeria* Schneider, 1875

Segundo Ehret et al. (2017) e Duszynski (2011) o gênero *Eimeria* é o maior e mais biodiverso do filo Apicomplexa com mais de 1.800 espécies descritas, parasita invertebrados e vertebrados, apresenta seus oocistos esporulados contendo quatro esporocistos, cada um com

dois esporozoítos e é considerado o táxon eucariótico mais especioso (YANG et al., 2014; ARISUE; HASHIMOTO, 2015).

As espécies de Eimeriidae são principalmente intestinais, embora algumas se desenvolvam em tecidos, incluindo o fígado, baço, pulmões, rins, túbulos renais, vesícula biliar, ovário, útero dentre outros (ENTZEROTH et al., 1981; ROSALES; MASCARO, 1999). A maioria das espécies do gênero *Eimeria* são parasitas intracelulares monoxênicos (LONG; JOYNER, 1984; MARQUARDT, 1981) e apresentam ciclos de vida similares, com fases parasitárias e ambientais (oocistos), geralmente hospedeiro-específicas e se desenvolvem nas células da mucosa intestinal (DAUGSCHIES E NAJDROWSKI, 2005).

Segundo Ling et al. (2007) o genoma de *Eimeria* spp. possui 55 milhões de pares de bases, com 53% de conteúdo Guanina e Citosina e está organizado em 14 cromossomos, que variam de tamanho entre 1 a mais de 7 Mpb (SHIRLEY, 1994; 2000).

Estes organismos também apresentam dois genomas extracromossômicos: o genoma mitocondrial que é constituído de segmentos de DNA lineares contendo unidades repetitivas de 6kb (CHAPMAN; SHIRLEY, 2003) e o genoma do apicoplasto (organela exclusiva dos organismos do Filo Apicomplexa) que é circular, rico em conteúdo AT e em *Eimeria tenella*, contém cerca de 35 kb (CAI et al., 2003).

Gênero *Isospora* Schneider, 1881

Centenas de *Isospora* spp. foram descritas a partir de aves Passeriformes, das famílias Dendrocolaptidae, Furnariidae, Thamnophilidae; parvordem Furnariida, infraordem Tyranni; Cotingidae e Tyrannidae do parvordem Tyrannida, infraordem Tyranni; Corvidae e Meliphagidae do parvordem Corvida, infraordem Passeri; Cardinalidae, Coerebidae, Emberizidae, Estrildidae, Fringillidae, Hirundinidae, Icteridae, Parulidae, Passeridae, Sturnidae, Thraupidae, Timaliidae, Turdidae e Zosteropidae parvordem Passerida, infraordem Passeri. (BERTO, et al. 2011).

Segundo Pellérdy (1974) e (BARTA et al., 2015) os isosporídeos apresentam oocistos com dois esporocistos, cada um possuindo um corpo Stieda e quatro esporozoítos. Para Pellérdy (1974) mais de 90% de todos os coccídios descritos que infectam aves silvestres pertencem ao gênero *Isospora*.

Dados moleculares de espécies aviárias de *Isospora* são escassos e, quando disponíveis, são geralmente sequências nucleares de subunidades pequenas de rDNA (CARRENO & BARTA 1999). Schrenzel et al. (2005) também obtiveram sequências mt COI curtas em um dos primeiros usos de sequências mt em estudos moleculares desses coccídios.

Para Schrenzel et al. (2005) a genotipagem baseada em sequência de espécies de *Isospora* tem como alvo os locus genéticos 18S rDNA, ITS-1 e ITS-2, entre outros, muito embora seja útil para inferir relacionamentos evolutivos mais profundos, a divergência genética é limitada em sequências nucleares de 18S rDNA para permitir uma diferenciação confiável de coccídios em nível de espécie (OGEDENGBE et al., 2011; EL-SHERRY et al. (2013).

Hafeez (2014) relatou que a identificação específica com base na microscopia é praticamente impossível pois algumas espécies de *Isospora* possuem oocistos morfológicamente indistinguíveis. Hafeez e Barta (2017) identificaram as sequências completas do genoma mitocondrial de *Isospora greineri* (6223bp) e *Isospora superbusi* (6217bp) que causou coccidiose sistêmica em *Lamprotornis superbus*; Aves: Sturnidae, mantidos em cativeiro no Zoológico de Toronto Canadá. O genoma mitocondrial tinha três genes codificadores de proteínas (COI, COIII e *CitB*), bem como 18 fragmentos LSU e 14 SSU rDNA, mas nenhuma região codificando tRNAs e a organização do genoma foi idêntica àquela observada em uma variedade de genomas mt de eimerídeos (OGEDENGBE et al. 2014).

Sequências mitocondriais do citocromo c oxidase subunidade I (COI) (“DNA barcoding”) são consideradas extremamente adequadas para delimitação de espécies baseadas em sequência de espécies de *Isospora*, bem como outros coccídios. (SCHRENZEL et al., 2005; OGEDENGBE et al., 2011; EL-SHERRY et al., 2013).

Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Eimeria* e *Isospora* apresentam um ciclo de vida monoxênico (isto é, com um único hospedeiro) que se inicia quando um hospedeiro susceptível ingere um oocisto esporulado (MCDOUGALD; REID, 1995). A principal característica do ciclo de *Eimeria* spp. é a existência de um ciclo exógeno: esporulação do oocisto em ambiente apropriado e um ciclo endógeno: multiplicação do parasita no trato digestivo do animal e formação do zigoto (ESCOBAR GRIMALDI et al., 2010).

O ciclo do parasito ocorre através da ingestão dos oocistos esporulados viáveis do parasito provenientes de um local contaminado, por parte das aves. A ação mecânica da ingestão, a presença de proteases e sais biliares são responsáveis pela quebra da membrana celular do oocisto e liberação dos esporocistos. (WOODMANSEE, 1987).

A passagem pelo trato intestinal, mais especificamente a interação com o suco pancreático, excita o esporocisto que libera vários esporozoítos, estes movem-se em direção ao tecido epitelial da porção duodenal do intestino, através de movimentos ondulatórios e com o auxílio de um suco proteico secretado pelo esporocisto.

Dentro do tecido, os esporozoítos crescem alimentando-se das células hospedeiras, esta fase é denominada trofozoíto e causa dano gradual à célula do epitélio intestinal, proporcional ao crescimento do parasito. Em seu tamanho máximo (10 a 12 µm), o parasito causa a atrofia da célula e induz a replicação da mesma de forma a aumentar o número de parasitos (CHAPMAN, 2014).

A produção de gametas se dá pela diferenciação dos esquizontes maturados de acordo com o grau de nutrientes acumulado por eles. A diferenciação dos macrogametócitos (que dão origem a um único gameta feminino) ocorre devido ao grande suporte nutricional existente. Os microgametócitos (que dão origem a vários gametas masculinos), possuem menor aporte nutricional. Os macrogametócitos se depositam dentro do tecido epitelial do intestino até a completa maturação/desenvolvimento, quando o tecido é rompido o macrogameta é deslocado de forma a fazer contato com a parede interna do intestino, ainda preso nela. Nessa fase os macrogametas são atacados pelos microgametas que rompem a membrana do microgametócito e se deslocam, através de “movimentos chicote” e com o auxílio do flagelo, em direção ao gameta feminino para realizar a fecundação. Após a fecundação, há a formação do zigoto que depois da fecundação, na maioria dos casos, assume a forma oval (tamanho e forma dos oocistos possuem inúmeras variações) e adquire uma membrana celular protetora, sendo chamado de oocisto. Eventualmente, os oocistos se desprendem da parede intestinal e ficam livres para serem secretados junto às fezes do animal. Em condições favoráveis, de temperatura, calor e umidade, o oocisto pode ser esporulado; processo que consiste na divisão do núcleo do oocisto e formação de esporocistos individualizados pela massa celular. O oocisto esporulado, quando ingerido por outro animal, sofrerá excitação pelo suco pancreático, liberação dos esporozoítos e início de uma nova infecção (CHAPMAN, 2014).

Identificação de espécies coccídias

É notório que espécie é uma unidade comparativa necessária nos campos da biologia, sistemática, anatomia, etologia, desenvolvimento, ecologia, evolução, genética, filogenia,

biologia molecular, paleontologia, fisiologia, dentre outras áreas. Isto posto, muitos conceitos de espécie, incluindo o biológico, morfológico, por isolamento reprodutivo, dentre outros foram propostos (DE QUEIROZ, 2005, 2007). Na prática, os taxonomistas caracterizam e consequentemente classificam as entidades biológicas, tornando-as tangíveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome, construído de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (DE QUEIROZ, 2007).

A atribuição de um nome constitui a elaboração de uma hipótese, segundo a qual um determinado conjunto de caracteres, principalmente morfológicos, inferem uma identificação padronizada de uma espécie, com características biológicas distintas, história evolutiva independente de outras entidades biológicas semelhantes. (LIPSCOMB et. al., 2003).

O modelo tradicional de descrição e identificação de espécies é baseado em características morfológicas, pelo fato de que foram os caracteres perceptíveis e erigidos, disponíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Deste modo, o conhecimento sobre a diversidade biológica é fundamental para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a atividade de nomeá-las é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e a tudo que está relacionado aos organismos (SAVAGE, 1995).

Segundo Ferreira et al. (2009), o primeiro sistema de classificação biológica, o qual consistia na separação dos organismos de acordo com suas semelhanças e diferenças, consistindo dessa forma num sistema de classificação artificial é atribuído ao filósofo grego Aristóteles (384 a.C. – 322 a.C.). O sistema de classificação atual, binomial, somente foi proposto em 1735 por Carl Linne, (1707-1778) com a publicação do seu livro “*Systema naturae*” (LINNAEUS, 1758).

Contudo, embora houvesse regras mais criteriosas para a classificação dos organismos, os mesmos eram agrupados de acordo com suas semelhanças e diferenças, consistindo assim, também, num sistema de classificação artificial. Uma maior organização ocorreu somente em 1950, com o estabelecimento da sistemática filogenética por Willi Hennig e a consolidação da escola cladista, a qual se baseia, não somente nas semelhanças e diferenças entre os organismos para a classificação dos mesmos, mas também na atribuição de ancestrais comuns às espécies. Assim, o sistema de classificação passou a procurar grupos naturais de organismos. (PAPAVERO, 1971).

A identificação dos coccídios é realizada basicamente, através da observação dos oocistos esporulados (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002). O diagnóstico é baseado na avaliação macroscópica descrita inicialmente por Johnson e Reid (1970), através da observação e das lesões intestinais: duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon, posteriormente classificadas em graus de lesão. Porém, outros métodos laboratoriais podem ser utilizados para melhor acurácia, como o exame histopatológico, parasitológico e molecular.

O diagnóstico de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*, por exemplo, é realizado principalmente pela pesquisa de oocistos em esfregaços fecais corados. No caso de *Cryptosporidium* pode também ser realizado testes pela detecção de coproantígenos por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou através da reação em cadeia da polimerase (PCR) na qual é realizada a amplificação do DNA. Além disso, a análise do polimorfismo genético de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) permite um melhor entendimento da dinâmica da transmissão podendo ser utilizada na caracterização das espécies de *Cryptosporidium*. (GARCIA, 2010).

Aspectos morfo-biológicos

Os oocistos de coccídios são estruturas extremamente resistentes, de aspecto circular, providos por uma parede de bicamadas, protetiva, e de uma membrana externa não visível em

oocistos maduros, com textura variando de lisa a rugosa (BELLI et al., 2006, CDC, 2019). Além de sua morfologia básica ser comum a todos coccídios, sendo também responsáveis por suas definições, oferecem resistência a danos mecânicos e químicos que permite a sobrevivência dos parasitas e permanência da capacidade infectante, por períodos prolongados. (LEVINE, 1985; SOULSBY, 1987, BELLI et al., 2006; BERTO, 2010). São frequentemente isolados das fezes ou urina de hospedeiros, tais como em diversas espécies de aves, como observado neste estudo (BERTO, 2010).

Os oocistos do gênero *Isospora* são denominados dispóricos tetrazóicos por conter dois esporocistos com quatro esporozoítos em cada um e os do gênero *Eimeria*, tetraspóricos dizóicos por apresentarem quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (LEVINE, 1985).

A observação das características apresentadas pela parede bicamada do oocisto é fundamental na diferenciação e identificação das espécies de *Eimeria*, que apresentam paredes, com micrópila, espículas, rugas, e capuz polar por exemplo e de *Isospora* que apresentam paredes uniformes (CASAS et al., 1995). Apesar de não ser uma característica frequente em *Isospora* spp, algumas espécies de coccídios apresentam em sua camada exterior, micrópila e um capuz polar (BERTO et al., 2009b).

As características da parede do oocisto são utilizadas na diferenciação e identificação das espécies de *Eimeria*, levando em consideração que a maioria dos eimerídeos apresentam paredes distinguíveis, com espículas, rugas, micrópila, capuz polar e/ou outras características. Em contrapartida, no gênero *Isospora* as paredes tendem a ser mais uniformes, e por isso, faz-se necessária a observação de outras características para que as espécies possam ser diferenciadas (CASAS et al., 1995). Em consequência e função dos esporocistos de *Isospora* apresentarem corpos de Stieda e substieda que seguem um padrão em cada espécie; esta característica é utilizada na diferenciação e identificação. No gênero *Eimeria* esta estrutura é menos comum (GRULET et al., 1982; BERTO et al., 2009b; 2009c; 2009d; 2009e).

Duszynski e Wilber (1997) descreveram como característica morfológica básica dos oocistos dos gêneros *Eimeria* e *Isospora*, diâmetros maior e menor do oocisto e esporocisto, assim como seus respectivos índices morfométricos, que correspondem a razão entre os diâmetros maior sobre menor, textura, colorações, projeções e camadas da parede do oocisto, presença em sua estrutura interna de esporocistos contendo esporozoítos (forma infectante), presença ou ausência de micrópila, capuz polar, resíduo e grânulo polar no oocisto, presença ou ausência de esporopódios, membranas aderentes, suturas, resíduo e corpos de Stieda, substieda e parastieda no esporocisto e presença ou ausência de corpo refrátil e núcleo no esporozoíto. Apesar de não ser uma característica frequente em *Isospora* spp, algumas espécies de coccídios apresenta em sua camada exterior, micrópila e um capuz polar (BERTO et al., 2009b)

Internamente, o oocisto de *Isospora* spp. apresenta dois esporocistos; entre eles pode ocorrer uma massa homogênea chamada de resíduo do oocisto, ou um granulo polar (BERTO et al., 2014). Os esporocistos possuem estruturas em seu ápice chamadas de corpo de Stieda e substieda. Estas estruturas são utilizadas para a identificação e diferenciação morfológica do gênero *Isospora* e demais gêneros de Eimeriidae.

Existem inúmeros formatos e tipos de Stieda e substieda e algumas redescrições de espécie tem sido fundamentada com base nessas estruturas. Berto et al. (2014) sugeriram através do desenho do corpo de Stieda e substieda, termos específicos a serem usados para descrição morfológica [adaptado de Grulet et al. (1982), Berto et al. (2009a-c, e, 2010b, 2011b, c, 2013a, b), Balthazar et al. (2009b), Pereira et al. (2010) e Coelho et al. (2011a, b, 2013)], com as seguintes classificações para corpo de Stieda: Achatado, Arredondado, em forma de botão, em forma de botão e bolha, em forma de mamilo, em forma mamilo a meia-lua, em forma mamilo para triangular, em forma de meia lua, triangular e triangular em losango e para corpo de substieda: Ausente, largo, arredondado, arredondado irregular, retangular, trapezoidal, trapezoidal com base irregular, cônico e compartimentado.

Dentro do esporocisto, grânulos difusos ou compactos, denominado “resíduo de esporocisto”, podem ser observados, apresentando variações em quantidade e forma, de acordo com a espécie (BERTO et al., 2014). Os esporocistos de *Isospora* spp., possuem 4 esporozoítos em seu interior, estes esporozoítos, forma infectante, possuem corpos refráteis únicos ou em pares, classificados como anteriores e posteriores. Mais ao centro, no esporozoíto encontra-se o núcleo, menor em tamanho que os corpos refráteis. Os esporozoítas podem apresentar estrias em extremidade anterior (BERTO et al., 2014).

Berto et al. (2014) relacionaram a proporção de esporocistos e esporozoítos de oocistos de coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida) recuperados de amostras fecais da seguinte forma: *Cryptosporidium* não possui esporocisto e possui 4 esporozoítos; *Tyzzzeria* e *Pfeifferinella* não possuem esporocisto e apresentam 8 esporozoítos; *Caryospora* apresenta 1 esporocisto e 8 esporozoítos; *Cyclospora* apresenta 2 esporocistos e 2 esporozoítos; *Isospora*, *Hyaloklossia*, *Nephroisopora*, *Toxoplasma*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Neospora*, *Hammondia* e *Besnoitia* apresentam 2 esporocistos e 4 esporozoítos; *Eimeria*, *Choleoeimeria*, *Acroeimeria* e *Calyptospora* apresentam 4 esporocistos e 2 esporozoítos; *Barroussia*, *Adelea*, *Adelina*, *Pseudoklossia* e *Goussia* apresentam variados a muitos esporocistos e 2 esporozoítos; *Klossia* apresenta variados a muitos esporocistos e 4 esporozoítos; *Klossiella* e *Aggregata* apresentam variados a muitos esporocistos e apresenta variados a muitos esporozoítos.

Berto et al. (2010b) elaboraram uma chave de identificação das espécies do gênero *Isospora* spp. parasitas de Passeriformes na América do Sul utilizando como base apenas as características morfológicas e morfométricas dos oocistos.

Outras abordagens experimentais, como a quantificação de oocistos por grama de fezes (OoPG), especificidade do hospedeiro, aspectos do ciclo de vida, locais de infecção, patogenicidade e antigenicidade e sequenciamento de nucleotídeos, complementados pela caracterização morfológica tradicional de coccídios, proporcionam melhorias no diagnóstico e identificação de espécies. (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2011^a).

Complementando a microscopia, outros métodos parasitológicos de identificação diretos como a safranina azul de metileno (BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984), coloração por Kinyoun (MA; SOAVE, 1983) Ziehl-Neelsen modificado, muito usada em função do tamanho do oocisto na rotina laboratorial (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT et al., 1990) coloração negativa de verde-malaquita (ELLIOT, MORGAN e THOMPSON, 1999), coloração Hematoxilina Férrica de Faust, para visualização morfológica dos protozoários, Giemsa, Auramina (PACHECO, 2013), mas são considerados de baixa sensibilidade e especificidade, principalmente quando o número de oocistos na amostra são diminutos (MORGAN et al., 1998).

Diversos testes baseados em princípios imunológicos foram desenvolvidos para análise de protozoários em amostras fecais. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) está entre os testes sorológicos corriqueiramente utilizados em pesquisa médica para identificação de anticorpos de parasitos em casos isolados ou em estudos epidemiológicos. Outros testes sorológicos incluem a Aglutinação Direta Modificada (MAD) e ELISA.

O ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) oferece uma alternativa diagnóstica em substituição à microscopia, pois independe da identificação morfológica de oocistos por detectarem antígenos do parasito em questão. (DUBEY, 2001; THOMPSON et al., 2003; SOUZA, 2005; BRAGA et al., 2011; DUBEY et al., 2011; ALANAZI; ALYOUSIF, 2011).

A Imunofluorescência Direta utiliza um anticorpo monoclonal contra proteínas específicas presentes na parede do oocisto do parasito. Esses testes apresentam vantagens, pois são bastante sensíveis e específicos, de fácil execução e podem permitir o processamento de mais de uma amostra em curto período de tempo (GARCIA; SHIMIZU, 1997).

Alguns testes imunoenzimáticos fazem detecção da infecção em animais na fase pré-

patente, onde ainda não estão eliminando oocistos nas fezes (SMITH; NICHOLS, 2010).

Métodos sorológicos mais trabalhosos e que requerem tempo para execução da interpretação dos resultados como *Western Blot*, ou ensaio de imunotransferência, detectam anticorpos, apresentando sensibilidade e especificidade na reação com o antígeno do parasita através de uma membrana de poliacrilamida. (DUBEY et al., 2015).

O conhecimento sobre coccídios e sobre os demais protozoários, através da parasitologia diagnóstica, avançou nos últimos anos, graças ao desenvolvimento da biologia molecular, iniciado após a descoberta do DNA. A detecção e taxonomia dos coccídios, através da aplicação de métodos morfológicos e morfométricos, foram complementadas pelos métodos moleculares, visando superar algumas limitações encontradas nos métodos microscópicos convencionais (CARVALHO-ALMEIDA, 2004), particularmente no que diz respeito aos parasitas coccidianos dos animais de produção (CARVALHO et al., 2011; CHAPMAN et al., 2013).

Romper a robusta parede do oocisto para liberar DNA é um desafio para os estudos de biologia molecular, justamente pela presença de duas ou mais camadas espessas e resistentes (HAMMOND; LONG 1973; DUSZYNSKI et al., 1981; BELLI et al., 2006). Segundo Zhao et al., (2001) a camada interna contém aproximadamente 70% de proteína. Tang et al. (2017) relataram que diversos métodos utilizados para a lise da parede celular, como congelamento e descongelamento repetidamente (JINNEMAN et al., 1998), incubação com fenol quente (STUCKI et al., 1993), sonicação, etanol, amônia, ou lisozimas não foram suficientemente eficazes para o rompimento da parede do oocisto.

A ruptura adequada geralmente é alcançada apenas quando se usam forças mecânicas, como por exemplo: a centrifugação com esferas de vidro (DUBEY et al., 1970, SHIRLEY 1995, SCHARES et. al., 2005; MACPHERSON; GAJADHAR, 1993; FERNANDEZ et al., 2003) ou trituração em mini pilão (HAUG et al., 2007). Esses métodos são mais adequados para amostras contaminadas com grande número de oocistos, como as fezes. Porém, em casos de infecção subclínica com pequeno número de oocistos ($< 10^3$), as paredes do oocisto não se quebram uniforme e completamente, reduzindo muito o rendimento do DNA (ZHAO et al., 2001).

Kaya et al. (2007) demonstraram que o método envolvendo hipoclorito de sódio e choque osmótico, com solução saturada de sal, propiciou a lise da parede do oocisto, minimizando a perda de DNA durante o procedimento de extração. Este método superou as desvantagens dos métodos existentes de extração de DNA baseados em procedimentos de moagem de esferas de vidro e excitação de esporozoítos. Tang et. al. (2017) compararam quatro metodologias de extração de DNA diferentes, com resultados obtidos através da utilização da técnica a qual denominaram otimizada, com diferentes tratamentos contendo hipoclorito de sódio e soluções saturadas de cloreto de sódio, por tempos determinados de incubação (0,5, 1, 1,5 e 2,0 h) e concluíram que através de um método de lise de oocistos simples, sensível e eficaz para extração de DNA, utilizando-se de um pequeno número de oocistos de coccídios, as vantagens oferecidas incluem perda mínima de DNA, menos riscos de contaminação e alto rendimento de amostras, facilitando assim o uso de técnicas de identificação molecular e o desenvolvimento de conjuntos de dados epidemiológicos valiosos, com grande importância para a prevenção e manejo da coccidiose.

No trabalho de Yang et al. (2014), o DNA total foi extraído de 200 mg de cada amostra fecal usando *Power Soil DNA Kit* (MolBio, Carlsbad, Califórnia) com algumas modificações.

Alguns Kits comerciais são constantemente utilizados na extração de DNA de coccídios, tais como: “Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen, São Paulo, Brasil), (Ortúzar-Ferreira, et al., 2021; Melo et al., 2022, Mello et al., 2022), Wizard “Genomic DNA Purification Kit” (Promega, USA), DNazol Reagent, (Invitrogen, USA), PureLink® Genomic DNA Mini Kits, dentre outros. (REGINATO et al., 2020).

Reginato et al. (2020) avaliaram seis protocolos para extração de DNA de *Eimeria* spp. em amostras de bovinos e ovinos em seis protocolos de extração de DNA: kit comercial, kit

comercial com modificação, DNAzol, brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB), esferas de vidro e kit comercial para amostras fecais e concluíram que todos os protocolos de extração testados promoveram a liberação de DNA de oocistos, porém CTAB mostrou-se melhor na extração de DNA devendo ser considerado como método de extração de DNA em estudos moleculares envolvendo oocistos de *Eimeria* sp. de ovinos e bovinos.

Biologia Molecular

A Biologia Molecular investiga e estuda o genoma dos organismos, e o conjunto de suas informações genéticas (CASLEY, 1992). Dada algumas limitações na detecção de espécies a partir dos métodos diretos e imunológicos, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, fornece informações valiosas em complemento das oferecidas pela microscopia ou técnicas imunológicas (SOLFERINI; SELIVON, 2012; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012).

Berto et al. (2014) realizaram uma revisão de literatura que abordou detecção, sistemática e taxonomia dos coccídios revelando que a aplicação de métodos moleculares aumentou consideravelmente desde meados dos anos 90 e agora é uma prática firmemente estabelecida, principalmente no que diz respeito aos parasitas coccídios de animais de produção e silvestres (CARVALHO et al., 2011; CHAPMAN et al., 2013).

Os caracteres morfológicos e comportamentais embasaram por muitos anos, estudos de taxonomia e sistemática pelo fato de serem as principais informações visíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Entretanto, levando em consideração que fatores bióticos e abióticos influenciam a relação do genótipo com o fenótipo, muitas espécies podem ter sido erroneamente identificadas ao longo do tempo. A identificação molecular, (ou taxonomia molecular), por sua vez, tem sido eficiente em solucionar os problemas enfrentados pela taxonomia tradicional, como: separação de espécies crípticas, identificação de espécies com grande plasticidade fenotípica, identificação de estágios do desenvolvimento (HEBERT et al. 2003).

Com o constante desenvolvimento tecnológico e a evolução gradual de novos métodos de estudos, o conhecimento da biodiversidade atingiu maiores proporções. Há aproximadamente 50 anos, as sequências de nucleotídeos do DNA ribossômico foram utilizadas para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (WOESE; FOX, 1977) e as pesquisas em DNA mitocondrial dominaram a sistemática molecular no final da década de 70 e início da década de 80 (AVISE, 1994) e desde o final da década de 90, sequências de DNA vêm sendo utilizadas como marcadores para inferir as relações evolutivas entre as diversas espécies biológicas (WOESE; FOX, 1977), em abordagens taxonômicas e estudos de biodiversidade (TAUTZ et al., 2002).

De acordo com Jex et al. (2008) as técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, e fornecem informações valiosas além das oferecidas pela microscopia ou técnicas imunológicas (PACHECO, 2013). Entretanto, ainda apresentam custo elevado quando comparada às outras técnicas de detecção de oocistos e por isso, esses métodos não têm sido rotineiramente utilizados em laboratórios de diagnóstico (MEIRELES, 2010).

Atualmente, diversos marcadores moleculares estão sendo utilizados para o auxílio diagnóstico na diferenciação e identificação de diferentes espécies de protozoários, como: utilização de isozimas (GUSMÃO et al., 2000), fragmentos obtidos por enzimas de restrição (RFLP) (MOYSÉS; ALMEIDA-TOLEDO, 2002), DNA arrays (HAJIBABAEI et al., 2007; LOYFER, 2023), SNPs (single-nucleotide polymorphism) (SHAFFER; THONSOM, 2007; LASERNA-MENDIETA, 2023), PCR-Multiplex (NAMDAR, 2023), sequências de DNA dos mais variados genes (POOK & MCEWING, 2005; LEMER et al., 2007; CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2022), dentre outros.

Principais métodos moleculares de identificação e caracterização

Segundo Oliveira (2011) a identificação das espécies de *Eimeria* e *Isospora* tem sido classicamente feita utilizando-se como parâmetros características morfológicas e morfométricas, a espécie do hospedeiro, o local da infecção, aspecto das lesões, período de pré-patência, período mínimo de esporulação, morfologia do oocisto esporulado, proteção cruzada, entre outros. Devido a polimorfismos e especificidade desconhecida do hospedeiro, a biologia molecular veio para ajudar nessa caracterização, delimitando com maior precisão as espécies. (GRULET et al., 1982; LEVINE, 1982).

Perante a limitação na detecção de espécies a partir dos métodos diretos e imunológicos, rotineiramente utilizados, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento dos ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficaz para a diferenciação de espécies (JEX et al., 2008).

As técnicas moleculares possuem ampla aplicação na área da parasitologia, no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, genética de populações, taxonomia, evolução biológica, epidemiologia e demais interações, melhorando nosso entendimento sobre a relação do parasito-hospedeiro (JEX et al., 2008; FAYER et al., 2010).

A principal metodologia molecular empregada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada como amplificadora de sequências de DNA específicas de espécies para diagnóstico (OGEDENGBE et al., 2011a), de marcadores moleculares de nível de gênero ou família; incluindo o *locus* 18S rDNA nuclear (MORRISON et al., 2004), de regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) (MOTRIUK-SMITH et al., 2011) ou o gene (*cox-1*, *COI*), que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase mitocondrial (OGEDENGBE et al., 2011b).

PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma técnica revolucionária de biologia molecular capaz de amplificar uma sequência específica de ácidos nucleicos e aumentar exponencialmente o número de cópias para detecção, envolvendo a síntese enzimática in vitro de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (TSUJI et al., 1997).

Idealizada e desenvolvida pelo bioquímico estadunidense Kary Banks Mullis em 1984, difundida e com o passar dos anos mais acessível, consiste basicamente na amplificação de um alvo molecular específico (fragmento de DNA ou RNA) por meio de uma reação química composta por diferentes etapas.

De acordo com Morgan et al. (2009) a PCR proporciona sensibilidade e velocidade para a análise de amostras de DNA, e a abordagem tem a capacidade de quantificar o DNA.

Para que a reação ocorra existe a necessidade da presença de quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), com acontecimentos como: a desnaturação, com abertura da fita de DNA alvo (dupla fita); o anelamento, na qual os iniciadores ou *primers* interagem com sua sequência complementar, etapa que garante a especificidade ao processo e a extensão enzimática, quando um par de oligonucleotídeos, utilizados como iniciadores, (funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada *primer*) e que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Todos os *primers* são elaborados e sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas da região alvo. A terceira etapa da reação consiste na replicação do alvo por meio da enzima DNA polimerase. Essas três etapas ocorrem em temperaturas diferentes e sendo repetidas por pelo menos 30 vezes, gerando uma amplificação exponencial (TEDLA, 2019).

Em cada ciclo da PCR, ocorre a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; o anelamento dos *primers* as regiões alvo, ocorre com uma queda da temperatura para aproximadamente 35°C a 60°C; posteriormente a temperatura volta a aumentar, para 72°C, proporcionando a extensão da fita a partir da enzima DNA polimerase em cada terminal 3' dos *primers*. A extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo (REGITANO, 2001).

O nested-PCR é realizado a fim de aumentar a especificidade/sensibilidade da reação, no qual o produto amplificado (*amplicon*) na primeira PCR é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do seguimento já amplificado. O segundo par de iniciadores usado sempre amplifica uma sequência menor que o primeiro par, tornando a reação de PCR mais específica e sensível (GRECA, 2010; MIGUEL-OTEO et al., 2017).

A PCR em tempo real ou qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa) é uma variação da PCR tradicional que possibilita a identificação do DNA alvo em menor tempo, de forma quantificável, e sem a necessidade do procedimento de eletroforese. Dessa forma a qPCR possibilita a quantificação da parasitemia, o que não pode ser alcançado por outras abordagens de PCR. No entanto, os custos dos reagentes e equipamentos para realização desse tipo de análise são relativamente altos em relação aos da PCR tradicional, o que inviabiliza sua aplicação em muitos locais. (KAMAU et al., 2014).

Uma terceira variação, a PCR multiplex, permite que sejam introduzidos diversos conjuntos de iniciadores em uma mesma reação, de forma a amplificar diferentes alvos ao mesmo tempo, por meio de sua dependência do pareamento de bases nitrogenadas. Essa abordagem tem sido utilizada inclusive para detecção de múltiplas infecções (KAMAU et al., 2014).

Schnitzler et al. (1998, 1999) realizaram o primeiro ensaio molecular baseado em PCR com iniciadores específicos e utilização do alvo ITS1 (espaçador interno transcrito 1) que possui variações interespecíficas que permitiram identificar sete espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica de forma específica e com alta sensibilidade. Recentemente, Kawahara et al. (2010) realizaram a mesma abordagem para 6 espécies de *Eimeria* que infectam os bovinos.

Genoma e Escolha do segmento de DNA

O genoma é constituído pelos DNA nuclear e os contidos em organelas como mitocôndrias e cloroplastos (ADAMS e PALMER, 2003). A organização e o tamanho do genoma mitocondrial, por exemplo, variam entre as diferentes linhagens filogenéticas dos eucariotos e apesar do tamanho estar compreendido entre 16.000 pares de base (16 Kb) em humanos a até 500 Kb em algumas espécies de plantas, os genomas mitocondriais, em sua maioria, contêm entre 12 e 20 genes codificadores de proteínas. A maioria destes genes codificam componentes “chaves” da respiração aeróbica e tradução, como as citocromo oxidases e proteínas ribossômicas (ANDERSSON et al., 2003; BULLERWELL; GRAY, 2004). Os genomas eimerianos consistem em um genoma nuclear, composto por 14 cromossomos de 1 a 7 Mb (SHIRLEY, 1994), um genoma mitocondrial de aproximadamente 6200 pb e um genoma apicoplástico circular de aproximadamente 35 kb (SHIRLEY, 1994). Ogedengbe; Barta (2015), descreveram a sequência completa de uma cópia do genoma mitocondrial (mt) de uma *Isospora* sp., causadora de coccidiose sistêmica em canários em cativeiro (*Serinus canaria* Linnaeus). O DNA foi extraído de tecidos infetados com numerosos merozoítos obtidos durante a necropsia diagnóstica (fígado, baço, pulmões e intestino) e, em seguida, amplificado usando PCR de longo alcance com *primers* específicos (COCCI_MT-WG-F e COCCI_ MT-WG-R;

OGEDENGBE et al., 2014) para obter um genoma mt quase completo (6168 pb); A região restante (48 pb) foi amplificada usando um segundo par de *primers* para chegar a um produto de 620 pb com sobreposições consideráveis (387 e 115 pb) com o amplicon primário. O genoma de 6216 pb da *Isospora* sp (GenBank: KP658103) apresentou três genes codificadores de proteínas (COI, COIII e CytB) com 19 fragmentos de LSU e 14 SSU rDNA, mas nenhuma região codificando tRNAs; o genoma partilhou 490% de identidade sequencial com numerosas *Eimeria* spp., que têm genes e ordens de genes idênticos nos seus genomas mt (Ogedengbe et al., 2014).

Os genes ribossômicos nucleares ou genes de rRNA de eucariotos são compostos de repetições arranjadas em repetições seriadas (tandem). Cada uma destas repetições contém as subunidades de rRNA 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores externos transcritos ETS1 e ETS2 e espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2. As subunidades pequenas (SSU ou 18S) e grande (LSU ou 28S) do rRNA têm sido utilizadas para análises filogenéticas de espécies devido ao seu alto grau de conservação em organismos ao longo de toda a escala evolutiva. As regiões espaçadoras, por outro lado, não serem utilizadas funcionalmente, não sofrem grande pressão de seleção e apresentam, portanto, maior grau de divergência. Essas regiões são mais indicadas para estudos de populações, usando-se as variações intraespecíficas como caracteres discriminantes. Outra aplicação dos ITSs é no desenvolvimento de ensaios diagnósticos por PCR. Utilizando-se, por exemplo, iniciadores dirigidos contra as regiões flanqueadoras do ITS1, presentes em regiões altamente conservadas das subunidades SSU (18S) e 5.8S, consegue-se amplificar com sucesso o ITS1 de muitas espécies, e até mesmo de gêneros distintos. Uma vez sequenciados os produtos de amplificação, pode-se desenhar pares de iniciadores específicos para uma ou mais espécies em estudo. Essa abordagem foi utilizada com sucesso para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos em vários organismos, incluindo as sete espécies de *Eimeria* de *Gallus gallus domesticus* (SCHNITZLER et al., 1998; SCHNITZLER et al., 1999).

Genes e regiões gênicas

Para que um gene seja candidato a gene de referência em determinado estudo, deve ser expresso na amostra, não ser coregulado com o gene alvo e apresentar variação de expressão mínima (CHERVONEVA; SCHULZ, 2010). Desta forma, vários genes e fragmentos de genes foram descritos e têm sido alvos da amplificação via PCR com o intuito de diferenciar coccídios, entre eles destacam-se: o gene da cisteína proteinase, além dos genes do RNA ribossomal (rRNA) e mitocondriais que permitem o diagnóstico diferencial (TANAKA, 1997; SOUTO et al., 1999; BARTA, 2001). Os genes do RNA ribossomal se apresentam entre as sequências mais conservadas, encontradas na natureza sendo extensivamente utilizadas para análises filogenéticas e diagnóstico específico. (CUPOLILLO et al., 1995; WALKER et al., 2015; DÁVILA; MOMEN, 2000; ROH, 2023).

Os múltiplos genes para o RNA ribossômico (rRNA) na maioria dos eucariotos estão dispostos em unidades de transcrição que se repetem em conjunto, cada uma contendo um gene para rRNA 18S, 5.8S e 28S (WALKER; PACE, 1977; WELLAUER; DAWID, 1977).

Os genes do rRNA de eucariotos são encontrados como unidades repetitivas sequenciadas (100 a 200 cópias), separadas por espaços não transcritos chamados NTS (*Non Transcribed Spacers*) (GUEVARA et al., 1992). Cada unidade transcrita é composta pelos genes do rRNA 18S, 5.8S e 28S, bem como de várias regiões espaçadoras internas que são transcritas, chamadas ITS (*Internal Transcribed Spacers*), as quais são cercadas por sequências NTS. Pulido et al., (1996) evidenciaram que os NTS são constantemente utilizados nas comparações de espécies fortemente relacionadas.

Genes ribossomais 18 S e 28 S

Existem quatro tipos de rRNAs em organismos eucarióticos, representados por uma cópia no ribossomo. Três desses quatro rRNAs (18S, 5,8S e 28S) são sintetizados por meio de modificações químicas e clivagem de um único grande rRNA precursor. (BRUCE et al., 2017)

18S

O RNA ribossômico 18S é uma parte do RNA ribossômico e do RNA estrutural para o pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos. A subunidade ribossomal 18S é o RNA estrutural para um pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos e dentre as subunidades ribossomais é considerada a mais comum, sendo um dos componentes básicos de todas as células, além de compor uma porção da subunidade menor do ribossomo eucariótico codificado pelo gene 18S rRNA. Apresenta-se muito conservado e, portanto, mais apropriado para resoluções de filogenias de níveis taxonômicos superiores sendo um importante marcador para a PCR de alvo aleatório na triagem da biodiversidade ambiental. Esse gene possui informações que permitem avaliar relações entre organismos com tempos de divergência maiores que 100 milhões de anos. Sendo assim, rápidas radiações adaptativas, que ocorreram a um tempo inferior a 40 milhões de anos, geralmente, estão fora de seus limites de resolução (PHILIPPE et al., 1994).

Essa região é amplamente utilizada na análise molecular para reconstruir a história evolutiva dos organismos, especialmente em vertebrados e coccídios e também em estudos de diversidade biológica sendo provavelmente o gene mais frequentemente sequenciado em eucariotos (BARTA, 2001; VAN DE PEER; DE WACHTER, 1997).

28S

As técnicas moleculares, em que sequências únicas de DNA fornecem níveis extremamente elevados de especificidade para o diagnóstico e identificação das espécies e linhagens dos parasitos, proporcionam alta acurácia na detecção dos oocistos em amostras ambientais e clínicas, para definir a posição taxonômica das várias espécies de parasitos (HIGGINS et al., 2001; THOMPSON e CHALMERS, 2002), são de grande utilidade e possuem ampla aplicação na área da parasitologia, no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, em particular na taxonomia, evolução biológica, genética de populações, epidemiologia e interações com seus hospedeiros (JEX et al., 2008; FAYER et al., 2010), para a identificação e vigilância de agentes infecciosos em tecidos e secreções e na determinação das fontes de infecção, principalmente pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (THOMPSON et al., 1998; MORGAN et al., 2000), sendo utilizadas pela sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez (SINGH, 1997).

ITS

Os ITS são regiões transcritas que apresentam como padrão tamanhos geralmente pequenos, porém não traduzidas dos genes do rRNA, rodeadas por segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR são direcionados e demonstram uma ampla variabilidade. (CUPOLILO et al., 1995; DÁVILA; MOMEN, 2000). Enquanto a sequência do gene do rRNA apresenta variações muito lentamente devido a pressão seletiva, em geral por inserções, deleções ou mutações, as regiões ITS que separam o rRNA 18S do rRNA 5,8S (ITS-1) e o rRNA 5,8S do rRNA 28S (ITS-2) são muito mais variáveis tanto em tamanho como em sequência. A conservação dos genes de rRNA e das sequências ITS parece variar dependendo do organismo (DÁVILA 2002). Diferentemente dos NTS, os ITS são relativamente pequenos (aproximadamente 1kb em *Leishmania sp* e 1.0 a 1.2kb em *Trypanosoma cruzi*) e rodeados por

segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR são direcionados (CUPOLILO et al., 1995; MCLAUGHLIN et al., 1996; FERNANDES et al., 1999; DÁVILA & MOMEN, 2000).

Nem os ITS, nem os NTS são conservados, podendo variar em comprimento e/ou sequência dentro de uma mesma espécie, sendo, portanto, utilizadas como ferramentas moleculares na classificação dos parasitas (PULIDO et al., 1996). Existem também exemplos de conjuntos distintos de genes do rRNA existindo num mesmo organismo (CUPOLILO et al., 1995).

Gene Mitocondrial

COI

O DNA mitocondrial (mtDNA) é pequeno e circular e está presente em grandes quantidades nas células. O genoma mitocondrial é composto por 37 genes que participam do processo de respiração aeróbica, 13 genes codificantes de proteínas, 22 de RNAs transportadores e 2 de RNAs ribossomais (SIMON et al., 1994). Características adicionais como quantitativo elevado de cópias por célula, aparente ausência de íntrons e de recombinação, herança uniparental, genes com taxas evolutivas diferentes e taxas mutacionais, comumente, superiores às de genes nucleares, são responsáveis por tornar os genes mitocondriais marcadores mais comumente utilizados (SATTA et al., 1987; GOTO; KIMURA, 2001; ROKAS et al., 2003).

Os genes de RNAs transportadores (tRNA) apresentam taxas evolutivas menores que os genes codificadores (Simon et al., 1994), enquanto os genes ribossomais (rRNA) apresentam grande variação evolutiva ao longo da molécula e ocorrência de *indels*, variações de comprimento geradas pela inserção ou perda total ou parcial de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA (BUCKLIN et al., 2011) que podem interferir nas análises.

Entre os genes codificantes o COI se apresenta mais conservado em relação as taxas evolutivas a nível de aminoácidos (SIMON et al., 1994), possuindo também um sinal filogenético considerável sobre uma grande variação de níveis taxonômicos (BUCKLIN et al., 2011).

Alguns grupos de espécies apresentam baixa taxa de evolução no gene COI, muitas vezes com valores de divergência genética tão baixos que impedem sua discriminação (STOECKLE et al., 2005; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009) e se sabe que a taxa de evolução do gene COI varia entre grupos e até mesmo entre espécies (WARD et al., 2009).

Para Ogedengbe et al., (2011); Kvicerová; Hypsa (2013) e Genovez-Oliveira (2022), o uso do gene 18S para diferenciação de espécies e detecção de eventos evolutivos recentes, avaliando a diversidade de espécies dentro de Eimeriidae, tem se mostrado inadequado, enquanto o gene COI tem sido considerado o mais adequado nesse sentido.

Existem grupos de espécies que evoluíram recentemente e que, embora possam possuir taxas de evolução para o gene COI semelhantes às encontradas para as espécies com boa resolução em sua separação, não podem ser prontamente identificadas pela metodologia do DNA barcode, por não terem tido tempo suficiente para acumular o número de mutações no gene COI necessário para se proceder a identificação (FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009).

Para a resolução de ambos esses casos (baixa taxa de evolução do gene COI e radiação recente) é sugerido o uso de regiões do DNA que evoluem mais rapidamente e/ou o uso combinado de genes que apresentam boa resolução para a identificação desses táxons (KRESS; ERICKSON, 2007; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009).

Existem sequências COI insuficientes de espécies de *Isospora* de aves publicadas em

bancos de dados de sequências genéticas para determinar diferenças genéticas inter e intraespecíficas em *Isospora* spp. (BERTO et al., 2023).

O gene da subunidade I (COI) da citocromo c oxidase mitocondrial demonstrou ser um marcador confiável para avaliar a diversidade de espécies dentro de Eimeriidae (KUBISK et al., 2022).

Kubisk et al. (2022) propuseram uma taxonomia integradora, uma vez que o delineamento não seja claro para o gene COI, complementando com análises genéticas, morfológicas, biológicas e ultraestruturais combinadas para identificar as espécies de *Isospora*, por exemplo.

DNA Barcoding

Hebert et al. (2003) por meio da utilização de um fragmento da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) de aproximadamente 650 pb, propuseram um padrão para diferenciar a grande maioria, das espécies animais, devido à diversos estudos já realizados com o mesmo segmento, pelos conjuntos robustos de *primers* universais para esta região para a maioria dos filos animais, pelo fato desse gene apresentar um aparente melhor sinal filogenético, possuir uma alta taxa de mutação e por demonstrar maior eficácia na atribuição de indivíduos à categorias taxonômicas elevadas (filos, ordens) por meio da análise das substituições de aminoácidos o qual denominaram *DNA Barcoding*, em analogia ao sistema de identificação de produtos por códigos de barras.

A utilização de DNA barcoding (código-de-barras de DNA) como método para a identificação de organismos completou duas décadas de utilização em 2023, e a implementação e o desenvolvimento das técnicas de DNA barcoding têm mobilizado alguns grupos internacionais de cooperação, principalmente o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) e o *International Barcode of Life* (iBOL), que procuram estimular a pesquisa científica nesta área. Essa abordagem vem se tornando cada vez mais popular (KRESS; ERICKSON, 2007).

Essa metodologia é extremamente útil para avaliar o contexto taxonômico baseado em caracteres morfológicos onde os resultados fornecidos por estudos de DNA barcoding podem contribuir na formulação (e reformulação) de hipóteses filogenéticas, de sistemas de classificação e também de limites taxonômicos (SEBERG et al., 2003; STACE, 2005). Segundo Li et al. (2011) os benefícios do uso de DNA barcoding vão além de sua mera utilização para a resolução de problemas de identificação de espécies no contexto taxonômico. Essa técnica se aplica a qualquer situação que se beneficie de um processo rápido e eficiente de identificação de espécies, incluindo a avaliação da biodiversidade (PARMENTIER et al., 2013).

Análises de sequência de DNA: Sequenciamento genético

O sequenciamento genético objetiva a determinação da ordem exata dos nucleotídeos de um determinado segmento de DNA, sendo utilizado principalmente no diagnóstico de espécies infecciosas (SMITH; NICHOLS, 2010). As amostras, já submetidas a PCR, deverão sofrer purificação antes de iniciar as etapas de sequenciamento, pois com a remoção dos dNTPs e iniciadores que restaram das reações anteriores ocorre a diminuição da interferência nas reações seguintes (SAMBROOK et al., 2001). As amostras serão submetidas novamente a uma PCR (Nested-PCR), com formulação específica, sendo que os iniciadores são utilizados em reações independentes para que as duas sequências obtidas possam ser posteriormente alinhadas, pois são complementares, otimizando dessa forma a acurácia do resultado final (SAMBROOK et al., 2001). A sequência obtida será submetida ao GenBank (*Genetic Sequence Data Bank*) pelo BLAST e a identificação da espécie em questão é realizada em segundos (ALTSCHUL et al., 1997).

Análise filogenética

A análise filogenética estima a relação entre os genes ou fragmentos de genes inferindo sua história comum, se caracterizando como uma ferramenta essencial em um número crescente de áreas de pesquisa, para a análise exploratória de sequências de DNA e proteínas, sendo capazes de mostrar o caminho evolutivo e epidemiológico de agentes etiológicos de doenças e/ou o caminho evolutivo de seus hospedeiros. (CALDART et al., 2016).

Uma árvore filogenética, representa as relações ancestral-descendente entre organismos ou sequências genéticas e deve ser considerada como uma hipótese de um relacionamento evolutivo entre um grupo de organismos. No caso da filogenia molecular, as sequências de nucleotídeos ou proteínas estão nas pontas (*tips*) das árvores, enquanto os ramos (*branch*) conectam as sequências aos seus ancestrais. (HOLDER M.& LEWIS, 2003).

Para Oliveira, (2011) um dos grandes desafios na análise filogenética é a obtenção de resultados acurados e dentre os fatores mais importantes para uma reconstrução filogenética acurada estão o número de genes amostrados, a amostragem de taxa, e o método de reconstrução utilizado.

Os métodos filogenéticos bayesianos revolucionaram a forma de análise dados de sequências genômica. Como exemplo podemos citar a análise filogeográfica da disseminação de vírus em humanos, inferência de história filogeográfica e migração entre espécies, análise de taxas de diversificação de espécies, estimativa de tempo de divergência e inferência de relações filogenéticas entre espécies ou populações. A popularidade dos métodos bayesianos se popularizou por razão do desenvolvimento de poderosos modelos de análise de dados e pela disponibilidade de programas de computador de fácil utilização para a aplicação dos modelos. (WILFERT, 2016).

A filogenia molecular dos coccídios tem sido objeto de diversos estudos (CAVALIER-SMITH, 1983, 1993; TENTER et al., 2002).

Identificação molecular de coccídios na atualidade

Isoospora butcheriae descrita por Yang et al. (2018) e caracterizada molecularmente no RNA ribossômico 18S, 28S e no gene mitocondrial do citocromo oxidase (COI). No *locus* 18S, com base na sequência de 1210 pb, exibiu 99,9; 99,8; 99,7 e 99,5% de similaridade com *Isoospora* sp. MAH-2013a (KF648870) de *Lamprolornis superbus* no Canadá, *Isoospora* sp. MS-2003 (AY33157) de *Ploceopasser mahali* na América, *Isoospora* sp. Tóquio (AB75786) do Japão. Em uma análise adicional de um subgrupo de sequências 18S de 300 pb de comprimento, incluindo *I. anthochaerae* e os outros três *Isoospora* de aves da Austrália Ocidental, revelou que *I. butcheriae* apresentou 98,3% de similaridade tanto com *Isoospora* sp. MAH-2013a (KF648870) e *I. MS-2003* (AY33171). No *locus* 28S, apresentou 97,3% de similaridade com *Isoospora* sp. MS-2003 de *Melospiza crissalis*. No *locus* COI, exibiu 99,8% de similaridade com *I. neochmiae*.

Isoospora sepetibensis foi o primeiro parasita coccidiano de um Traupídeo do Novo Mundo a ter sua sequência *cox1* de 215 pb de comprimento depositada no banco de dados do GenBank. (GENOVEZ-OLIVEIRA et al., 2019).

Eimeria columbinae foi identificada molecularmente por Ortúzar-Ferreira, et al. (2020), através do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e pelo gene 18S pequena subunidade ribossomal RNA (18S) do hospedeiro *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809), na região do Médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Sendo a única espécie dentro da ordem Columbiformes com sequência de COI depositada no GenBank, teve sua

análise filogenética baseada no gene COI, ficando próxima a um clado com similaridade de 98,5% com um *Isospora* sp. recuperado *Plectrophenax nivalis* (Linnaeus, 1758) na República Tcheca (TREFANCOVÁ et al. 2019). Outras *Isospora* spp. de aves do Velho Mundo, mas também do Novo Mundo, como *Isospora sporophilae* de *Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869) no Brasil (RODRIGUES et al. 2018), se apresentaram em clados vizinhos. A similaridade em comparação com *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016) foi de 95%.

Na análise filogenética baseada no 18S, *E. columbinae* apresentou-se em um clado composto por todos os coccídios de Columbiformes depositados no GenBank, com similaridade de 100% com *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016). Clados vizinhos foram compostos por *Eimeria* spp. de aves não columbiformes, como papagaios, perus e galinhas, com similaridade de aproximadamente 99,5%; e por *Cyclospora* spp. e *Eimeria* spp. de mamíferos, como primatas, morcegos, roedores e ruminantes, com uma similaridade de aproximadamente 99,3%.

Esta similaridade de 100% entre *E. columbinae* e *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016), de hospedeiros relativamente distantes, deixou evidente que o gene 18S é excessivamente conservado, pelo menos na parte amplificada, sendo potencialmente adequado para estudos filogenéticos de táxons superiores, mas inadequado para diferenciação e identificação em nível de espécie. Foi observada também a diferença de apenas duas substituições de nucleotídeos *E. columbinae* e *Eimeria* spp. de perus e papagaios, que são espécies filogeneticamente muito distantes.

Ortúzar-Ferreira, et al. (2020), descreveram e identificaram molecularmente *Isospora oliveirai*, através da amplificação do DNA do oocisto que mostrou uma banda clara de c.250 pb. A análise filogenética incluiu 23 sequências para *Isospora* spp. *Isospora oliveirai* apresentou-se separadamente no cladograma e teve a maior similaridade de 97% com *Isospora serinuse* dos canários das ilhas canárias (Linnaeus, 1758) e *Isospora* spp. de *Parus major* e *Erithacus rubecula*.

A análise filogenética não colocou *I. oliveirai* em nenhum monofiletismo; pelo contrário, foi separado de um grande clado contendo vários *Isospora* spp. de Passeriformes. Esse resultado pode ser explicado pelas grandes semelhanças entre esses *Isospora* spp. neste grande clado, que variam entre 98 e 100%, enquanto *I. oliveirai* diferiu destes *Isospora* spp. em mais de 3%. De qualquer forma, a principal inconsistência na filogenia estava na comparação com *I. lopesi*, que é a única a ser classificada na mesma parvordem (Tyrannida) que *I. oliveirai* entre as espécies de coccídeos que possuem sequências de COI depositadas no Genbank; no entanto, teve uma baixa similaridade com *I. oliveirai* de apenas 95% e situa-se em um clado distante com outras espécies de coccídeos relatadas na Subordem Tyranni (suboscines). Assim, estes resultados não são conclusivos para estabelecer a filogenia de *I. oliveirai* e outros *Isospora* spp. de Passeriformes; no entanto, estes devem ser mais elucidativos, pois mais *Isospora* spp. são sequenciados para o gene COI e depositados no Genbank. Ortúzar-Ferreira, et. al, (2020).

Isospora phylidonyrisae descrita por (YANG et al., 2021), através da caracterização molecular realizada no RNA ribossômico 18S e 28S e nos loci mitocondriais (mt) citocromo oxidase (COI). A sequência do rRNA 28S foi a mais semelhante a *Isospora anthochaerae* (KF766053) e *Isospora manorinae* (KT224381), ambas com 98,2% de similaridade genética. A análise filogenética das sequências genômicas 18S e mt COI indicou que *Isospora phylidonyrisae* foi geneticamente similar a *Isospora coronoideae*, isolada de *Corvus coronoideae* na Austrália Ocidental, com 99,3% e 98,4% de homologia, respectivamente.

Isospora lugensae, descrita por (Yang et. al, 2021), através da análise do genoma mitocondrial completo (mtDNA), revelou 3 genes codificadores de proteínas (CytB, COI e COIII), 18 LSU e 14 fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU), sem genes de RNA de transferência, com um comprimento total de 6257 pb. A análise filogenética das sequências ribossômicas genômicas de SSU indicou que *Isospora lugensae* foi geneticamente semelhante a *Eimeria reichenowi*, isolada de *Grus japonensis* do Japão, com 96,6% de homologia. A

sequência do mtDNA é mais semelhante à *Isospora serinuse* com uma similaridade genética de 95,8%.

Isospora ferox redescrita molecularmente por (ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2021), forneceu uma caracterização genotípica preliminar por meio do sequenciamento do citocromo c mitocondrial gene da subunidade 1 da oxidase (COI). A amplificação do DNA do oocisto de *I. ferox* mostrou uma banda clara de c. 250 pb. A análise filogenética incluiu 20 sequências de *Isospora* spp. *Isospora ferox* teve as maiores semelhanças de 97% com *Isospora massardi* de *Turdus flavipes* (Vieillot) e *Isospora manorinae* de *Manorina flavigula* (Gould).

Isospora leptopogoni descrita por MELO et al. (2022), através da identificação molecular por meio do sequenciamento do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial. A análise filogenética colocou *I. leptopogoni* próximo a outras *Isosporas* spp. registradas de hospedeiros filogeneticamente relacionados e da mesma região biogeográfica.

Isospora basileuterusi descrita por MELLO et al. (2022), após análise molecular do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (cox 1), revelou uma similaridade de 99,5% com *Isospora serinuse* de canários insulares *Serinus canaria*, da Austrália Ocidental.

OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo maior identificar geneticamente coccídios parasitas de algumas aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. Os objetivos específicos são:

- (1) Isolar oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres, os quais tenham sido previamente identificados morfologicamente;
- (2) Extrair o DNA e amplificar e sequenciar diferentes regiões gênicas de genes mitocondriais;
- (3) Avaliar a aplicabilidade destas novas sequências na diferenciação de espécies e estudos filogenéticos.

No cumprimento destes objetivos, esta tese apresentou uma revisão da literatura científica no tema de identificação molecular de coccídios de aves silvestres, e nos capítulos I, II, III e IV os resultados de identificação molecular, incluindo novas regiões gênicas, de quatro espécies coccidianas, os quais correspondem a quatro artigos publicados em periódicos científicos internacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, K. L.; PALMER, J. D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29: 380-395. 2003.
- ALANAZI, A. D.; ALYOUSIF, M. S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in Riyadh Province, Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 943- 945, 2011.
- ALBERTS, B.; JHONSON A.; JULIAN L.; MORGAN D., RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P.; WILSON J.; HUNT T.; BRED A. E.; CRISTIANO A.; BIZARRO V.; RENARD G. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: **Artmed**, 2010, 1396 p.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389- 3402, 1997.
- ANDERSSON, S.G.E., KARLBERG, O., CANBÄCK, B.; KURLAND, C.G. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 358: 165-179. 2003.
- ANDRADE, L.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.; MELLO E. R.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA A. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P. Observations on an *Eimeria* sp. (Apicomplexa) from the green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) in Southeastern Brazil: an example of how the ecological aspects of the host can be essential for the identification of its coccidians. **Parasitology Research** 121, 1059–1063, 2022.
- ARISUE N, HASHIMOTO T. Phylogeny e evolução de apicoplasts e parasitas apicomplexan. **Parasitology International**. 2015; 64:254–9.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. vb: Chapman; Hall, 1994.
- AXIMOFF, I.; RODRIGUES, R. C. Histórico dos incêndios florestais no Parque Nacional do Itatiaia. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 83-92, 2011.
- BARTA J.R Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites Vet. Parasitol., 101 (2001), pp. 175-186
- BARTA J.R., SCHRENZEL MD, RIDEOUT BA (2005) The Genus *Atoxoplasma* as a Junior Objective Synonym of the Genus *Isospora* Species Infecting Birds and Resurrection of *Cystoisospora* as the Correct Genus for *Isospora* Species Infecting Mammals. **Journal Parasitology** 91:726–727. <https://doi.org/10.1645/GE-3341.1>
- BARTA J.R., OGEDENGBE J.D., MARTIN D.S., SMITH T.G. Phylogenetic position of the adeleoriniocidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal Eukaryot Microbiologic** 2012; 59(2): 171-180. PMID:22313415. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x)
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene**, Huntington, v. 93, n. 2, p. 317–23, 1984.
- BELLI S. I., SMITH N. C.; FERGUSON D.J.P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! **Trends Parasitol.** 22:416-423. 2006.

BENELLI, G., CASELLI, A., DI GIUSEPPE, G., CANALE, A. Control of biting lice, Mallophaga - a review. **Acta tropica**, v. 177, p. 211-219, 2017.

BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Three New Coccidian Parasites of Brazilian Tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) from South America. **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 77-81, 2008a.

BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Two New Coccidian Parasites of Green-Winged Saltator (*Saltator similis*) from South America. **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 263-267, 2008b.

BERTO B. P.; LUZ H. B.; FLAUSINO W.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, v. 74, p. 75-80, 2009a.

BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 301-304, 2009b.

BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buffyfronted seedeater *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Passeriformes: Emberizidae) from South America. **Systematic Parasitology**, v. 73, p. 65-69, 2009c.

BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. Two new *Isospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. **Parasitology Research**, v. 105, p. 635-639, 2009d.

BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L.M.C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. New isosporoid coccidian parasites of sayaca tanager, *Thraupis sayaca*, from South America. **Acta Parasitologica**, v. 54 (n. 2): 90-94, 2009e.

BERTO, B. P. Morfologia e sistemática de coccídios (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de aves Passeriformes da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. 2010. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, 2010.

BERTO B. P, FLAUSINO W, MCINTOSH D, TEIXEIRA- FILHO W. L, LOPES C. W. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic parasitology**, 80, 159-204, 2010.

BERTO B. P., FLAUSINO W., MCINTOSH D., TEIXEIRA-FILHO W. L.; LOPES C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology** 80:159-204, 2011.

BERTO B. P.; MCINTOSH D.; LOPES C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** v. 23, p. 1-15, 2014.

BERTO. B. P.; LUZ.H.R.; Parasitas de Aves Silvestres do Parque Nacional do Itatiaia. Ministério do Meio Ambiente **ICMBio**, PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA BOLETIM, Nº 25, 2016.

BERTO, B. P., MACHADO, E. L., HOSSOTANI, C. M.. Taxonomia integrativa para os

coccídeos tradicionais (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de canários insulares (Aves: Passeriformes: Fringillidae): Distribuição mundial, caracterização morfológica e molecular, reavaliações e estabelecimento de sinônimos juniores. **Syst Parasitology**. 2023.

BOWMAN D. D.G. Parasitologia Veterinária. **Elsevier**. Rio de Janeiro, cap. 3, p. 95- 96, 2010.

BRAGA E. F.; BRAGA E.; BRAGA, K. L. M.; BRAGA, A.I.S. Diagnóstico sorológico de toxoplasma gondii através do teste da hemaglutinação indireta em ovinos criados em dois municípios do nordeste paraense. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 1- 19, 2011.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA Barcoding of Marine Metazoa. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, p. 471-508, 2011.

BULLERWELL, C.E.; GRAY, M.W. Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Current Opinion in Microbiology* 7: 528- 534. 2004.

CALDART E. T., MATA H., CANAL C. W.; RAVAZZOLO A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1392. 2016.

CASAS, M.C.; DUSZYNSKI, D.W.; ZALLES, L.M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 247-251, 1995.

CANNING E. U.; ANWAR M. Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites. **Journal Protozoology** 15, 290-8, 1968.

CHERVONEVA, I.; LI, Y.; SCHULZ, S. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 253, s/N, 2010.

CAI X.; FULLER A. L.; MCDUGALD L. R.; ZHU G. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. **Gene**. Dec 4; 321:39-46, 2003.

CALDART E. T.; MATA, H. C. W.; RAVAZZOLO A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1392, 2016.

CARRENO R. A.; BARTA J. R. An Eimeriid Origin of Isosporoid Coccidia with Stieda Bodies as Shown by Phylogenetic Analysis of Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences. **Journal Parasitology**. 85 :77–83, 1999.

CASLEY, D. Primer on molecular biology. Technical report, U. S. Department of Energy, **Office of Health and Environmental Research**. 1992.

COELHO C. D, BERTO B. P.; NEVES D. M.; OLIVEIRA V. M.; FLAUSINO W.; LOPES C. W. G. Two new Isospora species from the saffron finch, *Sicalis flaveola* in Brazil. **Acta Parasitol** 2011b; 56 (3): 239-244.

COELHO C. D.; BERTO B. P.; NEVES D.M.; OLIVEIRA V. M. D.; FLAUSINO W.; LOPES C. W. G. Oocyst shedding by green-winged-saltator (*Saltator similis*) in 12 Studies on oocysts the diagnostic of coccidiosis and *Isospora similis* (Apicomplexa: Eimeriidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 2013; 22(1): 64-70.

CORY S.; ADAMS J.M. A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes, **Cell**, 11, 795—805, 1977.

CBRO. Lista das aves do Brasil. Rio de Janeiro: **Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos**, 123 pp. 2021.

CHAPMAN H. D. e SHIRLEY M. W. The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. **Avian Pathology** 32, 115-27, 2003.

CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research: A review. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p.501-511, 26 fev. 2014.

CONDE M. M. S.; LIMA H. R. P.; PEIXOTO A. L. Aspectos florísticos e vegetais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: MENEZES, L. F. T., PEIXOTO, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. (Eds.). História Natural da Marambaia. Rio de Janeiro: **EDUR**, p. 133-168, 2005.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr. G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. - Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 73: 145 – 155, 1995.

CURRENT W. L.; UPTON S. J.; LONG P. L. Taxonomy and Life Cycles. In Coccidiosis of Man and Domestic Animals, (ed. P. L. Long), pp. 1-17. Boston: **CRC Press Inc.** 1990.

CURRENT W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY J. P.; SPEER C. A.; FAYER R. (Ed.). *Cryptosporidiosis of man and animals*. **Boca Raton: CRS**, 1990. p. 31-49.

DAUGSCHIES A, NAJDROWSKI M. Eimeriosis in cattle: current understanding. **Journal Veterinary Medicine B Infect Diseases Vet Public Health**. 2005 Dec;52(10):417-27.

DÁVILA, A.M.; MOMEN, H. - Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitology.*, 94: 651-654, 2000.

DE QUEIROZ K. Ernest Mayr and the modern concept of species. **PNAS**, v.102, p.6600-6607, 2005.

DE QUEIROZ K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879- 886, 2007.

DOBELL C. The Discovery of the Coccidia. *Parasitology*, 14 (3-3), 342-348. Doi: 10.1017/S0031182000010258, 1922.

DOGIEL V. A. **General parasitology**. Leningrad, Izdatielstvo Leningradskogo Univiersitieta, 1962.

DOLNIK O. V.; DOLNIK, V. R.; BAIRLEN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. **Ardea**. v. 98, n. 1, p. 97-103. 2010.

DORRESTEIN, G. M. Bacterial and parasitic diseases passerines. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 433-451, 2009.

DUBEY J. P.; MILLER N. L.; FRENKEL J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J Exp Med**. Oct 1;132(4):636-62, 1970.

DUBEY J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary parasitology**, v. 95, n. 2, p. 89-131, 2001.

DUBEY J. P.; SCHARES G. Neosporosis in animals the last five years.**Veterinary**

parasitology, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P. HOWE D. K.; FURR M.; SAVILLE W. J.; MARSH A. E.; REED S. M.; GRIGG M. E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, 2015.

DUSZYNSKI D. W.; SPEER C. A.; CHOBOTAR B.; MARCHIONDO A. A.; Finestructure of the oocyst wall and excystation of *Eimeria procyonis* from the American raccoon (*Procyon lotor*). **Zeitschrift fur Parasitenkunde- Parasitology Research** 65:131–136, 1981.

DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.

DUSZYNSKI D. W.; COUCH L.; UPTON S. J.. The coccidia of the world [disponível em <https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/>]. 1999.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 139-142, 1999.

EL-SHERRY S.; OGEDENGBE M. E.; HAFEEZ M. A.; BARTA J. R. Divergent nuclear 18S rDNA paralogs in a turkey coccidium, *Eimeria meleagridis*, complicate molecular systematics and identification. **International Journal Parasitology** 43:679–685, 2013.

EHRET T.; SPORK S.; DIETERICH C. Dual RNA-seq reveals no plastic transcriptional response of the coccidian parasite *Eimeria falciformis* to host immune defenses. **BMC Genomics** 18, 686, 2017.

ENTZERTH R.; SCHOLTYSECK E.; SEZEN I. Y. Fine structural study of *Eimeria truncata* from the domestic goose (*Anser anser* dom.). **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 66, p. 1–7, 1981.

ESCOBAR GRIMALDI, M. J.; LÓPEZ RIVAS, A. J.; RAMÍREZ LÓPEZ, P. E. (2010) Determinación de fuentes de transmisión de coccidiosis (*Eimeria* spp) en aves de la línea hy line brown desarrolladas en jaula en dos granjas de El Paisnal, Departamento de San Salvador, El Salvador. Bachelor thesis, **Universidad de El Salvador**.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J.; WALKER, J. H.. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 3–4, p. 187–192, 2010.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; JANSEN, A.M.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B.; COURA, JR. - Populational heterogeneity of brazilian *Trypanosoma cruzi* Isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94: 195 – 197, 1999.

FERNANDEZ S.; PAGOTTO A. H.; FURTADO M. M.; KATSUYAMA A. M.; MADEIRA A. M.; GRUBER A. A. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. **Parasitology** 127(Pt 4):317–325. 2003.

FERREIRA, F. S.; BRITO S. V.; RIBEIRO S. C.; SALES D. L.; ALMEIDA W. O. A zoologia

e a botânica do ensino médio sob uma perspectiva evolutiva: uma alternativa de ensino para o estudo da biodiversidade. **Cadernos de cultura e ciência**, v. 2, n. 1, p. 60-66, 2009.

FRÉZAL, L. E.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C.; Intestinal coccidiosis in: FRIEND, M.; FRANSON, J. C. Field manual of wildlife diseases: general field and procedures and diseases of birds. Washington, **Biological Resources Division**. v. 26, p. 207-213, 1999.

GARCIA, F. G. Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e receptores Toll envolvidos na resposta imunológica in vitro à *Cystoisospora belli*. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

GARCIA L. S.; SHIMIZU R. Y. Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**. Jun;35(6):1526-9, 1997.

GENOVEZ-OLIVEIRA, J.; CARDOZO, S.; OLIVEIRA, Á.; LIMA, V.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. Morphological and Molecular Identification of *Isoospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a New Host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoniinae) in South America. **Acta Protozoologica**. 58. 2019.

Genovez-Oliveira J. L.; Oliveira M. S.; Thode-Filho S.; Cardozo S. V.; Oliveira Á. A.; Lima V. M.; Ferreira I.; Berto B. P. Identificação morfológica e molecular de *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, *Ferreira*; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de tordos *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) na América do Sul. **Parasitology Internacional** 75:102040. 2020.

GOTO, S. G.; KIMURA, M. T. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 18, n. 3, p. 404-422, 2001.

GUEVARA, P.; ALONSO, G.; DA SILVEIRA, J.F.; DE MELLO, M.; SCORZA, J.V.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J.L. - Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. **Molecular Biochemical Parasitology**, 56(1):15-26, 1992.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Mar. Biology**, v.137, p.435-446, 2000.

GRECA, M. P. S. Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos de Curitiba em região metropolitana. Dissertação (Mestrado- Microbiologia, Parasitologia e Patologia). **Universidade Federal do Paraná**, 2010.

GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau domestique; multiplicité des especes. **Annales de Parasitologie humaine et Comparée**, v. 57, p. 209 - 233, 1982.

HAFEEZ MA, StÁsiak I, Delnatte P, El-Sherry S, Smith DA, Barta JR. Description of two new *Isoospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Parasitology Resources**. 2014 Sep;113(9):3287-97. doi: 10.1007/s00436-014-3992-8. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24948107.

HAFEEZ M. A.; BARTA J. R.; The complete mitochondrial genome sequences of two *Isoospora* species (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing coccidiosis in superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Mitochondrial DNA B. Resources** . Nov 27;2(2):895-896, 2017.

- HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related Genera. London: **University Park Press**, 482 p, pp 151–154, 1973.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 270, p. S596-S599, 2003.
- HAJIBABAEI M.; SINGER G. A. C.; CLARE E. L.; HEBERT P. D. N.; Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biology**. 5:24, p.1-15, 2007.
- HAUG A.; THEBO P.; MATTSSON J. G.; A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. **Veterinary Parasitology** 146(1–2):35–45, 2007.
- HAWKINS, B. A.; FIELD R.; CORNELL H. V.; CURRIE D. J.; GUÉGAN J.; KAUFMAN, D. M.; KERR, J. T.; MITTELBAACH G. G.; OBERDORFF T., O'BRIEN E.M.; PORTER, E. E.; TURNER, J. R. G. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. **Ecology**, 84: 3105-3117, 2003.
- HIKOSAKA K.; WATANABE Y.; TSUJI N.; KITA K.; KISHINE H.; ARISUE N.; PALACPAC N. M.; KAWAZU S.; SAWAI H.; HORII T.; IGARASHI I.; TANABE K.. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Molecular Biology and Evolution** May; 27(5):1107-16, 2010a.
- HIKOSAKA K, NAKAI Y, WATANABE YI, TACHIBANA SI, ARISUE N, PALACPAC NM, TOYAMA T, HONMA H, HORII T, KITA K, TANABE K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Mitochondrion**, 2010b.
- JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 4, p. 304-317, 2008.
- JINNEMAN K. C.; WETHERINGTON J. H.; HILL W. E.; ADAMS A. M.; JOHNSON J. M.; TENGE B. J.; DANG N. L.; MANGER R. L.; WEKELL M. M. Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. oocysts directly from raspberries. **Journal of Food Protection** 61(11):1497–1503, 1998.
- JIRKU, M.; MODRY D.; SLAPETA, J.R.; KOUDELA B.; LUKES, J. The Phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the Evolution of Excystation Structures in Coccidia. **Protist**, v. 153, p. 379-390, 2002.
- KALANON M, MCFADDEN GI. Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. **Biochemical Society Transactions**. 2010 Jun;38(3):775-82.
- KAMAU, E. et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.
- KARAMANOU M.; POULAKOU-REBELAKOU E.; TZETIS M.; ANDROUTSOS G. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. **Rev. Argent. Microbiology**. Oct-Dec;42(4):311-4, 2010.
- KAWAHARA F, ZHANG G, MINGALA CN, TAMURA Y, KOIWA M, ONUMA M, NUNOYA T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. **Vet. Parasitol.** Nov 24;174(1-2):49- 57, 2010.

- KAYA G.; DALE C.; MAUDLIN I.; MORGAN K. A novel procedure for total nucleic acid extraction from small numbers of *Eimeria* species oocysts. **Türkiye Parazitoloji Dergisi** 31(3):180–183, 2007.
- KNIGHT, A.; EWEN J. G; BREKKE P.; SANTURE A. W. The evolutionary biology, ecology and epidemiology of coccidia of passerine birds. **Advances in Parasitology**, v. 99 p. 35-60, 2018.
- KRESS, W.J.; ERICKSON, D.L. A two-locus globalDNAbarcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnHpsbA* spacer region. **Plos One**, v. 2, n, 6, p. e508, 2007.
- KUBISKI S. V., WITTE C., BURCHELL J. A., CONRADSON D., ZMUDA A., BARBON A. R., VILCHES-MOURE J. G., FELT S. A., RIDEOUT B.A. Mitochondrial Gene Diversity and Host Specificity of *Isospora* in Passerine Birds. **Frontiers in Veterinary Science**. 2022
- KVIČEROVÁ J, HYPŠA V. A. Incongruências hospedeiro-parasita no roedor, *Eimeria* sugerem um papel significativo da adaptação em vez da cofilogenia na manutenção da especificidade do hospedeiro. **Plos One**. 2013.
- LASERNA-MENDIETA E. J.; SALVADOR-MARTÍN S.; ARIAS A.; LÓPEZ-CAUCE B.; MARÍN-JIMÉNEZ I.; MENCHÉN L. A.; MARÍN-RUBIO L.; ONTAÑÓN Rodríguez J.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ L. A.; LUCENDO A. J.; Single nucleotide polymorphisms in ADAM17, IL23R and SLCO1C1 genes protect against infliximab failure in adults with Crohn's disease. **Biomedicine; Pharmacother**. 2023
- LEVINE, N. D. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 719 e 723, 1982.
- LEVINE N.D. **Veterinary protozoology**. Ames, Iowa State University Press. 414p, 1985.
- LI D. Z., GAO L. M., LI H. T., WANG H., GE X. J., LIU J.Q., CHEN Z.D., ZHOU S.L., CHEN S. L., YANG J. B., FU C. X., ZENG C. X., YAN H. F., ZHU Y. J., SUN Y. S., CHEN S.Y., ZHAO L., WANG K., YANG T., DUAN G. W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 108, 19641–19646. 2011.
- LINNAEUS C. **Systema naturae**. Holmiae (Laurentii Salvii): Stockholm, 1758.
- LINDSAY D. S.; DUBEY J. P.; BLAGBURN B. L.; Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. **Clinical Microbiology Rev**. 1997 Jan;10(1):19-34. 1997.
- LING K. H.; RAJANDREAM, M. A.; RIVAILLER, P.; IVENS, A.; YAP, S. J.; MADEIRA, A. M.; MUNGALL, K.; BILLINGTON, K.; YEE, W. Y.; BANKIER, A. T. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. **Genome Research** 17, 311-9. 2007.
- LIPSCOMB D.; PLATNICK N.; WHEELER Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends Ecology. Evol.**, v. 18, p. 65–66, 2003.
- LOYFER N.; MAGENHEIM J.; PERETZ A.; CANN G.; BREDNO J.; KLOCHENDLER A.; FOX-FISHER I.; SHABI-PORAT S.; HECHT M.; PELET T.; et al. A DNA methylation atlas of normal human cell types. **Nature**. 613:355–364. 2023.

- LONG P. I. The biology of the coccidia. **Edward Arnold Publishers**, London, 1982.
- LONG P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. **The Journal of Protozoology**, 31 (4), 535–541. 1984.
- LOURENÇO, E. C.; COSTA, L. M.; SILVA, R. M.; ESBÉRARD, C. E. L. Bat diversity of Ilha da Marambaia, Southern Rio de Janeiro State, Brazil (Chiroptera, Mammalia). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 511-519, 2010.
- LOPES, B. B. Coccídios como biomarcadores de impacto ambiental em Passeriformes na Ilha da Marambaia e no Parque Nacional do Itatiaia, RJ. 2018. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2018.
- MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 147, n. 5, p. 824–828, 1983.
- MANWELL, C.; BAKER, C.M.A. A sibling species of seacucumber discovered by starch-gel electrophoresis. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 10, p. 39-53, 1963.
- MARQUARDT W. C. Host and site specificity in the Coccidia: A perspective. **The Journal of Protozoology**, 28 (2), 243–244. 1981.
- MARQUES, T.; OLIVEIRA, E. F.; MORAIS, A. C. S.; CARVALHO, L. E. F. Avaliação do grau de assimetria em três espécies de aves da família Columbidae na ESEC-SERIDÓ, Nordeste do Brasil. Curso de Campo Ecologia da Caatinga, **PPG Ecologia**, UFRN, p. 67-71, 2011.
- MARONEZI, C.; OLIVEIRA M.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; MELLO E. R.; CEPEDA P. B.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; BERTO P. B. *Isospora* spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny ; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. **Systematic Parasitology**. 99, 285–297, 2022.
- MARTÍNEZ C. M. A.; SÁENZ G. I. S.; BERTO B. P., ÁVILA, Z. D. E.; RAMÍREZ A. R.; CISNEROS, V. K. W.; RAMOS, Z. J. J. Identificación de especies de *Eimeria* presents en caprinos (*Capra aegagrus hircus*) en Nuevo León, México. **Revista MVZ Córdoba**, 27(s), e2560-e2560, 2022.
- MATIOLI S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Matioli, S.R.; Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 181–190. 2012.
- MACPHERSON J. M.; GAJADHAR A. A. Differentiation of seven *Eimeria* species by random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Parasitology** 45(3– 4):257–266. 1993.
- MASSEY, J. G. Diseases and medical management of wild Passeriformes. Seminars in Avian and Exotic. **Pet Medicine**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2003.
- MCDUGALD L. R.; REID, W. M. Cocciosis. In **Diseases of Poultry**, (ed. B. W. Calnek), pp. 929. Ames: Iowa State University Press. 1995.
- MCLAUGHLIN, G.L.; SSENKONGA, S.S.; NANTEZA, E.; RUBAIRE-AKIKI, WAFULA, O.; HANSEN, R.D.; VODKIN, M.H.; NOVAK, R.J.; GORDON, V.R.; MONTENEGROJAMES, S.; JAMES, M.; AVILES, H.; ARMIJOS, R.; SANTRICH, C.; WEIGLE, K.; SARAVIA, N.; WOZNIAC, E.; GAYE, O.; MDACHI, R.; SHAPIRO, S.Z.

CHANG, K.P.; KAKOMA, I. PCR-based detection and typing of parasites. In: AZCEL, M.A.; ALKAN, M.Z. Parasitology for the 21st Century. Chapter 25. **CAB International**. Wallingford Oxon; 1996.

MEIRA, J. A.; CORRÊA M.O. A. Isosporose humana. Considerações sobre 28 casos. **Revista Internacional Adolfo Lutz** (São Paulo), 10 (número único): 117-139, 1950.

MEYER de SCHAUENSEE, R. A guide to the birds of South America. Philadelphia: **Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 1982. Reimpressão de 1970.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.

MELO, J. O.; ANDRADE, L. A. S.; MARONEZI, C.; MELLO E. R.; OLIVEIRA M. S.; CARDOZO S. V.; FRANCO H. A.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; BERTO B. P. *Isospora leptopogoni* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sepia-capped flycatcher *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 (Passeriformes: Rhynchocyclidae) in South America. **Systematic Parasitology** 99, 525–534, 2022.

MELLO ER, OLIVEIRA MS, ANDRADE LAS, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, BERTO BP. *Isospora basileuterusi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America. **Curr Research in Parasitology & Vector-borne Diseases**. 2022 Jan 31;2:100079. doi: 10.1016/j.crvbd.2022.100079. PMID: 36589869; PMCID: PMC9795353.

MENEZES, L. F. T.; ARAUJO, D. S. D. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da restinga de Marambaia, RJ. **Acta Botanica Brasilica**, 13(Acta Bot. Bras., 13(2)), 223–235, 1999.

MIGUEL-OTEO M.; JIRAM A. I.; TA-TANG TH.; LANZA M.; HISAM S.; RUBIO J. M.; Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. Mar;10(3):299-304. Mar 7. PMID: 28442114. 2017.

MORGAN, U.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R.C.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virusinfected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1180–1183, 2000.

MORRISON, David A., et al. "The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa)." **International Journal for Parasitology** 34.4 (2004): 501-514.

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.402-407, 2002.

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p. 995–998, 1998.

MORGAN J.A.T.; Morris G.M.; Wlodek B.M.; Byrnes R.; Jenner M.; Constantinoiu C.C.; ANDERSON G.R.; LEW-TABOR A. E.; MOLLOY J. B., GASSER R. B.; JORGENSEN W. K.; Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens, **Molecular and Cellular Probes**, Volume 23, Issue 2, 2009.

MORGAN J. A. T.; GODWIN R. M.; Mitochondrial genomes of Australian chicken *Eimeria* support the presence of ten species with low genetic diversity among strains. **Veterinary Parasitology**.; 243 :58–66. 2017.

MOTRIUK-SMITH D, Seville RS, Quealy L, Oliver CE. Comparison of the ITS1 and ITS2 rDNA in *Eimeria callospermophili* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Sciurid Rodents. **Journal Parasitology** 2011; 97(2): 305-310. PMID:21506777 PMCID:PMC3157313. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2535.1>

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.402-407, 2002.

NAMDAR A. Pegah et al. Multiplex Snapshot minisequencing for detection of common PAH gene mutations in Iranian patients with Phenylketonuria. **Iranian Biomedical Journal**, v. 27, n. 1, p. 5-5, 2023.

NOVAES, J.; MANHA A.; STELMASTCHUK L.; MADEIRA A.. Aspectos gerais da biologia do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. de galinha doméstica. **Revista da Biologia**. 6b. 2011.

OGEDENGBE JD, Hunter DB, Barta JR. Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. **Veterinary Parasitology** 2011a; 178(3-4): 350-354. PMID:21295915. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.009> » <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.009>

OGEDENGBE JD, Hanner RH, Barta JR. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **International Journal Parasitology** 2011b; 41(8): 843-850. PMID:21515277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>

OGEDENGBE, M. E., BRASH, M., & BARTA, J. R. The complete mitochondrial genome sequence of *Isospora* sp. (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing systemic coccidiosis in domestic Canaries (*Serinus canaria* Linn.), **Parasites & Vectors**, 2015.

OGEDENGBE M. E.; EL-SHERRY S.; WHALE J.; BARTA JR.. Complete mitochondrial genome sequences from five *Eimeria* species (Apicomplexa; Coccidia; Eimeriidae) infecting domestic turkeys. **Parasites & Vectors**, 7 :335, 2014.

OLIVEIRA, U. C. *Eimeria* spp. de coelho e galinha domésticos: desenvolvimento de ensaios moleculares e caracterização filogenética. 2011. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - **Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, M. S.; MELLO E. R.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P.. Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America. **Parasitologic Research** 120, 2585–2593, 2021.

OLIVEIRA F. C. R.; GALLOA S. S. M.; ELIZEUA T. K. S.; EDERLI N. B. *Isospora bertoi* n. sp. of the saffron finch, *Sicalis flaveola* (Aves: Passeriformes) from Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 83, 2023.

Ortúzar-Ferreira, CN, Oliveira, MS, Genovez-Oliveira, JL *et al.* Coccídios de Columbiformes: uma revisão taxonômica de suas espécies de Eimeriidae e *Eimeria columbinae* de *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) do Brasil. **Parasitology Research**, 267–281 (2020)

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., MELLO E. R.; MELO J.O.; OLIVERA M. S.; THODE-FILHO S.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P. Redescription and molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. **Systematic Parasitology** 98, 333–341, 2021.

PACHECO, F. T. F.. Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas em amostras fecais. 2013. 105 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal da Bahia**, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2013.

PAGE C. D.; HADDAD K. Coccidial infections in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.4, n. 3, p. 138-144, 1995.

PAPAVERO N. Essays on the History of Neotropical Dipterology: with special reference to collectors: 1750-1905: Vol. I. 1971.

PARMENTIER I., DUMINIL J., KUZMINA M., PHILIPPE M., THOMAS D. W., KENFACK D., CHUYONG G. B., CRUAUD C., HARDY O. J. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? **Plos One**, 8, e54921. 2013.

PELLEGRINI M.; MANNING J.; DAVIDSON N.. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*, **Cell**, 10 (1977) 213-224.

PELLÉRDY L. P. Coccidia and coccidiosis. 2^a ed. Berlim: **Verlag Paul Parey e Akademiai Kiady**. 1974. Acessado em <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19752285198>.

PEREIRA, L. H. G. et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River basin, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 21(S2), p. 1-9, 2010.

PERIZ J.; GILL A. C.; HUNT L.; BROWN P.; TOMLEY F. M.. The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of *Eimeria tenella* form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells. **The Journal of Biological Chemistry** 282 (23): 16891-16898. 2007.

PHILIPPE, H.; CHENUIL, A.; ADOUTTE, A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? **Development**, p. 15–25, 1994.

PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica** 62: 163-170, 1996.

REGITANO, L. C. A. Introdução à Análise de Marcadores Moleculares. In: Regitano, L.C. de A.; Coutinho, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, p. 26-39, 2001.

REGINATO, CAROLINE Z. et al. Métodos de extração de DNA para detecção molecular de *Eimeria spp.* em bovinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online]. v. 40, n. 7, pp.

514-518, 2020.

ROBERTS L. S.; JANOVY J. J. Foundations of parasitology. 8th ed. **The McGrawHill Companies**, Inc. New York, NY: McGraw-Hill. 720 p. 2009.

RODRIGUES MB, DA SILVA LM, LOPES BDO B, BERTO BP, LUZ HR, FERREIRA I, LOPES CW. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeiriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia island, Brazil. **Zootaxa**. 2015 Oct 28;4034(1):193-6. doi: 10.11646/zootaxa.4034.1.10. PMID: 26624438.

RODRIGUES, M. B.; OLIVEIRA, J. L. G.; SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G. N.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) (Passeriformes: Thraupidae: Sporophilinae) and *Haplospiza unicolor* Cabanis, 1851 (Passeriformes: Thraupidae: Diglossinae) as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro, Lopes, 2005 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 96, p. 423-431, 2018.

ROH S. G., KIM J., KU B. K., LEE K. Case study: Pathological and phylogenetic analysis of coccidiosis in two goats with heavy infection of unrecorded *Eimeria* sp. **Parasitology International**. 2023.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Ecology and Evolution**, v.18, n. 8, p. 411-417, 2003

ROSALES, M.J.; MASCARO, C. First report of *Cyclospora talpae* (Pellerdy et Tanyi, 1968) (Apicomplexa) in *Talpa occidentalis* (Insectivora) in the Iberian Peninsula. **Parasitology Research**, v. 59, p. 135-136, 1999.

RUGGIERO M. A.; GORDON D. P.; ORRELL T. M.; BAILLY N.; BOURGOIN T.; BRUSCA R. C.; CAVALIER-SMITH T.; GUIRY M. D.; KIRK P. M. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLoS One**, v. 10 (6):1–54., e0130114, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^a ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Nova York, Vol. 1 e 2, 2001.

SATTA, Y.; ISHIWA, H.; CHIGUSA, S. I. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 638-650, 1987.

SAVAGE, J. M.. Systematics and the biodiversity crisis. **BioScience**, v. 45, p. 673-679, 1995.

SCHARES G.; PANTCHEV N.; BARUTZKI D.; HEYDORN A. O.; BAUER C.; CONRATHS F. J.. *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in feces collected from dogs in Germany. **International Journal Parasitology** 35: 1525-1537. 2005.

SCHNITZLER B. E.; THEBO P. L.; MATTSSON J. G.; TOMLEY F. M.; SHIRLEY M. W.; Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. **Avian Pathology**; 27(5):490-7, 1998.

SCHNITZLER B. E.; THEBO P. L.; TOMLEY F. M.; UGGLA A.; SHIRLEY M. W.; PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. **Avian Pathology**. Feb; 28(1):89-93, 1999.

SCHRENZEL M. D.; MAALOUF G. A.; GAFFNEY P. M.; TOKARZ D.; KEENER L. L.; MCCLURE D.; GRIFFEY S.; MCALOOSE D.; RICKOUT B. A.; Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. **Journal Parasitology** 91:635–647, 2005.

SEBERG O., PETERSEN G. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? **Plos One**, 4, e4598. 2009.

SEMADS. Atlas das Unidades de Conservação da natureza do Estado do Rio de Janeiro. Secretaria estadual de meio ambiente e desenvolvimento sustentável do Rio de Janeiro. **São Paulo: Metavídeo SP Produção e Comunicação Ltda.**, 48 p, 2001.

SHIRLEY, M. W. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. **Parasitology Research** 80, 366-73, 1994.

SHIRLEY M. W. *Eimeria* species and chicken lineages. In J Eckert, Braun R, SHIRLEY M. W, Coudert P, Biotechnology - Guidelines on research techniques in coccidiosis , **European Commission**, Luxembourg, p. 1-51, 1995.

SHIRLEY, M. W. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella* - a coccidium from the chicken. **International Journal Parasitology** 30, 485-93, 2000.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1135- 1145, Oct. 1997.

SMITH J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal Food Protist**. May;56(5):451-461. 1993.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 133- 142, 2005.

SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, cap. 6, p. 173-208, 2007. SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium: Detection in water and food*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. (2012) Polimorfismos de isozimas. In: Matioli, S.R.; Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 165– 170.

SOULSBY, E. J. L. Parasitología y enfermedades parasitarias. 7ª ed. México: **Interamericana**, 823 p, 1987.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGELES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83: 141 – 152, 1996.

SOUZA, P. X. Nova abordagem laboratorial na investigação das enteroparasitoses em humanos. 80 f. Dissertação (mestrado), Niterói, **Universidade Federal Fluminense**, 2005.

SOUZA-DANTAS L. M.; BASTOS O. P. M.; BRENER B.; SALOMÃO M.; GUERRERO J.; LABARTHE N. V. Técnica de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de

helmintos gastrintestinais de gatos domésticos. **Ciência Rural**, 37(Cienc. Rural, 2007 37(3)), 904–906, 2007.

SOUZA-DANTAS, L. M. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintos gastrintestinais de gatos domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 904-906, 2007.

STACE C. A. Plant taxonomy and biosystematics - does DNA provide all the answers? **Taxon**, 54, 999-1007. 2005.

SICK, H. (1997) Ornitologia Brasileira. **Nova Fronteira**, Rio de Janeiro.

STOECKLE, M.; WAGGONER, P.E.; AUSUBEL, J.H. Barcoding life, illustrated. Goals, rationale, disponível em (www.barcoding.si.edu). 2005.

STUCKI U.; BRAUN R.; RODITI I. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. **Experimental Parasitology**, 76(1):68–75, 1993.

TANAKA, T. Differential diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infection by PCR of cysteine proteinase genes. **J. Japan Ass Infect. Dis.**, 71: 903-909, 1997.

TANG X.; HUANG G.; LIU X.; EL-ASHRAM S.; TAO G.; LU C.; SUO X. An optimized DNA extraction method for molecular identification of coccidian species. **Parasitology Research**, 117(3), 655–664, 2018.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS R. H.; VOGLER A. P. DNA points the way ahead in taxonomy. **Nature** 418, 479, 2002.

TEDLA M. A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review, **Parasite Epidemiology and Control**, Volume 6. 2019.

TEIXEIRA, M. Anátomo-clínica e Biologia em frangos de corte experimentalmente infectados com *Eimeria acervulina* e suplementados com betaína. 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2007.

TEDLA, M. A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 6, 2019.

TENTER, A.; BARTA, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D.W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D.A.; THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 505– 616, 2002.

THOMPSON R. C. A. et al. Basic biology of *Cryptosporidium*. **Parasitology Laboratory Lawrence Journal**, acess: set (2022): <https://www.k-state.edu/parasitology/basicbio>, 2022.

TREFANCOVÁ A, MÁCOVÁ A, KVIČEROVÁ J. Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? **Protist** 170:104–120. 2019.

TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using twostep Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n.5, p. 966-970, 1997.

VAN DE PEER, Y. & DE WACHTER, R. 1997. Evolucionary relationships among the

eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. **Journal of Molecular Evolution**, 45: 619-630.

WAGGONER B. **History of Anton van Leeuwenhoek** (1632-1723), 1973.

WALKER, T.A. and PACE, N.R., Transcriptional organization of the 5.8S ribosomal RNA cistron in *Xenopus laevis* ribosomal DNA, *Nuci. Acid Resourch.*, 4 - 695--601. 1977.

WALKER R. A., SHARMAN P. A., MILLER C. M., LIPPUNER C., OKONIEWSKI M., EICHENBERGER R. M., RAMAKRISHNAN C., BROSSIER F., DEPLAZES P., HEHL A. B., SMITH N. C. RNA Seq analysis of the *Eimeria tenella* gametocyte transcriptome reveals clues about the molecular basis for sexual reproduction and oocyst biogenesis. **BMC Genomics**. Feb 18;16(1):94. 2015.

WARD, R. D.; HOLMES, B. H.; YEARSLEY, G. K. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 458-463, 2008.

WELLAUER, P. K.; DAWID, I. B. The structural organization of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*, **Cell**, 10 (1977) 193—212, 1977.

WENYON, C. M. **Protozoology**. Vol. 2. NewYork: William, Wood and Company, 1.396p, 1926.

WILFERT, L. The deformed wing virus is a recent global epidemic in bees caused by Varroa mites. **Science** 351, 594–597. 2016.

WILSON RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. **Microbiol Mol Biol Rev**. Mar;61(1):1-16, 1997.

WOODMANSEE, D. B. Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. **Journal of Protozoology**, v. 34, n. 4, p. 398-402, 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 8392-8396, 1977.

XIAO L, FAYER R, RYAN U, UPTON SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin Microbiol Rev**. 2004 Jan;17(1):72-97, 2004.

YABSLEY, M. J. *Eimeria*. In. ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, 64 D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley-Blackwell. **ACADEMIA**. Cap.8, p. 162-180. 2008.

YANG R, BRICE B, ELLOIT A, LEE E, RYAN U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria paludosa* coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) in a dusky moorhen (*Gallinula tenebrosa*, Gould, 1846) in Australia. **Experimental Parasitology**. 2014 Dec;147:16-22..

YANG, R.; BRICE, B.; RYAN, U. *Isospora anthochaerae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a red wattlebird (*Anthochaera carunculata*) (Passeriformes: Meliphagidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology** v. 140, p. 1–7, 2014

YANG, R.; BRICE, B.; ELLIOT, A.; RYAN, U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa: Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. **Experimental Parasitology**, v.166, p.124-130, 2016.

YANG, RONGCHANG & BRICE, BELINDA & JIAN, FUCHUN & RYAN, UNA. (2018).

Morphological and molecular characterisation of *Isospora butcheriae* n. sp. in a silvereye (*Zosterops lateralis*) (Latham, 1801). **Parasitology Research**. 117. 10.1007/s00436-018-5808-8.

YANG, R.; BRICE, B.; LIU, Q.; BERTO, B. P.; AUSTEN, J.; RYAN, U. (2021). Morphological and genetic characterization of the first *Isospora* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). **Parasitology Research**, 120, 1037–1047.

ZHAO X. M.; DUSZYNSKI D. W.; LOKER ES. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. **Journal Microbiology Methods** 44(2):131–137, 2001.

CAPÍTULO I

**REDESCRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Isospora feroxis* BERTO,
LUZ, FLAUSINO, FERREIRA; LOPES, 2009 (Eimeriidae) DE PAPA-MOSCAS
Myiarchus ferox (Gmelin) (Tyrannoidea) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO

No presente estudo, *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira ; Lopes, 2009 é redescrita a partir de fotomicrografias e de novas amostras de um papa-moscas *Myiarchus ferox* (Gmelin), que é o hospedeiro-tipo na Ilha da Marambaia no Sudeste do Brasil. Além disso, o bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurescens* Spix é registrado como novo hospedeiro para esta espécie, em uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, no interior do Sudeste do Brasil, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar, via sequenciamento do gene mitocondrial, citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI). A micrópila e a parede rugosa do oocisto são acrescentadas à descrição de *I. ferox*, além de outros detalhes. Esta é a sexta espécie identificada de aves Suboscine (Tyranni) a ter uma sequência gênica COI depositada no GenBank e, embora ainda não seja possível tirar conclusões sobre a filogenia de *Isospora* spp. de Passeriformes pelo gene COI, a análise molecular confirmou as diferenças entre as espécies de coccídios de tiranídeos.

Palavras-chave: *Isospora*, sequenciamento, citocromo *c* oxidase.

ABSTRACT

In the present study *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 is redescribed from the photosyntypes and from new samples from a short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin), which is the type-host in the type locality, the Marambaia Island in Southeastern Brazil. In addition, the yellow-olive flycatcher *Tolmomyias sulphurescens* Spix is recorded as a new host for this species, in a new locality, the Itatiaia National Park, in the interior of Southeastern Brazil, providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene. Micropyle and rough oöcyst wall are added to the description of *I. ferox*, in addition to other details. This is the sixth species identified from suboscine birds (Tyranni) to have a COI gene sequence deposited in GenBank and, although it is not yet possible to make conclusions on the phylogeny of *Isospora* spp. From Passeriformes by the COI gene, the molecular analysis confirmed the differences between coccidian species from tyrant-flycatchers.

Keywords: *Isospora*, sequencing, cytochrome c oxidase.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade na Região Neotropical é muito relevante para pesquisadores de todo o mundo, entre vários aspectos, devido ao seu potencial e recorrentes novas descobertas (Tundisi; Matsumura-Tundisi, 2008). Nesse contexto, a classe Aves se destaca por sua grande diversidade e exuberância, atraindo não só cientistas, mas também ecoturistas, especialmente observadores de aves (Stotz et al., 1996).

O Brasil é o segundo país da região neotropical com maior número de espécies de aves; onde, atualmente, existem 1.919 espécies listadas pelo Comitê de Registros Ornitológicos do Brasil (Piacentini et al., 2015). No contexto de pesquisas sobre aves neotropicais, há o estudo de seus parasitas, que tem sido cada vez mais relacionado à ecologia, fisiologia e conservação de espécies silvestres. Entre os parasitas das aves, os protozoários coccídios destacam-se como a causa da morbidade e mortalidade em condições desfavoráveis entre hospedeiro e ambiente, para um tipo de comensalismo em populações de aves em ambientes conservados e equilibrados (Berto; Lopes, 2020).

Os Tiranídeos representam a superfamília, Tyrannoidea (Piacentini et al., 2015), ou simplesmente a família Tyrannidae, de acordo com a BirdLife International (Del Hoyo; Collar, 2016), em que a distribuição se estende pela América do Norte, Central e do Sul, estando mais concentrada na Região Neotropical. Atualmente é a maior superfamília/família da classe Aves em todo o mundo, com 450 espécies registradas.

No Brasil, 218 espécies estão listadas (Piacentini et al., 2015; Del Hoyo; Collar, 2016). Mesmo com essa grande diversidade, há poucos relatos de espécies coccidianas de papamoscas, quando comparados com outras famílias de aves. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo redescrever *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 a partir dos Fotomicrografias e a partir de amostras de um papa-moscas *Myiarchus ferox* (Gmelin), que é o hospedeiro-tipo na localidade do tipo, a Ilha de Marambaia, no Sudeste do Brasil.

Além disso, o bico-chato-de-orelha-preta, *Tolmomyias sulphurescens* Spix é registrado como um novo hospedeiro para esta espécie, em uma nova localidade, o Parque Nacional de Itatiaia, no interior do Sudeste do Brasil, proporcionando uma caracterização genotipada preliminar através do sequenciamento do gene citocromomo mitocondrial C oxidase subunidade 1 (COI).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Entre agosto de 2014 e agosto de 2018, foram realizadas 19 expedições em diferentes locais do Parque Nacional de Itatiaia (22° 27'S, 44° 36' O), área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2016), para capturar aves silvestres com redes de neblina e coletar amostras fecais.

Um total de sete bico-chato-de-orelha-preta, *T. sulphurescens* foram capturados. Além do Parque Nacional de Itatiaia, uma expedição em setembro de 2014 foi realizada na Ilha da Marambaia (23°3' 38,86'S, 43°58' 47,56'O), no litoral do estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, onde foi capturado um papa-moscas, *M. ferox*. As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação da espécie, a ave foi fotografada e liberada e amostras fecais foram colocadas em tubos para centrífuga contendo uma solução de dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) em 1:6 (v/v).

2.2 Análise morfológica

As amostras foram levadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 10 dias, ou até que aproximadamente 70% dos oocistos estivessem esporulados, os oocistos isolados por flutuação, na solução saturada de açúcar de *Sheather's* (gravidade específica: 1.20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014). As observações morfológicas, desenhos de linhas, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), os desenhos foram editados usando Corel DRAW®, e Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Versão 11.0, Corel Corporation, Canadá) e todas as medições foram realizadas em micrômetros.

2.3 Análise molecular

Um oocisto individual de uma amostra fecal de *T. sulphureus* foi isolado a partir de diluições seriadas dos oocistos, em gotas, em uma lâmina de microscópio usando uma micropipeta estéril. Este oocisto isolado foi ressuspensão em PBS e lavado por centrifugação até a clarificação do sobrenadante (Dolnik et al., 2009).

O DNA foi extraído dos oocistos e purificados utilizando o *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para o rompimento completo do oocisto, quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA.

A amplificação via PCR, para o gene COI, foi realizada utilizando-se um nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015) e os *primers* externos utilizados COIbF1 (5' - GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A - 3') e COIbR1 (5' - CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA - 3') produziram um fragmento do tamanho de 302 bp, os *primers* internos COIbF2 (5' - GGG CAC ATC ATA TGA TGA C - 3') e COIbR2 (5' - ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA - 3') produziram uma amplificação de 257 bp.

A reação do PCR continha: 10 µl 5x Green GoTaq® *Flexi Buffer*, 3 µl de 25 mM MgCl₂, 1 µl de 10 mM dNTPs, 0.4 lM de cada *primer*, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl de DNA (para reação primária) e 3 µl de produto de PCR primário (para a reação secundária). Tanto a PCR primária, quanto a secundária foram realizadas utilizando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5', seguido por 35 ciclos de 94°C por 30'', 47°C por 45'', e 72°C por 1' e uma extensão à 72°C por 5'.

Os amplicons da segunda rodada de PCR foram purificados utilizando-se a Purificação *Qiagen MinElute PCR* (Qiagen, São Paulo, Brasil). Todos os produtos de PCR foram sequenciados usando os *primers* de PCR frente e reversa pela *Ludwig Biotechnology*, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados utilizando o programa Chromas 2.6 (*Technelysium Pty Ltd*, Queensland Austrália).

2.4 Análises da sequência de DNA

A sequência recém gerada, foi comparada com as de *Isospora* spp. e outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank, utilizando-se da *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As árvores filogenéticas foram construídas para *Isospora* spp. nas sequências de COI alinhadas com outras espécies depositadas no GenBank.

As análises de alinhamento e parcimônia foram realizadas utilizando a versão 7 do MEGA, utilizando *ClustalW* como algoritmo de alinhamento (Tamura et al., 2007), a história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias foram calculadas usando o método “Tamura-Nei”, baseado na seleção de modelos usando *ModelTest* no MEGA 7.

As análises de *bootstrap* foram realizadas utilizando-se 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvores inferidas.

As fotomicrografias de *I. ferox* de *M. ferox* identificados em Berto et al. (2009a), que foram depositados na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na UFRRJ sob o número do repositório P-30/2009.

3. RESULTADOS

Foram examinados sete *T. sulfurescens* capturados no Parque Nacional de Itatiaia, no local conhecido como “Trilha das Borboletas” ou “Trilha Borboleta” (22°26'57.00"S, 44°36'25.00"O), e cinco deles, (71%), testaram positivo para a coccídios.

O papa-moscas *Myiarchus ferox* capturada na Ilha de Marambaia, também testou positivo para coccídios.

Todos os oocistos observados foram morfologicamente identificados como *I. ferox*. Eimeriidae Minchin, 1903 *Isospora* Schneider, 1881 *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009

Hospedeiro: *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Tyrannidae) papa-moscas.

Outro hospedeiro: *Tolmomyias sulphurescens* Spix (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Rhynchocyclidae) bico-chato-de-orelha-preta (presente estudo).

Localidade: Ilha da Marambaia (23°3' 38,86'S, 43°58' 47,56"O), sudeste do Brasil

Outra localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O), sudeste do Brasil.

Espécimes representativas: As fotomicrografias e desenhos de linha estão depositados e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>), na coleção de parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P-30/2009.

Outros espécimes (presente estudo): As fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução K₂Cr₂O₇ de 2,5% (Williams et al., 2010) de *T. sulfurescens* estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número MZURPTZ202025. As fotomicrografias estão depositadas e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>), na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, nos termos dos números do repositório 108/2020 (*T. sulphurescens*) e 109/2020 (*M. ferox*). As fotos de comprovação, dos espécimes hospedeiros, estão depositadas na mesma coleção.

Local de infecção do hospedeiro: Desconhecido; oocistos recuperados de fezes.

Prevalência: 75% (6/8) geral; 71% (5/7) para *T. sulphurescens*; e 100% (1/1) para *M. ferox*.

Sequência de DNA representativa: Sequências de COI representativas dos oocistos de *T. sulfurescens* foram depositadas no banco de dados do GenBank, sob o número MT563402.

3.1 Oocisto esporulado

Oocistos (n = 81) subesferoidais/subesféricos, 18-23 x 18-23 (20.7 x 20.0); índice

morfométrico: 1,0-1,1 (1,04). Parede bicamada, apresentando espessura, 1.3-2.0 (1.7), camada externa com rugosidade mínima a moderada, c.2/3 de espessura total. Micrópila presente, 4.4-9.2 (7.4) de largura. Resíduo do oocisto ausente, mas, 1-3 (geralmente 2 ligados), grânulos polares presentes.

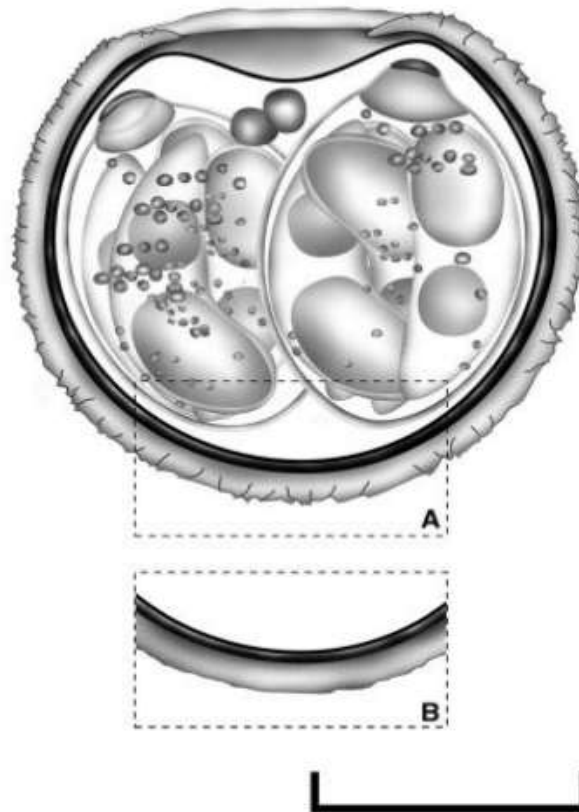


Figura 1. Composição do desenho do oocisto esporulado para redescrição de *Isospora ferox* de papa-moscas, destacando a camada externa da parede oocisto com rugosidade moderada (A) ou mínima (B). Barra de escala: 10 μ l.

3.2 Esporocisto e Esporozoítos

Esporocistos (n = 70) 2, ovoidal a elipsoidal, 11-15 x 8-10 (13.4 x 9.2); índice morfométrico de 1,3-1,6 (1,45). Corpo de Stieda presente, achatado em forma de meia-lua, 0,5-0,7 x 1,3-2.2 (0.6 x 1.7); corpo substieda presente, arredondado a trapezoidal, 1.0- 1.8 9 2.4-3.3 (1.3 9 2.9), com destaque semelhante a um substieda compartimentalizado; corpo do parastieda ausente; resíduo do esporocisto presente, composto de esferículas de diferentes tamanhos. Esporozoítos 4, vermiformes, 10-11 x 3-4 (10.9 x 3.6), corpo refrátil posterior e núcleo localizado centralmente.

3.3 Observações

Quatro *Isospora* spp. são registrados de Tiranídeos do Novo Mundo (**Tabela 1**). Até hoje, *I. ferox* tinha os menores oocistos registrados entre estes *Isospora* spp.; no entanto, no presente estudo, a ampla adição de medições de oocisto de dois hospedeiros aumentou a gama de medidas de oocistos, tornando-as compatíveis com *Isospora atilae* Rodrigues, Silva, Lopes,

Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015 e *Isospora lopesi* Silva Carvalho; Berto, 2018. No entanto, os oocistos de *I. ferox* são diferenciados desses *Isospora* spp. pela forma menos alongada dos seus esporocistos, corpo de substieda menor e mais delicado e, principalmente, pela presença da micrópila e da parede de oocisto áspero que foram adicionados na redescrição atual.



Figura 2. Oocistos esporulados de *Isospora ferox* de fotomicrografias (A, B) e de novas amostras de um papa-moscas, *Myiarchus ferox* (C-G) e de bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurescens* (H-J). Para observação: camadas internas (il) e ásperas (rol) da parede oocisto; micrópila (m); núcleo (n); granulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 µl.

3.4 Análise filogenética

A amplificação de DNA do oocisto de *I. ferox* mostrou uma faixa clara de c.250 bp. A análise filogenética incluiu 20 sequências para *Isospora* aviária disponíveis no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi utilizado como grupo externo. *Isospora ferox* apresentou-se em um grande clado contendo *Isospora* spp. de turdídeos e traupídeos, mas também contendo *Isospora* spp. de hospedeiros suboscines (Tyranni), que é a subordem de *T. sulfurescens* e *M. ferox*. *Isospora ferox* teve as maiores semelhanças de 97% com *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galva, Ferreira; Lopes, 2014 do sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot) e *Isospora manorinae* Yang, Brice, Jian; Ryan, 2016 de *Manorina flaviula* (Gould).

Tabela 1 - Morfologia comparativa de *Isozona* spp. registrada no Novo Mundo tiranídeos (Tyrannoidea).

Espécies	Hospedeiro	Referência	Forma do oocisto	Size (µm)	Forma index	Grânulo Polar	Parede	Micrópila	Forma Esporocisto	Tamanho (µm)	Forma index	Corpo Stieda	Corpo SubStieda	Resíduo Do esporocisto
<i>Isozona ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae)	Berto et al. (2009a)	subspheroidal	18–20 × 17–20 (18.7 × 18.0)	1.0–1.1 (1.1)	usually 2	low roughness	presente	ovoidal	11–13 × 8–10 (11.7 × 8.5)	1.0–1.5 (1.4)	flattened, (0.3 × 1.2)	prominent, (1.2 × 2.5)	difuso
	<i>M. ferox</i>	presente study	subspheroidal	21–23 × 20–23 (21.9 × 21.4)	1.0–1.1 (1.03)	1–3 (usually 2 bonded)	low to moderate roughness	presente	ovoidal to elipsoidal	14–15 × 9–10 (14.8 × 10.1)	1.4–1.6 (1.47)	flattened to half-moon-Formad, 0.5–0.7 × 1.3–2.2 (0.6 × 1.7)	rounded to trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9)	difuso
	<i>Tolmomyias sulphureus</i> Spix (Rhynchocyclidae)			18–23 × 18–22 (20.5 × 19.8)	1.0–1.1 (1.04)					11–15 × 8–10 (13.1 × 9.1)	1.3–1.6 (1.45)			
<i>Isozona mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae)	Berto et al. (2009b)	elipsoidal	23–31 × 19–23 (28.3 × 21.2)	1.2–1.4 (1.3)	1–2	suave	ausente	elongate-elipsoidal	17–22 × 10–13 (19.7 × 11.7)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 × 1.1)	prominent, (1.4 × 2.1)	compact, subspherical
<i>Isozona attilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae)	Rodrigues et al. (2015)	subspheroidal to elipsoidal	18–22 × 18–21 (20.3 × 19.0)	1.0–1.2 (1.07)	1–2	suave	ausente	elipsoidal	12–15 × 7–9 (13.5 × 7.9)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 × 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 × 4.0)	difuso
<i>Isozona lopesi</i> Silva-Carvalho ; Berto, 2018	<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	subspheroidal to ovoidal	18–24 × 18–22 (20.6 × 19.7)	1.0–1.2 (1.05)	1	suave	ausente	elipsoidal	12–16 × 8–11 (14.4 × 8.6)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-Formad, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	difuso

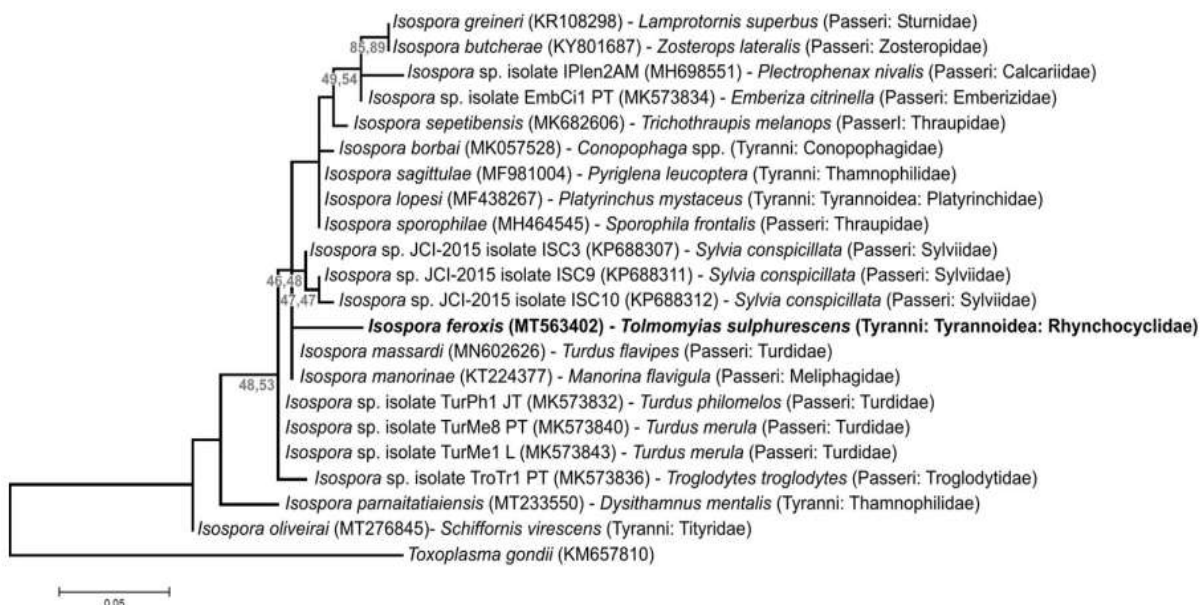


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números dos nós representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas valores > 40% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

4 DISCUSSÃO

A descrição das espécies coccidianas se fundamenta na morfologia dos oocistos embora complementações ecológicas, biogeográficas, patológicas e moleculares sejam importantes para a caracterização de uma espécie (Duszynski; Wilber, 1997; Tenter et al., 2002; Berto et al., 2014).

Nesse contexto, Duszynski; Wilber (1997) estabeleceram que as identificações devem ser baseadas na morfologia comparativa entre as espécies coccidianas registradas na mesma família do hospedeiro. Desde então, os estudos mais completos e confiáveis sobre taxonomia coccidiana de aves silvestres demonstraram especificidade no nível familiar do hospedeiro (Berto et al., 2013). No entanto, às vezes, o número de espécies coccidianas registradas em uma família hospedeira é muito baixo ou inexistente (como por exemplo: Cardinalidae), tornando necessário comparar com espécies coccidianas descritas a partir de níveis taxonômicos mais elevados do hospedeiro, como Superfamília, Parvordem ou Infraordem.

Além disso, as divergências nos sistemas de classificação de Aves dificultam a identificação de coccídios com base na especificidade da família hospedeira. As classificações de Del Hoyo; Collar (2016) e Piacentini et al. (2015) que subsidiaram o presente estudo, classificam os tiranídeos como uma Família e Superfamília, respectivamente; portanto, apesar dessa divergência de nível e classificações em diferentes famílias por Piacentini et al. (2015), não houve diferenças na organização e comparação de coccídios de tiranídeos que são tradicionalmente relacionados (Berto et al., 2011).

Os oocistos da descrição original de *I. ferox* e os de *M. ferox* e *T. Sulfurescens*, do presente estudo, divergiram nas medidas. Essas diferenças morfométricas foram observadas principalmente a partir do baixo número de oocistos medidos a partir de hospedeiros únicos *M. ferox*, tanto em Berto et al. (2009a), quanto no presente estudo (**Tabela 1**). Em contraste, os 71 oocistos medidos de 5 *T. sulfurescens* atingiram uma ampla gama de medidas, que é compatível

com os maiores e menores oocistos de *M. ferox*. Assim, pode-se concluir que *I. ferox* tem uma ampla gama de medidas detectadas ao se observar oocistos de vários hospedeiros. Essas diferenças no tamanho dos oocistos de diferentes hospedeiros são naturais e já estabelecidas na literatura científica como resultado de fatores biológicos e ecológicos (Duszynski, 1971; Fayer, 1981; Berto; Lopes, 2020).

A rescrição dos fotossíntipos de *I. ferox* propostos no presente estudo baseia-se na observação de oocistos com micrópila (**Figura. 2A, B**), que não foram identificados na descrição original por Berto et al. (2009a). Provavelmente, o baixo número de 10 oocistos observados em Berto et al. (2009a) deve ter favorecido a não observância da micrópila, uma vez que essa característica, é observada apenas em certas posições dos oocistos (**Figura. 2 E-G, I e J**), especialmente quando são subsféricas (Berto et al., 2014).

Assim, esse estudo destaca a importância da descrição de espécies coccidianas de muitos oocistos, evitando que certas características não sejam observadas. Nesse mesmo sentido, a descrição original de Berto et al. (2009a), não identificou oocistos com uma parede áspera. De fato, os oocistos observados no presente estudo apresentaram uma rugosidade baixa a moderada, e em um dos hospedeiros *T. sulphureus*, apenas os oocistos com rugosidade muito baixa foram predominantemente observados, semelhantes aos fotossíntipos de *I. ferox*. Portanto, esses resultados reforçam que a descrição de novas espécies coccidianas de um único espécime hospedeiro deve ser evitada, garantindo que todos os detalhes possíveis de uma espécie coccidiana sejam observados.

Isospora ferox é a sexta espécie identificada a partir de aves Suboscines a ter uma deposição de sequência genética COI no GenBank. Mesmo assim, poucas conclusões filogenéticas são observadas a partir do cladograma demonstrado na **Figura 3**. *Isospora ferox* estava mais próxima de *Isospora* spp. de turdídeos e traupídeos do que de espécies da mesma parvordem, como *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020, e Superfamília/Família, como *Isospora lopesi*. Ao mesmo tempo, *Isospora ferox* está mais próximo de coccidianos da região neotropical, como *Isospora massardi*, bem como de espécies coccidianas relacionadas a aves endêmicas na Oceania, como *Isospora manorinae*.

De fato, o fragmento de 257 pb do gene COI pode não ter sido totalmente adequado para a delimitação de espécies coccidianas de passeriformes, apesar de ter sido pioneiro no trabalho de Dolnik et al. (2009), possuir o maior número de depósitos no GenBank e, até recentemente, ter sido recomendado para estudos filogenéticos (Yang et al., 2015). Nesse sentido, os últimos trabalhos sobre caracterização molecular de coccídios de passeriformes mostraram que sequências mais longas e múltiplos genes são mais conclusivos nas análises filogenéticas (Yang et al., 2021).

Entretanto, a análise molecular confirmou as diferenças já observadas na morfologia dos oocistos de *I. ferox* e *I. lopesi*, uma vez que essas espécies eram genotipicamente diferentes em 9 pares de bases (4,4%) pelas sequências de COI.

Finalmente, com base nas características morfológicas e moleculares descritas acima, *I. ferox* é redescrita no presente estudo, documentando um novo hospedeiro, *T. Sulphureus*, e uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, além do hospedeiro-tipo *M. Ferox* na Ilha da Marambaia, sudeste do Brasil.

Comitê de Ética

As licenças de coleta de campo foram emitidas pelo SISBIO/ICMBio (licenças 45200-1; 49605-1; 54951-1) e CEUA/UFRRJ (protocolos IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV6606250616). Todas as diretrizes institucionais, nacionais e internacionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTO, B. P., LUZ, H. R., FLAUSINO, W., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 74, 75–80.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., LUZ, H. R., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009b). *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher. *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, 54, 301–304.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., MCINTOSH, D., TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, 80, 159–204.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2013). Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In L. Ruiz; L. Iglesias (Eds.), *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease* (pp. 47–66). New York: **Nova Science Publishers**.
- BERTO, B. P., MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 1–15.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host environment interaction. **Journal of Parasitology**, 106, 707–713.
- DEL HOYO, J.; COLLAR, N. J. (2016). *HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World, Volume 2: Passerines*. Cambridge: Lynx Edicions, Barcelona; **BirdLife International**, 1013 pp.
- DOLNIK, O. V., PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. (2009). Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal of Parasitology**, 95, 169–174.
- DUSZYNSKI, D. W. (1971). Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. **Journal of Parasitology**, 57, 948–952.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336. Fayer, R. (1980). Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. **Veterinary Parasitology**, 6, 75–103.
- ICMBIO. (2016). **Parque Nacional do Itatiaia**. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 13 may 2020.
- PIACENTINI, V. Q., ALEIXO, A., AGNE, C. E., MAURÍCIO, G. N., PACHECO, J. F., BRAVO, G. A., et al. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian ORNITHOLOGICAL RECORDS COMMITTEE/Lista comentada das aves do Brasil pelo

Comite Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 23, 90–298.

RODRIGUES, M. B., SILVA, L. M., LOPES, B. DO B., BERTO, B. P., LUZ, H. R., FERREIRA, I; LOPES, C. W. G. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. **Zootaxa**, 4034, 193–196.

SILVA-CARVALHO, L. M., PASTURA, D. G. N., GOMES, J. V., SIQUEIRA, P. B., RODRIGUES, M. B., LIMA, V. M., et al. (2018). *Isospora lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463.

STOTZ, D. F., FITZPATRICK, J. W., PARKER, T. A., III; MOSKOVITS, D. K. (1996). Neotropical Birds: Ecology and Conservation (p. 478). Chicago: **Universidade de Chicago Press**.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M.; KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24, 1596–1599.

TENTER, A. M., BARTA, J. R., BEVERIDGE, I., DUSZYNSKI, D. W., MEHLHORN, H., MORRISON, D. A., et al. (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, 32, 595–616.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (2008). Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. **Brazilian Journal of Biology**, 68, 913–915.

WILLIAMS, R. B., THEBO, P., MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J. A. (2010). Coccidian oocystas type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76, 69–76.

YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A.; RYAN, U. (2015). *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

YANG, R., BRICE, B., LIU, Q., BERTO, B. P., AUSTEN, J.; RYAN, U. (2021). Morphological and genetic characterization of the first *Isospora* species (*I. lugensae*) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). **Parasitology Research**, 120, 1037–1047.

CAPÍTULO II

***Isospora basileuterusi* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PULA-PULA
Basileuterus culicivorus (DEPPE) (PASSERIFORMES: PARULIDAE) NA AMÉRICA
DO SUL**

RESUMO

Isospora basileuterusi Mello; Berto, 2021 é descrito com base em material coletado do pula-pula *Basileuterus culicivorus* (Deppe), capturado no Parque Nacional de Itatiaia, uma unidade de conservação no sudeste do Brasil. Os oocistos da nova espécie são elipsoidais a ovoidais, medem, em média, 25,2 x 21,1 µm, apresentam parede lisa e bicamadas, c.1,6 µm de espessura. Micrópila e resíduo do oocisto ausentes, com um a três grânulos polares presentes. Os esporocistos são elipsoidais, em formato de limão, medindo em média 15,3 x 9,5 µm, um corpo Stieda semelhante a botão e um corpo de substieda trapezoidal. O resíduo do esporocisto está presente, geralmente como um corpo de grânulos ligados à membrana. Os esporozoítas são vermiformes, com corpos refráteis. Quatro, dos 19 pula-pulas capturados (21%), estavam positivados pela nova espécie. A análise molecular do gene mitocondrial c oxidase subunit 1 (COI) revelou uma semelhança de 99,5% entre a nova espécie e *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot; Ryan, 2015, de canários da ilha canárias *Serinus canaria* (L.), na Austrália Ocidental. Os oocistos de *I. basileuterusi* podem ser distinguidos dos outros quatro *Isospora* spp. registrados em hospedeiros de Parulidae, e das espécies molecularmente mais próximas, pelo esporocisto típico em formato de limão, com pequeno corpo substieda e um resíduo de esporocisto ligado a membrana. Portanto, com base nas características morfológicas e moleculares, *I. basileuterusi* é a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através da sequenciação do gene COI.

Palavras-chave: *Isospora*, Parque Nacional de Itatiaia, molecular.

ABSTRACT

Isospora basileuterusi Mello; Berto, 2021 is described based on material from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) captured in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in south-eastern Brazil. Oocysts of the new species are elipsoidal to ovoidal, measuring on average 25.2 x 21.1 μm , with a suave, bi-layered wall, c.1.6 μm thick. Micropyle and oocyst residuum are both ausente, but one to three polar granules are present. Sporocysts are elipsoidal to lemon-Formad, measuring on average 15.3 x 9.5 μm , with a knob-like Stieda body and a trapezoidal sub-Stieda body. y. Sporocyst residuum is present, usually as a body of membrane-bound granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies. Four of the 19 warblers captured (21%) were infected with the new species. Molecular analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene revealed a similarity of 99.5% between the new species and *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot; Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (L.) in Western Australia. The oocysts of *I. basileuterusi* can be distinguished from the four other *Isospora* spp. recorded in hosts of the Parulidae, and from the molecularly most closely related species, by the typical elipsoidal to lemon-Formad sporocysts, with small sub-Stieda body and a membrane-bound sporocyst residuum. Therefore, based on the morphological and molecular features, *I. basileuterusi* is the fifth species described in a host of the family Parulidae and the first molecularly characterized via sequencing the COI gene.

Keywords: *Isospora*, Itatiaia National Park, molecular.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país da região neotropical com maior número de espécies de aves, apresentando cerca de 1.971 espécies listadas pelo Comitê Nacional de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021), que corresponde à metade da diversidade da avifauna neotropical (Dias, 1992). Em relação às pesquisas sobre aves neotropicais, o estudo de seus parasitas tem sido destacado pela associação com ecologia, biologia e conservação de espécies.

Entre seus parasitas, os protozoários coccídios são importantes como causa de morbidade e mortalidade, especialmente em aves em cativeiro ou ambientes antropizados, atuando assim como biomarcadores ecológicos (Berto; Lopes, 2020).

O pula-pula, *Basileuterus culicivorus* (Deppe) é um pássaro da família Parulidae com ampla distribuição na região neotropical (Sick, 1997; Pacheco et al., 2021). Tem hábitos alimentares insetívoros e forrageia o estrato médio de floresta ombrófila densas (Marini; Cavalcanti, 1993; Lima; Manhães, 2009).

O presente estudo fornece uma descrição e caracterização molecular de uma nova espécie de *Isospora* spp. a partir de pula-pulas *B. culicivorus* capturados no Parque Nacional do Itatiaia, unidade de conservação no sudeste do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Foram realizadas 9 expedições entre 2014 e 2019 no Parque Nacional de Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2021), em agosto (22°26'19"S, 44°37'23"O) e novembro (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2014; Março (22°27'38"S, 44°35' 34"O) 2015; Março (22°19'46"S, 44°32'11"O) e outubro (22°27'38"S, 44°35'34"O) 2016; Julho (22°26'15"S, 44°18'33"O) e novembro (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2017; Agosto (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2018; Março (22°26'17"S, 44°37' 33"O) 2019. Um total de 19 *B. culicivorus* foram capturados com redes de neblina. As aves foram mantidas em caixas individuais e suas fezes coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação ao nível da espécie, a ave foi fotografada e liberada. As amostras de fezes foram colocadas em tubos de centrifugas contendo 2,5% de solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em 1:6 (v/v).

2.2 Análise Morfológica

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C), por 10 dias, ou até que aproximadamente 70% dos oocistos estivessem esporulados.

Os oocistos foram isolados por flutuação, na solução saturada de açúcar de *Sheather's* (gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014a), as observações morfológicas, desenhos, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), os desenhos de linha foram editados usando dois aplicativos de software (Corel DRAW, e Corel PHOTO-PAINT) do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics

Suite, Versão, 2020; Corel Corporation, Canadá) e todas as medidas estão em micrômetros.

2.3 Geração de dados moleculares

Um oocisto individual, de diluições em série, foi isolado em uma lâmina de microscópio com utilização de micropipeta estéril. O oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até que a clarificação do sobrenadante (Dolnik et al., 2009). O DNA do oocisto foi extraído com o “*Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit*” (Qiagen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA para alcançar a ruptura completa dos oocistos.

Foi realizada uma PCR para a amplificação de um fragmento parcial do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), gene (c.250 bp). Após um nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os *primers* externos COIbF1 (5' -GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') e COIbR1 (5'-CCA AGA AAT ACR AAR TGG AA-3''), produziram um amplicon do tamanho de c.302 bp e os *primers* internos COIbF2 (5' -GGG CAC ATA TGA C-3') e COIbR2 (5' -ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produziram um amplicon de 257 bp.

A reação da PCR continha 12,5 µl de GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs, São Paulo, Brasil) (1x), 0,25 µl de cada *primer* (0,2 µM), 9 µl de água, sem nuclease e 3 µl de DNA (para a reação primária) ou 3 µl produto PCR primário (para a reação secundária).

As amplificações de PCR primárias e secundárias foram realizadas utilizando as mesmas condições de ciclismo: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s, 47°C por 45 s e 72°C por 1 min) e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. Os amplicons da segunda rodada PCR foram purificados utilizando-se a Purificação Qiagen MinElute PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil).

2.4 Análises de sequência de DNA

Todos os amplificadores PCR foram sequenciados usando os *primers* dianteiros e invertidos da PCR pela *Ludwig Biotechnology*, onde um Analisador Genético *ABI-Prism 3500 46* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento pelo método de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados utilizando-se o programa Chromas 2.6. A sequência recém gerada foi comparada com as de *Isospora* spp. e outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). A árvore filogenética foi construída usando a recém-gerada sequência *cox 1* alinhada com sequências para 18 espécies de Isosporídeos disponíveis no GenBank.

Análises de distância e filogenia foram realizadas utilizando-se o MEGA X (Kumar et al., 2018). Resumidamente, os arquivos de cromatografia do sequenciamento pelo método Sanger, foram importados para o MEGA X e as sequências de nucleotídeos foram acuradas, analisadas e alinhadas com sequências de referência do GenBank, utilizando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>).

A história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias computadas utilizando o método “Tamura-Nei” com base na seleção do modelo usando *ModelTest* em MEGA X. As análises de *bootstrap* foram realizadas utilizando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvores inferidas.

3 RESULTADOS

Foram examinados dezenove *B. culicivorus* e quatro (21%) foram positivos para oocistos coccidianos, de um morfotipo não relatado na literatura científica. Estes pula-pulas positivados foram capturados nos meses de novembro de 2014 e agosto de 2018, em uma trilha chamada "Trilha das Borboletas" (22°26'57"S, 44°36'25"O), e em março de 2019 no início da "Travessia Ruy Braga" (22°26'17"S, 44°37'33"O), no Parque Nacional de Itatiaia.

A espécie foi denominada: *Isospora basileuterusi* Mello ; Berto O hospedeiro: *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae), a localidade de obtenção das amostras foi o Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57"S, 44°36'25"O), Brasil, o tipo de material realizado, foram fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução 2,5% de K₂Cr₂O₇ (Williams et al., 2010), depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na coleção de parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P124/2021, as fotografias do espécime hospedeiro (simbiotipo) depositadas na mesma coleção, o sítio do hospedeiro foi desconhecido, a prevalência foi de 21% (4 das 19 aves examinadas).

Uma sequência de COI representativa foi depositada no banco de dados do GenBank sob o número de adesão OM025014. Registro do ZooBank: Para cumprir as normas estabelecidas no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2012) detalhes da nova espécie foram submetidos ao ZooBank. O Identificador de Ciência da Vida (LSID) do artigo é urn:lsid:- zoobank.org:pub:DC2F625C-B798-46DE-84F6-F6883A90E4A5. O LSID para o novo nome *Isospora basileuterusi* Mello ; Berto é urn:lsid:zoobank.org:act:26689BA2-AAC9-4E41-B90E-E40C5934137B. Etimologia: O epíteto específico é derivado do nome do gênero do hospedeiro-tipo.

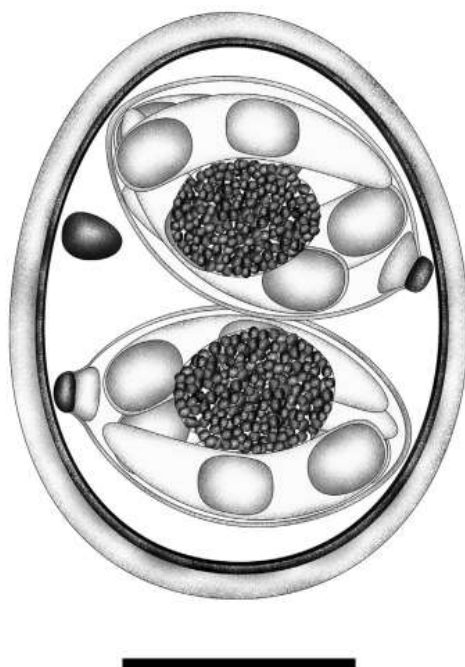


Figura 1. Desenho do oocisto esporulado de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Barra de escala: 10 µm.

3.1 Descrição

Baseada em 25 oocistos e 25 esporocistos; (**Figuras 1 e 2**). Oocistos elipsoidais a ovoidais, 22-28 x 17-23 (25.2 x 21.1); índice morfométrico de 1,1-1,3 (1,20). Parede em camadas, 1,5-1,9 (1.6) de espessura, camada externa lisa. Micrópila e resíduo ausentes, de um a três (geralmente um) grânulos polares presentes, 2.4-3.0 x 1.7-2.4 (2.7 x 2.0). Dois esporocistos, elipsoidais em forma de limão, 14-17 x 8-11 (15,3 x 9,5); Índice morfométrico de 1,4-1,8 (1,61). Corpo de Stieda presente, formato de botão, 0,9-1.1 x 1.7-2.1 (1.0 x 1.8); substieda presente, trapezoidal, 1.1-1.7 x 2.5-2.9 (1.4 x 2.7); corpo de parastieda ausente; esporocistos, resíduo presente, geralmente um distintamente oval a elipsoidal, composto por numerosos grânulos pequenos que parecem ligados à membrana, 4.3-5.2 x 3.5-4.3 (3.9 x 4.8). Quatro esporozoítos, vermiformes, com corpos refráteis anteriores e posteriores e núcleo indiscernível.

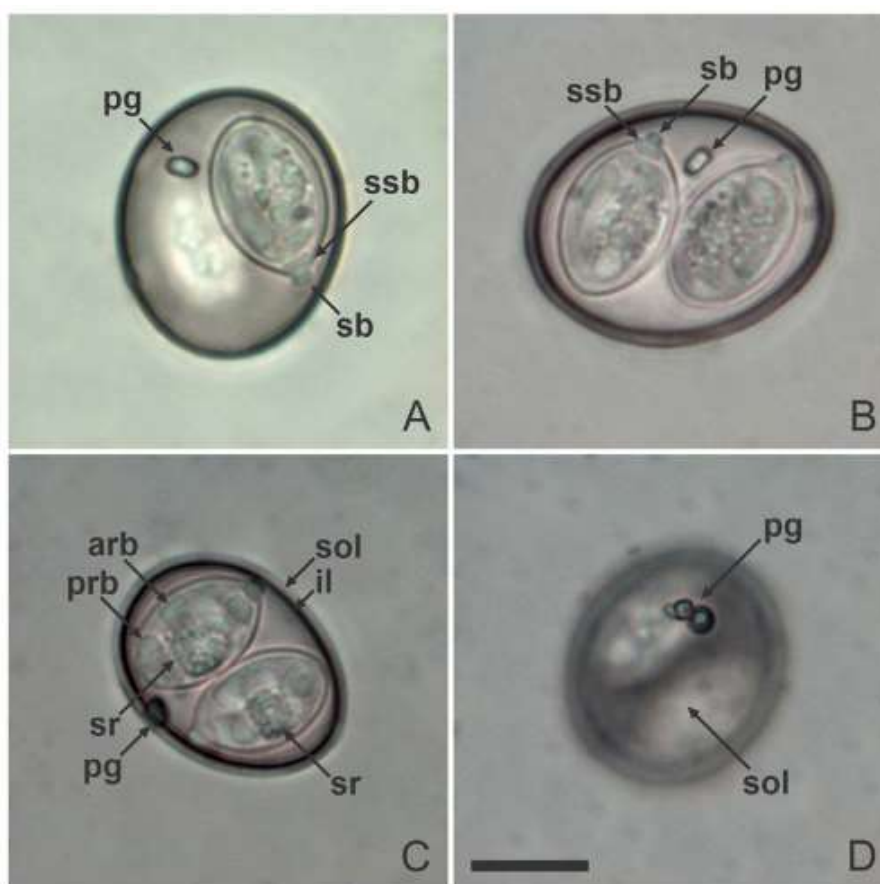


Figura 2. Fotomicrogramas de oocistos esporulados de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Para observação: camadas interiores (il) e exteriores lisas (sol) da parede ovócito; grânulo polar (pg); Corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo do esporocisto (sr); corpos refráteis posteriores (prb) e anteriores (arb). Todos para a mesma escala. Barra de escala: 10 μ m.

3.2 Observações

Até o momento, quatro *Isospora* spp. são registrados de toutinegras (**Tabelas 1 e 2**). Os tamanhos dos oocistos de todas essas espécies são razoavelmente compatíveis com *I. basileuterusi*; no entanto, estes podem ser facilmente distinguidos por algumas características: a nova espécie é a única com esporocistos elipsoidais em forma de limão, com pequeno corpo

de substieda e resíduo do esporocisto ligado à membrana. Além disso, *I. basileuterusi* não possui as características típicas das outras espécies, como a ausência de grânulos polares em *Isospora cardellinae* Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velazquez, García-Conejo, Galindo-Sanchez, Janczur ; Soriano-Vargas, 2016 e *Isospora celata* Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes ; Soriano-Vargas, 2014 (ver Berto et al., 2014b; Salgado-Miranda et al., 2016), a presença de resíduo do oocisto em *I. celata*, o corpo substieda compartimentalizado em *Isospora orbisreinitas* Keeler, Yabsley, Adams ; Hernandez, 2014 e o corpo substieda grande e trapezoidal em *Isospora piacobrai* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2010 (Berto et al. (2009); Keeler et al., (2014).

Isospora basileuterusi também difere morfológicamente da *Isospora* spp. (**Figura 3**), *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot ; Ryan, 2015 e *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira ; Berto, 2020. Como características principais da nova espécie, são observados esporocistos elipsoidais, em forma de limão, corpo substieda pequeno e membrana ligada ao resíduo do esporocisto, não observadas em *I. serinuse* e *I. oliveirai*.

3.3 Análise filogenética

A amplificação de DNA do oocisto de *I. basileuterusi* mostrou uma faixa clara de c.250 bp. A análise filogenética incluiu 18 sequências para isospora aviária disponível no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi usado como grupo externo. *Isospora basileuterusi* está em um clado com a maior semelhança a *I. serinuse* (99,5%), dos canários da ilha Serinus canaria (L.) na Austrália Ocidental (Yang et al., 2015). Ademais, *I. basileuterusi* está intimamente relacionada (95-97%) a *I. oliveirai* do Flautim *Schiffornis virescens* (Lafresnaye) no sudeste do Brasil e *Isospora* spp., encontrado de turdídeos (Turdidae) e tetras (Paridae) na República Tcheca (Trefancova; Kvicero, 2019; Ortúzar-Ferreira et al., 2020).

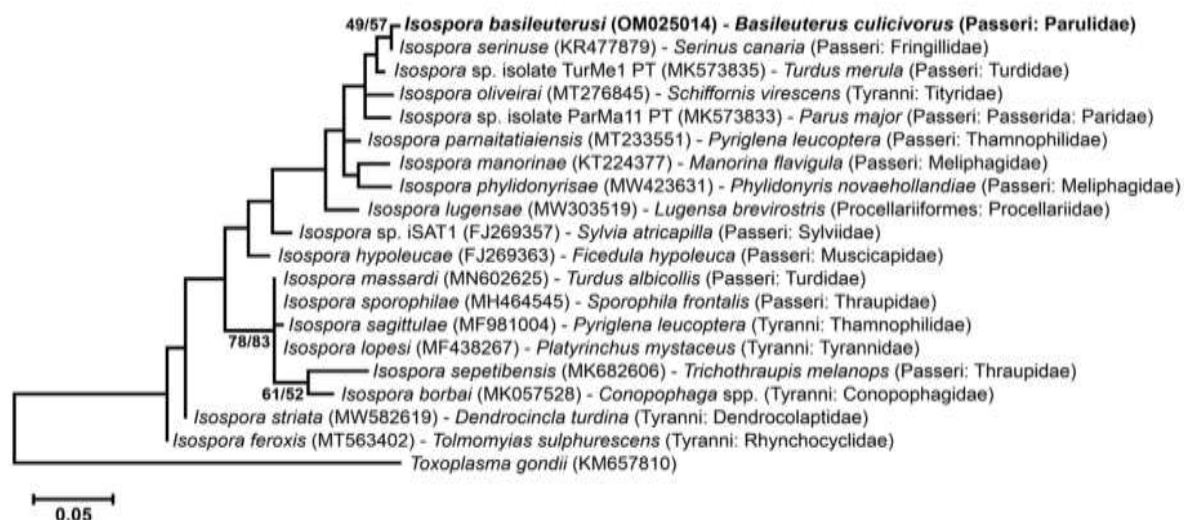


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança para *Isospora* spp., estimada a partir das sequências cox1. Os números nos nós representam o suporte ao bootstrap (1.000 replicações; apenas os valores > 50% mostrados) para "Neighbor-Joining" e "Maximum Likelihood", respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

Tabela 1. Dados morfológicos comparativos para oocistos de *Isospora* spp. registrados de toutinegras (Parulidae).

Espécie	Hospedeiro	Oocisto							Referências
		Formato	Tamanho	Índice de forma	Grânulo Polar	Resíduo do oocisto	Parede	Micrópila	
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello; Berto	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	elipsoidal a ovoidal	22–28 × 17–23 (25.2 × 21.1)	1.1–1.3 (1.20)	presente, 1–3 (usualmente um)	ausente	1.5–1.9 (1.6)	ausente	Presente estudo
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur; Soriano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson, 1827)	subsférico	23–28 × 23–27 (26.6 × 25.4)	1.0–1.1 (1.1)	ausente	ausente	1.2–1.4 (1.3)	ausente	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes; Soriano-Vargas, 2014	<i>Leiothlypis celata</i> (Say, 1823)	subsférico	27–30 × 25–28 (28 × 26)	1.0–1.1 (1.1)	ausente	presente	1.0–1.3 (1.2)	ausente	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbisreinitas</i> Keeler, Yabsley, Adams; Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson, 1838)	subsférico a ovoidal	21–28 × 19–25 (24.3 × 22.3)	1.0–1.3 (1.0)	Ausente ou presente, 0–4	ausente	–	ausente	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobrai</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin, 1789)	subsférico a ovoidal	21–26 × 20–24 (23.5 × 21.6)	1.1–1.1 (1.1)	presente, 1	ausente	–	ausente	Berto et al. (2009)

Tabela 2. Dados morfológicos comparativos para esporocistos de *Isospora* spp. registrados de toutinegras (Parulidae).

Espécie	Hospedeiro	Esporocisto						Referências
		Formato	Tamanho	Índice de forma	Corpo de Stieda	Corpo de substieda	Resíduo do esporocisto	
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello; Berto	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	Elipsoidal à forma de limão	14–17 × 8–11 (15.3 × 9.5)	1.4–1.8 (1.61)	presente, semelhante a um botão, 0.9–1.1 × 1.7–2.1 (1.0 × 1.8)	presente, trapezoidal, 1.1–1.7 × 2.5–2.9 (1.4 × 2.7)	grânulos ligados por membrana	presente estudo
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur; Soriano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson, 1827)	Ovoidal	18–20 × 11–13 (19.0 × 12.0)	1.6–1.8 (1.7)	presente, semelhante a um botão, (1.1 × 2.4)	presente, trapezoidal à arredondado, às vezes com base irregular, (1.8 × 4.5)	Esférulas espalhadas	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes; Soriano-Vargas, 2014	<i>Leiothlypis celata</i> (Say, 1823)	Ovoidal	15–20 × 11–14 (18 × 13)	1.4–1.5 (1.4)	presente, semelhante a um botão, (1.0 × 2.5)	presente, irregular, quase imperceptível, (1.5 × 4.0)	Esférulas espalhadas	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbisreinitas</i> Keeler, Yabsley, Adams; Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson, 1838)	Ovoidal	12–19 × 10–14 (16.0 × 11.8)	1.0–1.9 (1.4)	presente, semelhante a um botão	presente, proeminente, trapezoidal e compartimentado	muitos grânulos difundidos	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobrai</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin, 1789)	Ovoidal	15–17 × 9–12 (15.8 × 10.5)	1.4–1.6 (1.5)	present, em forma de botão e proeminente, (1.0 × 1.7)	presente, grande, trapezoidal e homogêneo, (2.3 × 4.8)	grânulos de diferentes tamanhos	Berto et al. (2009)

4 DISCUSSÃO

Duszynski; Wilber (1997) compilaram quase todos os estudos taxonômicos de coccídios de Passeriformes. Aconselharam que novas identificações de coccídios devem ser baseadas em morfologia comparativa entre espécies coccidianas registradas na mesma família hospedeira. Nesse sentido, o morfotipo observado a partir dos pula-pula *I. basileuterusi*, neste estudo, foi comparado com as quatro espécies coccidianas registradas da família Parulidae, como mostrado nas **Tabelas 1 e 2**.

Isospora basileuterusi difere em várias características, mas pode ser principalmente diferenciada de outros coccídios pela forma típica de limão de seus esporocistos. O hospedeiro da nova espécie coccidiana descrita aqui, o pula-pula *B. culicivorus*, possui ampla distribuição na região neotropical, do México ao sul da América do Sul (Pacheco et al., 2021). No entanto, de acordo com a BirdLife International (2021), esta espécie é o pula-pula coroadado com listras, que está restrito ao México e à América Central, não ocorrendo no Brasil. Essa desinformação se deve ao status de espécie/subespécie dentro do gênero *Basileuterus* Cabanis. A BirdLife International (2021), reclassificou algumas subespécies de *B. Culicivorus* ao nível da espécie, como *Basileuterus culicivorus auricapilla* (Swainson, 1838), que foi reclassificada ao nível da espécie, como *Basileuterus auricapilla* Swainson, 1838.

Portanto, este estudo seguiu o nome listado pelo Comitê Nacional de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021); cumpre ressaltar que o espécime de aves neste estudo é identificado como *B. auricapilla* pela BirdLife International (2021). De qualquer forma, independentemente da identificação específica dentro de *Basileuterus*, devido às amplas distribuições geográficas de pula-pula (Parulidae) nas Américas, suas espécies coccidianas devem ser igualmente distribuídas por toda a região neotropical.

No presente estudo, a identificação molecular de *I. basileuterusi* foi realizada utilizando-se o gene COI, que é considerado o gene com maior resolução na detecção de eventos de especiação recentes (Barta, 2001; Ogedengbe et al., 2011). Na verdade, a sequência genética de 250 bp COI não foi 100% semelhante a qualquer outra depositada no GenBank, ao contrário do que ocorre com sequências genéticas ribossômicas que são mais conservadas e mais adequadas para estudos filogenéticos de famílias e ordens (Genovez-Oliveira et al., 2020). Por outro lado, a região do COI sequenciada para *I. basileuterusi* não apresentou resultados conclusivos relacionados à ancestralidade, como vinculado à família hospedeira, região biogeográfica, morfologia, biologia da espécie coccidiana, etc. (**Figura 3**). Observou-se também que a amostra de DNA de *Isospora* spp. amplificada e sequenciada com os *primers* (Dolnik et al., 2009) utilizados no presente estudo, são exclusivamente incluídos na filogenia, como nos estudos de Yang et al. (2015) e Silva-Carvalho et al. (2018).

Talvez, a pequena sequência de apenas 250 bp não permitisse maior resolução no estudo filogenético; neste caso, sequências com mais de 600 bp de outras regiões do gene COI, como as geradas pela cartilha JAV (Genovez-Oliveira et al., 2020), apresentariam melhores estimativas filogenéticas no futuro. Infelizmente, no presente estudo, esses *primers* JAV não tiveram sucesso na amplificação das amostras; no entanto, tem sido demonstrado em qualquer caso, que genes mitocondriais, como o COI, são mais adequados para trabalhar com oocistos individuais, pois o número de cópias de DNA mitocondrial é muito maior do que o número de cópias de DNA nuclear, favorecendo assim a amplificação de genes mitocondriais (Dolnik et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

A comparação de *I. basileuterusi* com *Isospora* spp. descritas a partir de pula-pulas neotropicais apoia claramente a designação como uma espécie única. Portanto, *I. basileuterusi* é considerada como nova espécie para a ciência, sendo a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através do sequenciamento do gene COI.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTA, J.R., 2001. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Vet. Parasitol.* 101, 175–186. Berto, B.P., Luz, H.R., Flausino, W., Ferreira, I., Lopes, C.W.G., 2010. *Isospora piacobrai* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the masked yellowthroat *Geothlypis aequinoctialis* (Gmelin) (Passeriformes: Parulidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 75, 225–230.
- BERTO, B.P., MCINTOSH, D., LOPES, C.W.G., 2014a. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista brasileira de Parasitologia*. Vet. 23, 1–15.
- BERTO, B.P., MEDINA, J.P., SALGADO-MIRANDA, C., GARCÍA-CONEJO, M., JANCZUR, M.K., LOPES, C.W.G., SORIANO-VARGAS, E., 2014b. *Isospora celata* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the orange-crowned warbler *Oreothlypis celata* (Say) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. *Systematic Parasitology*, 89, 253–257.
- BERTO, B.P., LOPES, C.W.G., 2020. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *J. Parasitol.* 106, 707–713. **BirdLife International**, 2021. IUCN Red List for birds. Available from: <http://www.birdlife.org> (Accessed 22 December 2021).
- DIAS, B.F.S., 1992. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos Recursos Naturais Renováveis. Fundação **Pro-Natureza**, Brasília.
- DOLNIK, O.V., PALINAUSKAS, V., BENSCH, S., 2009. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal Parasitology*, 95, 169–174.
- DUSZYNSKI, D., WILBER, P., 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal Parasitology*, 83, 333–336.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M., et al., 2020. Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology International*. 75, 102040.
- ICMBIO, 2021. Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. (Accessed 22 December 2021). 57 ICZN, 2012. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bulletin Zoological Nomenclature*. 69, 161–169.
- KEELER, S.P., YABSLEY, M.J., ADAMS, H.C., HERNANDEZ, S.M., 2014. A novel *Isospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from warblers (Passeriformes: Parulidae) of Costa Rica. *Journal Parasitology*, 100, 302–304.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and*

Evolution, 35, 1547– 1549. Lima, A.L.D.C., Manhães, M.A., 2009. Hábitos alimentares de *Basileuterus culicivorus* (Aves: Parulidae) em uma área de Mata Atlântica secundária, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, 9, 137–143.

MARINI, M.A., CAVALCANTI, R.B., 1993. Habitat and foraging substrate use of three *Basileuterus* warblers from central Brazil. **Ornitología Neotropica**, 4, 69–76.

OGEDENGBE, J.D., HANNER, R.H., BARTA, J.R., 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **Internacional Journal Parasitology** . 41, 843–850.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., MELLO, E.R., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A.A., et al., 2020. *Isospora oliveirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. **Acta Parasitologica**. 65, 843–851.

PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A., AGNE, C.E., BENCKE, G.A., BRAVO, G.A., et al., 2021. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. **Ornithology Research**, 29, 94–105.

SALGADO-MIRANDA, C., MEDINA, J.P., ZEPEDA-VELAZQUEZ, A.P., GARCÍA-CONEJO, M., GALINDO SANCHEZ, K.P., JANCZUR, M.K., SORIANO-VARGAS, E., 2016. *Isospora cardellinae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red warbler *Cardellina rubra* (Swainson) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. **Systematic Parasitology**, 93, 825–830.

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

SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G.N., GOMES, J.V., SIQUEIRA, P.B., RODRIGUES, M.B., LIMA, V.M., BERTO, B.P., 2018. *Isospora lopesi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463. 58

TREFANCOVA, A., KVICEROVA, J., 2019. *Isospora svecica* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of coccidium from the white-spotted bluethroat *Luscinia svecica cyanecula* (Aves: Passeriformes: Muscicapidae). **Parasitology Resource**. 118, 3043–3051.

WILLIAMS, R.B., THEBO, P., MARSHALL, R.N., MARSHALL, J.A., 2010. Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**. 76, 69–76.

YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A., RYAN, U., 2015. *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

CAPÍTULO III

***Isospora leptopogoni* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PAPA-MOSCAS
Leptopogon amaurocephalus, Tschudi, 1846 (PASSERIFORMES:
RHYNCHOCYCLIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO

As espécies de protozoários coccidianos registradas a partir de muscicapídeos são poucas, mas foram descritas com uma certa frequência nos últimos anos. Neste contexto, o presente estudo descreve um novo *Isospora* sp. de papa-moscas *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846, capturados no Parque Nacional Itatiaia, em uma área de reflorestamento que fica a cerca de 60 km dos limites do parque, além de fornecer uma identificação molecular através da sequenciação do gene citocromo mitocondrial c 1 oxidase. *Isospora leptopogoni* tem oocistos subsferoidais a ovoidal, medindo em média 22,0 x 19,7 µm, com uma parede lisa, bicamada, c.1,7 µm de espessura. A micrópila é delicada a discreta. O resíduo do oocisto é ausente, com um a três grânulos polares presentes. O esporocisto é em formato de limão, medindo em média 14,7 x 9,3 µm, com um corpo de Stieda semelhante a botão e um corpo substieda retangular a arredondado. O resíduo do esporocisto está presente, é constituído por grânulos compactos delimitados. Os esporozoítas são vermiformes, com corpos refráteis e núcleos. *Isospora leptopogoni* difere de outras *Isospora* spp., principalmente devido aos seus esporocistos em forma de limão, a presença de micrópila e detalhes de Stieda e corpo de substieda. A análise filogenética demonstrou *I. leptopogoni* perto de outra *Isospora* spp. registrada a partir de hospedeiros filogeneticamente relacionados e da mesma região biogeográfica. Por fim, a constatação recorrente desta espécie coccidiana no mesmo espécime *L. Amaurocephalus*, numa localidade específica no Parque Nacional da Itatiaia, sugere que a dispersão de *I. leptopogoni* necessita de transmissões contínuas entre Passeriformes suscetíveis, uma vez que a área de movimento de cada espécime de *L. amaurocephalus* aparenta ser pequena.

Palavras-chave: muscicapídeos, *Isospora*, Parque Nacional Itatiaia.

ABSTRACT

Coccidian protozoan species recorded from flycatchers are few, but they have been described with a certain frequency in recent years. In this context, the present study describes a new *Isospora* sp. from sepia-capped flycatchers *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 captured in the Itatiaia National Park and in a reforestation area which is about 60 km away from the park boundaries, in addition to providing a molecular identification via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. *Isospora leptopogoni* has oöcysts that are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 22.0 x 19.7 µm, with a suave, bilayered wall, c.1.7 µm thick. The micropyle is delicate or inconspicuous. Oöcyst residuum is ausente, but one to three polar granules are present. Sporocysts are lemon-Formad, measuring on average 14.7 x 9.3 µm, with a knob-like Stieda body and a rectangular to rounded sub-Stieda body. Sporocyst residuum is present, consisting of compactly bounded granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies and nucleus. *Isospora leptopogoni* is different from other *Isospora* spp. mainly due to its lemon-Formad sporocysts, the presence of micropyle and details of Stieda and sub-Stieda bodies. Phylogenetic analysis placed *I. leptopogoni* close to other *Isospora* spp. recorded from phylogenetically related hosts and from the same biogeographic region. Finally, the recurrent finding of this coccidian species in the same *L. amaurocephalus* specimen in a specific locality in the Itatiaia National Park suggests that the dispersion of *I. leptopogoni* needs continuous transmissions between susceptible passerines as the area of movement of each *L. amaurocephalus* specimen appears to be quite small.

Keywords: muscicapídeos, *Isospora*, Parque Nacional Itatiaia.

1 INTRODUÇÃO

A Parvordem Tyrannida é composta por 320 espécies de Passeriformes distribuídas em 10 famílias diferentes no Brasil: Pipridae, Cotingidae, Tityridae, Oxyruncidae, Onychorhynchidae, Pipritidae, Platyrinchidae, Tachurisi-dae, Rhynchocyclidae e Tyrannidae (Pacheco et al., 2021). Além do Brasil, a distribuição geográfica dessa Parvordem se estende por toda a América, porém, são mais predominantes na Região Neotropical (BirdLife International, 2022).

Leptopogon amaurocephalus Tschudi é um Passeriforme, Rhynchocyclid, comumente nomeado como papa-moscas no Brasil (Pacheco et al., 2021). Esta espécie ocorre em quase toda a região neotropical, tanto em lados cis como transandina. No Brasil é observado principalmente no bioma Mata Atlântica, nas regiões Sul e Sudeste (BirdLife International, 2022). Vive sozinho ou em pares, forrageando videiras e galhos finos em áreas expostas da parte interna da floresta (SICK, 1997). Por viver afastado do solo e ter hábito alimentar insetívoro, é menos predisposto a enteroparasitas de transmissão fecal-oral (Dolnik et al., 2010). Há um relato de enteroparasitismo por protozoário coccidiano (Lopes et al., 2013).

Os coccídios compreendem muitos gêneros e espécies de parasitas de animais domésticos e silvestres, causando morbidade e mortalidade principalmente em condições de desequilíbrio entre hospedeiro e meio ambiente (Berto; Lopes, 2020). Algumas espécies coccidianas de Tyrannida, são registradas das famílias Cotingidae, Tityridae, Platyrinchidae, Rhynchocyclidae e Tyrannidae.

Nesse contexto, o presente estudo fornece uma descrição e identificação molecular de uma nova espécie de *Isohora* a partir de papa-moscas *L. amaurocephalus* capturados em diferentes localidades da região de Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas de amostras

Foram realizadas nove expedições em duas localidades diferentes da Região de Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, que estão a cerca de 60 km uma da outra: (1) Parque Nacional de Itatiaia, unidade de conservação federal brasileira de alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2022); e (2) uma área de reflorestamento de 37 ha, dentro do campus Pinheiral do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ, que é identificado como Espaço Ecológico Educativo – EEcoE de Pinheiral, no Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.

Oito expedições foram realizadas, em novembro (22°26'57"S, 44°36'25"O) e dezembro (22°27'20"S, 44°36'28"O) 2014, março (22°27'40"S, 44°35'32"O) e abril (22°27'52"S, 44°36'26"O) 2015, outubro (22°27'40"S, 44°35'32"O) 2016, junho (22°27'40"S, 44°36'51" O) e novembro (22°26'57"S, 44°36'25"O) 2017, e agosto (22°26'57"S, 44°36'25"O) 2018, no Parque Nacional de Itatiaia.

A última expedição foi realizada em janeiro (22°31'37"S, 43°59'45"O) 2019, no EEcoE/IFRJ.

Redes de neblina foram usadas para a captura dos pássaros.

Onze papa-moscas *L. amaurocephalus*, no Parque Nacional de Itatiaia e um no EEcoE/IFRJ, foram capturados. As aves foram identificadas especificamente (Ridgely et al., 2015), fotografadas e agrupadas com anilhas de metal, numeradas, fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação (CEMAVE). Posteriormente, as aves foram mantidas em

caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, sendo soltas no mesmo local de captura.

Gotículas frescas de fezes (c.0,1 g), de cada pássaro, foram colocadas, individualmente, em um tubo de centrífuga com um dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) solução (Dolnik, 2006).

2.2 Análise Morfológicas

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram incubadas nos tubos de centrífugas, e regularmente oxigenadas por movimento mecânico, em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, por 7 dias. Os oocistos foram recuperados pelo método de Sheather's e identificados microscopicamente de acordo com Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014). As observações morfológicas, desenhos, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binóculo Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Os desenhos foram editados usando dois aplicativos de software (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 2020, Corel Corporation, Ontario, Canadá). Todas as medidas estão em micrômetros.

2.3 Análise Moleculares

Um único oocisto da amostra foi isolado, após diluições seriadas, em gotas sobre uma lâmina de microscópio, utilizando-se uma micropipeta estéril. O oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até que o sobrenadante clarificar (Dolnik et al., 2009).

O DNA foi extraído do oocisto utilizando o Kit *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, São Paulo, Brazil) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA, a fim de alcançar a ruptura completa dos oocistos.

A amplificação, via PCR, de um fragmento parcial do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) (c.250 bp) foi realizada utilizando o nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os amplicons do nested PCR foram purificados utilizando a Purificação PCR Qiagen MinElute (Qiagen, São Paulo, Brasil).

2.4 Análises de sequência de DNA

Após o nested PCR, os amplicons foram sequenciados utilizando um Analisador Genético *ABI-Prism 3500* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). A sequência recém gerada foi comparada com as de *Isospora* spp. Disponível no banco de dados do GenBank usando a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

A árvore filogenética foi construída usando a recém gerada sequência de COI, alinhada com *Isospora* spp., disponível no GenBank.

O alinhamento, análises de distância e filogenias foram realizados utilizando *Clustal W* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) em MEGA X (Kumar et al., 2018).

A história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias computadas utilizando o método “Tamura-Nei”, com base na seleção de modelos utilizando *ModelTest* em MEGA X.

As análises de *bootstrap* foram realizadas usando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade de topologias de árvores inferidas.

3 RESULTADOS

Nove (84%), dos onze papa-moscas *L. amaurocephalus*, capturados no Parque Nacional do Itatiaia testaram positivo para oocistos coccidianos. O papa-moscas capturado no EEcoE/IFRJ também foi positivo. Os oocistos possuem um morfotipo distinto daquelas espécies coccidianas registradas como parasitas de Tyrannida.

A descrição da amostra é da Família Eimeriidae Minchin, 1903, o gênero *Isospora* Schneider, 1881, a espécie denominada *Isospora leptopogoni* Melo; Berto O hospedeiro *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi (Passeriformes: Tyranni: Tyrannides: Tyrannida: Rhynchocyclidae: Pipromorphinae), papa-moscas. Localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22°27'20"S, 44°36'28"O), sudeste do Brasil. Outra localidade: Espaço Ecológico Educativo (22°31'37"S, 43°59'45"O), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, campus Pinheiral, sudeste do Brasil.

Fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução 2,5% de K₂Cr₂O₇ (Williams et al., 2010) estão depositados e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) e na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P-124/2021. As fotografias do espécime hospedeiro (simbiotipo) são depositadas na mesma coleção. Sítio do hospedeiro: Desconhecido. Prevalência: 84% (10 das 12 aves examinadas).

Uma sequência de COI representativa foi depositada no banco de dados do GenBank sob o número de adesão OM568833. Registro do ZooBank: Para cumprir as normas estabelecidas no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2012) detalhes da nova espécie foram submetidos ao ZooBank.

O Identificador de Ciência da Vida (LSID) do artigo é is urn:lsid:zoobank.org:pub:3E3A9902-B7AE-407E-89AA8A4624080B49. O LSID para o novo nome *Isospora leptopogoni* Melo ; Berto is urn:lsid:zoobank.org:act:14DAD073-D779-4762-A92AAB88F5D6D253.

Etimologia: O epíteto específico é derivado do nome do gênero do tipo-hospedeiro.

3.1 Descrição

Oocisto (n = 63), formato subesferoidal a ovoidal, 19–25 x 18–23 (22,0 x 19,7); índice morfométrico de 1,0–1,3 (1,12). Parede bicamadas, 1,5–1,9 (1,7) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Micrópila delicada ou discreta, 2,3–5,0 (3,8) de largura. Resíduo do oocisto ausente, 1–3 grânulos polares presentes. Esporocisto em forma de limão, 12–17 x 8–11 (14,7 x 9,3); índice morfométrico de 1,3–1,8 (1,58). Corpo de Stieda presente, semelhante a um botão, 0,9–1,3 de altura x 1,6–2,2 de largura (1,1 x 1,8). Corpo substieda presente, retangular a arredondado, 1,3–2,2 de altura x 1,4–2,8 de largura (1,6 x 2,1). Corpo de parastieda ausente. Resíduo do esporocisto presente, constituído por grânulos compactos delimitados. 4.1–7.3 x 3.7–6.8 (5.6 x 5.1). Esporozoítos vermiformes, com corpos refratários anteriores e posteriores e núcleo central. (**Figuras 1, 2A–F**).

3.2 Análise filogenética

A amplificação do DNA do oocisto de *I. leptopogoni* apresentou uma banda clara de c.250 pb. As sequências de dois oocistos individuais de duas amostras de aves diferentes, foram obtidas e foram 100% idênticas entre si. A análise filogenética incluiu 25 sequências para *Isospora* spp. disponíveis no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi usado como o grupo externo.

Isospora leptopogoni foi demonstrado em um pequeno grupo monofilético com

Isospora borbai Silva-Carvalho; Berto, 2019, *Isospora lopesi* Silva-Carvalho; Berto, 2018 e *Isospora sagittulae* McQuistion e Capparella, 1992, que também são parasitas de suboscines passerines (Tyranni) da Região Neotropical (Silva-Carvalho et al., 2018a, 2018b, 2019).

O grupo destes três coccídios de suboscinas, foi incluído dentro de um clado maior com *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira ; Lopes, 2014, *Isospora sporophilae* CarvalhoFilho, Meireles, Ribeiro ; Lopes, 2005, *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2008 e *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2010, que também são parasitas de Passeriformes da Região Neotropical, embora sejam oscinas Passeriformes (Rodrigues et al., 2019, Genovez-Oliveira et al., 2019, 2020). Todos esses *Isospora* spp. apresentaram a maior similaridade de 99% com *I. leptopogoni*.

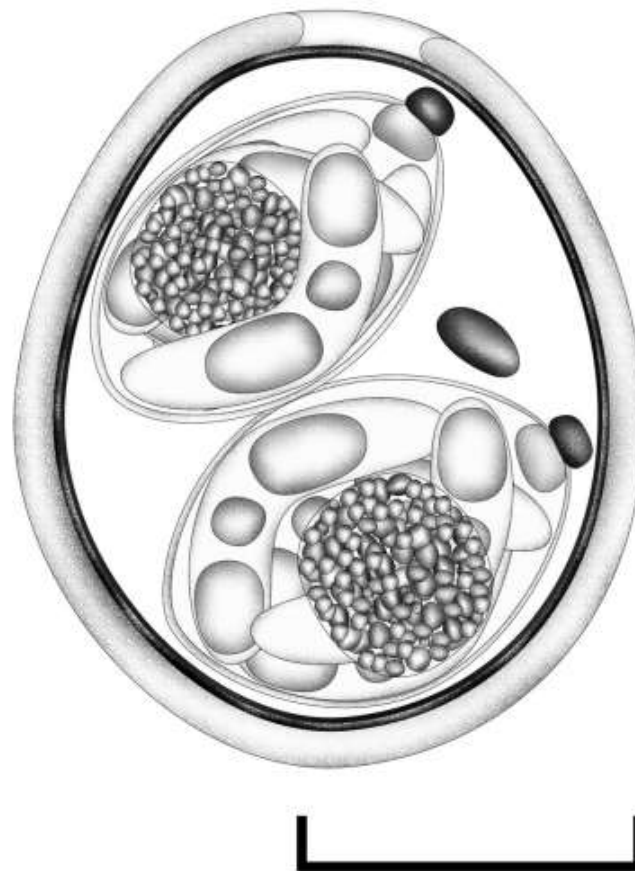


Figura 1. Desenho de linha do oocisto esporulado de *Isospora leptopogoni* de papa-moscas, na América do Sul. Barra de escala: 10 μ m.

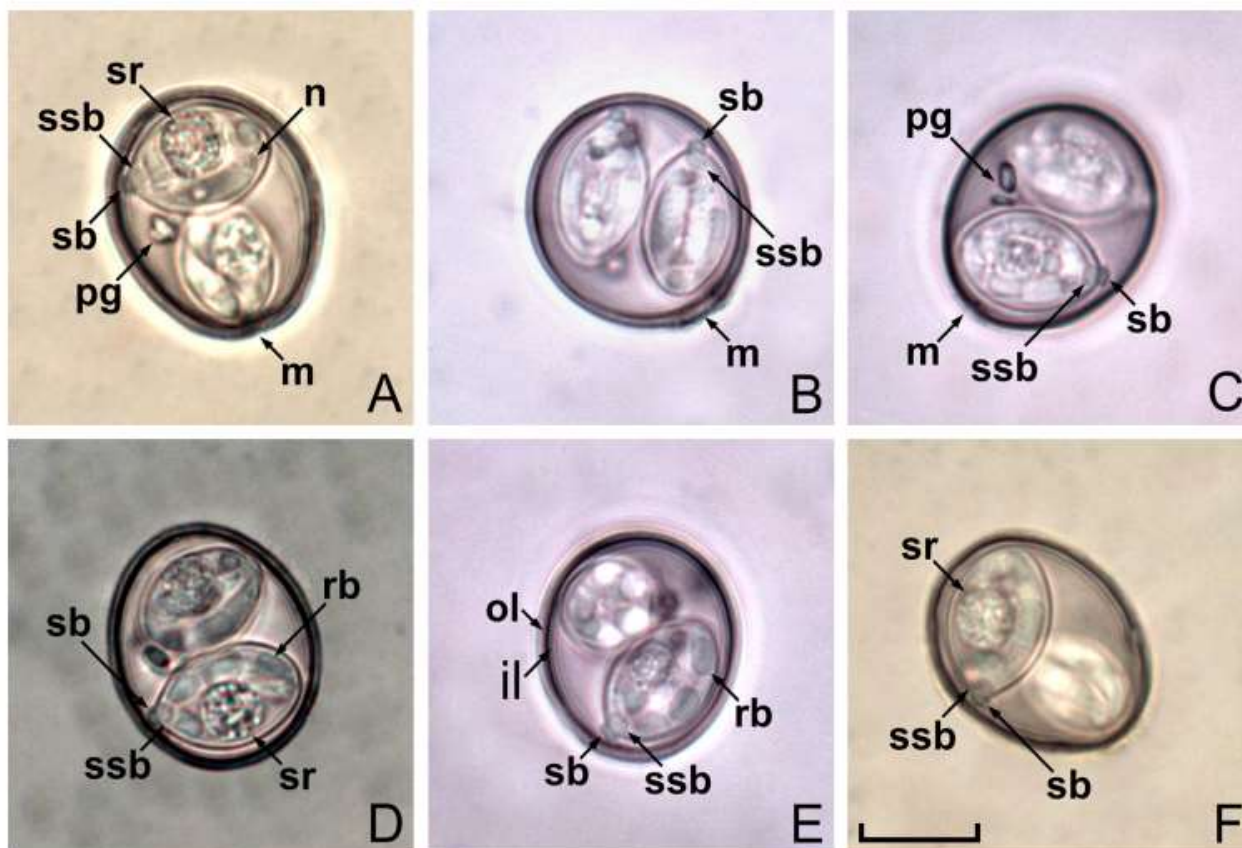


Figura 2. Fotomicrografias de *Isospora leptopogoni* recuperadas de papa-moscas na América do Sul. Observe a camada interna (il) e externa lisa (sol) da parede do cisto oo, micrópila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refratário (rb), resíduo de esporocisto (sr) e corpo de Stieda (sb) e sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 μ m.

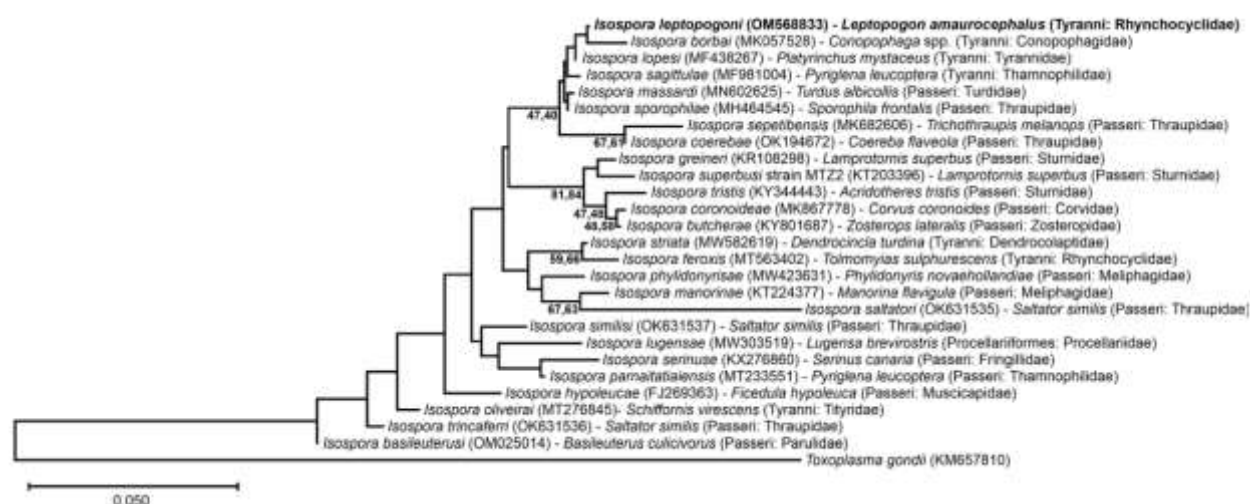


Figura 3. Árvore pelo método de “Neighbor-Joining” estimada a partir das sequências gênicas COI de espécies de *Isospora*. Bootstrap a 1.000 replicações (>40%) para “Neighbor-Joining” (NJ) e “Máxima verossimilhança” (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

4 DISCUSSÃO

Desde a revisão taxonômica de coccidia de aves passeriformes do Novo Mundo, por Berto et al. (2011), que se baseia nas diretrizes de Duszynski; Wilber (1997), relatos e descrições de coccidia passeriformes têm sido estudados e registrados de acordo com a família hospedeira passeriforme. No entanto, existe atualmente uma inconsistência na taxonomia do Aves quando se comparam diferentes fontes bibliográficas, mesmo que atualizadas. Neste caso, a BirdLife International (2022) classifica *L. amaurocephalus* como Tyrannidae, enquanto o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021) considera várias famílias menores organizadas em parvordens, superfamílias e subfamílias, derivadas da grande família tradicional Tyrannidae.

Como o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos é a principal fonte bibliográfica de taxonomia de Aves no Brasil e estabelece mais grupos de classificação facilitando a delimitação de hospedeiros passeriformes filogeneticamente mais próximos e distantes, esta classificação foi utilizada para este estudo.

Dos Rhynchocyclidae, que é a família de *L. amaurocephalus*, apenas duas espécies coccidianas são registradas; portanto, este estudo comparou os oocistos obtidos de *L. amaurocephalus* com *Isospora* spp. registrados de passeriformes da parvordem Tyrannida. Das dez famílias observadas em Tyrannida, apenas cinco têm espécies coccidianas registradas, como mostra a (**Tabela 1**). *Isospora leptopogoni* pode ser facilmente distinguido dos seis *Isospora* spp. registrados de Tyrannida pelo esporocisto em forma de limão, e corpo de Stieda semelhante a um botão e corpo de substieda retangular a arredondada. Além disso, é o único desses *Isospora* spp. a apresentar oocistos lisos com uma micrópila delicada ou discreta (**Tabela 1**). Um *L. amaurocephalus* capturado em novembro de 2017, em uma trilha denominada “Trilha das Borboletas” (22°26'57"S, 44°36'25"O), no Parque Nacional do Itatiaia, foi recapturado nove meses depois, em agosto de 2018, na mesma localidade. Este cabeçudo foi cercado com o anel numérico 'C114236' (CEMAVE).

Ambas as amostras coletadas em 2017 e 2018 foram positivas para *I. leptopogoni*, mas com baixas densidades de 81 e 74 oocistos por gota fecal, respectivamente (Dolnik, 2006). Este achado sugere que os espécimes de *L. amaurocephalus* não se movem por longas distâncias individualmente, sendo provavelmente restritos a pequenas áreas de movimento. Nesse pensamento, a dispersão de *I. leptopogoni* depende de transmissões frequentes entre espécimes de *L. amaurocephalus* ou outras espécies hospedeiras, suscetíveis, que estão distribuídas na região de Médio Paraíba onde este estudo foi desenvolvido, uma vez que a dispersão de coccidia por um único espécime seria bastante restrita a pequenas áreas.

Cumprе ressaltar, ainda, que as baixas densidades e a ausência de sinais clínicos observados neste espécime 'C114236', em diferentes momentos, é compatível com o bom estado de conservação do Parque Nacional do Itatiaia (Berto; Lopes, 2020).

O *primer* utilizado para amplificar e sequenciar a região gênica de *250 pb de COI neste estudo tem sido considerado inadequado para estudos filogenéticos, embora esteja sendo razoavelmente apropriado para a delimitação de *Isospora* spp. de passeriformes até então (Genovez-Oliveira et al., 2020; Maronezi et al., 2022; Mello et al., 2022). Ou seja, apesar de algumas sequências de *Isospora* spp. de Passeriformes serem 100% idênticas entre si para essa mesma região gênica quando analisadas pelo BLAST, *I. leptopogoni* não foi 100% idêntica a nenhuma sequência depositada no GenBank.

Na análise filogenética (Figura 3), a sequência de *I. leptopogoni* esteve próxima a espécies coccidianas de passeriformes filogeneticamente próximos e da mesma região biogeográfica; embora outros *Isospora* spp. também de Passeriformes filogeneticamente relacionados, como *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009a, 2009b, estivessem distantes na análise filogenética.

Tabela 1. Morfologia comparada de *Isospora* spp., registrada em aves Tyrannida.

Espécies	Hospedeiro	Referência	Oocisto					
			Forma	Tamanho (µm)	L/W ratio	Grânulo polar	Parede	Micrópila
<i>Isospora araponga</i> Doležalová, Torres, Fernández; Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	subesferoidal to elipsoidal	17–22 × 14–16 (19 × 15)	1.1–1.4 (1.3)	1–3	suave	ausente
<i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	subesferoidal	18–20 × 17–20 (19 × 18)	1.0–1.1 (1.1)	geralmente 2	baixa rugosidade	ausente ¹
	<i>M. ferox</i> (Tyrannidae: Tyranninae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	subesferoidal	21–23 × 20–23 (22 × 21)	1.0–1.1 (1.0)	1–3 (geralmente 2 bonded)	rugosidade baixa a moderada	presente
	<i>Tolmomyias sulphureus</i> Spix (Rhynchocyclidae: Rhynchocyclinae)			18–23 × 18–22 (20 × 20)	1.0–1.1 (1.0)			
<i>Isospora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	Berto et al. (2009b)	elipsoidal	26–31 × 19–23 (28 × 21)	1.2–1.4 (1.3)	geralmente 1-2	suave	ausente
<i>Isospora attilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)	Rodrigues et al. (2015)	subesferoidal a elipsoidal	18–22 × 18–21 (20 × 19)	1.0–1.2 (1.1)	1–2	suave	ausente
<i>Isospora lopesi</i> Silva-Carvalho; Berto, 2018	<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	subesferoidal a ovoidal	18–24 × 18–22 (21 × 20)	1.0–1.2 (1.1)	1	suave	ausente
<i>Isospora oliveirai</i> Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye) (Tityridae: Schiffornithinae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	Subesferoidal	24–28 × 23–27 (26 × 25)	1.0–1.1 (1.0)	1–6	ligeiramente áspero	ausente
<i>Isospora leptopogoni</i> Mel ; Berto	<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	presente estudo	subesferoidal a ovoidal	19–25 × 18–23 (22 × 20)	1.0–1.3 (1.1)	1–3	suave	presente, delicada ou discreto

Tabela 1. Morfologia comparativa de *Isospora* spp., registrada em aves Tyrannida (Continuação).

Espécies	Hospedeiro	Referência	Esporocisto					
			Forma	Tamanho (µm)	L/W ratio	Corpo de Stieda	Corpo de Sub-Stieda	Resíduo do esporocisto
<i>Isospora araponga</i> Doležalová, Torres, Fernández; Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	elipsoidal ligeiramente assimétrica	12–13 × 7–9 (12 × 8)	1.3–1.7 (1.5)	pouco visível	ausente	compacto
<i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	ovoidal	11–13 × 8–10 (12 × 8)	1.0–1.5 (1.4)	achatado, (0.3 × 1.2)	prominente, (1.2 × 2.5)	difuso
	<i>M. ferox</i> (Tyrannidae: Tyranninae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	ovoidal a elipsoidal	14–15 × 9–10 (15 × 10)	1.4–1.6 (1.5)	achatado a meia-lua, 0.5–0.7 × 1.3–2.2 (0.6 × 1.7)	arredondado para trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9)	difuso
	<i>Tolmomyias sulphurescens</i> Spix (Rhynchocyclidae: Rhynchocyclinae)			11–15 × 8–10 (13 × 9)	1.3–1.6 (1.5)			
<i>Isospora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	Berto et al. (2009b)	alongado-elipsoidal	17–22 × 10–13 (20 × 12)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 × 1.1)	prominente, (1.4 × 2.1)	compacto, subesférico
<i>Isospora attilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)	Rodrigues et al. (2015)	elipsoidal	12–15 × 7–9 (13 × 8)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 × 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 × 4.0)	difuso
<i>Isospora lopesi</i> Silva-Carvalho; Berto, 2018	<i>Platyrrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	elipsoidal	12–16 × 8–11 (15 × 9)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-Formad, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	difuso
<i>Isospora oliveirai</i> Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye) (Tityridae: Schiffornithinae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	Formato limão	10–11 × 6–7 (10 × 6)	1.6–1.7 (1.6)	knob-like to half-moon-Formad, (2.0 × 3.5)	rounded, (2.5 × 3.5)	difuso
<i>Isospora leptopogoni</i> Melo; Berto	<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	present study	Formato limão	12–17 × 8–11 (15 × 9)	1.3–1.8 (1.6)	knob-like, (1.1 × 1.8)	retangular to rounded, (1.6 × 2.1)	compacto

Apesar dessas observações filogenéticas, os valores de suporte para a árvore foram muito baixos, inclusive para a colocação de *I. leptopogoni*, tornando qualquer interpretação da topologia com pouco significado. De qualquer forma, esta sequência de *250 pb de *I. leptopogoni*, mesmo que curta e filogeneticamente inconclusiva, representa uma identificação molecular mínima para esta espécie que a separa de outras *Isospora* spp. de Passeriformes até então depositados no GenBank; esta sequência pode ser utilizada no futuro para complementar o sequenciamento de outras regiões gênicas próximas em seu genoma mitocondrial.

Por fim, a comparação de *I. leptopogoni* com *Isospora* spp. registradas a partir de aves Tyrannida (**Tabela 1**), além da identificação molecular por sequenciamento do gene COI, apoia claramente a designação como uma espécie única.

Portanto, *I. leptopogoni* é considerada nova para a ciência, sendo a terceira espécie descrita de Rhynchocyclidae e a sétima registrada na parvordem Tyrannida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTO, B. P., LUZ, H. R., FLAUSINO, W., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 74, 75–80.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., LUZ, H. R., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009b). *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, 54, 301–304.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., MCINTOSH, D., TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, 80, 159–204.
- BERTO, B. P., MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 1– 15.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host environment interaction. *Journal of Parasitology*, 106, 707–713. **BirdLife International**. (2022).
- DOLEZALOVÁ, M., TORRES, J., FERNÁNDEZ, H.; MODRÝ, D. (2004). *Isospora araponga* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of *Isospora* Schneider from a bare-throated bellbird, *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Cotingidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99, 829–830.
- DOLNIK, O. (2006). The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, 100, 155–160.
- DOLNIK, O. V., PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. (2009). Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal of Parasitology**, 95, 169–174.
- DOLNIK, O.V., DOLNIK, V.R.; BAIRLEIN, F. (2010). The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. **Ardea** 98, 97–103.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal of Parasitology**, 83, 333–336.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2019). Morphological and molecular identification of *Isospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoninae) in South America. **Acta Protozoologica**, 58, 17–23.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V.,

OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2020). Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology International*, 75, 102040. 123 **Systematic Parasitology** (2022) 99:525–534 533

ICMBIO. (2022). Parque Nacional do Itatiaia. Accessed 26 Jan 2022.

ICZN. (2012). International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin of zoological nomenclature**, 69, 161–169.

IUCN Red List for birds.. Accessed 26 Jan 2022.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35, 1547–1549.

LOPES, B.D., BERTO, B.P., FERREIRA, I., LUZ, H.R.; LOPES, C.W.G. (2013). Coccidial distribution from passerines in an area of Atlantic Forest in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil. **Coccidia**, 1, 10–16.

MARONEZI, C., OLIVEIRA, M.S., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., MELLO, E.R., CEPEDA, P.B., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M.; BERTO, B.P. (2022) *Isospora* spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. **Systematic Parasitology**, 99, 285–297.

MELLO, E.R., OLIVEIRA, M.S., ANDRADE, L.A.S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M.; BERTO, B.P. (2022). *Isospora basileuterusi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the pula-pula *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America. *Current Research in Parasitology; Vector-Borne Diseases*, 2, 100079.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., MELLO, E.R., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2020). *Isospora oliveirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish *schiffornis* *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. *Acta Parasitologica*, 65, 843–851.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., MELLO, E.R., MELO, J.O., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2021). Redescription and molecular 79 identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tiranídeos (Tyrannoidea) in South America. **Systematic Parasitology**, 98, 333–341.

PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A., AGNE, C.E., BENCKE, G.A., BRAVO, G.A., BRITO, G.R.R., COHN-HAFT, M., MAURÍCIO, G.N., NAKA, L.N., OLMOS, F., POSSO, S., LEES, A.C., FIGUEIREDO, L.F.A., CARRANO, E., GUEDES, R.C., CESARI, E., FRANZ, I., SCHUNCK, F.; PIACENTINI, V.Q. (2021). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. **Ornithology Research**, 29, 94–105.

RIDGELY, R.S., GWYNNE, J.A., TUDOR, G.; ARGEL, M. (2015). Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste. São Paulo: Horizonte, 417 pp. Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. do B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I.; Lopes, C. W. G. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. **Zootaxa**, 4034, 193–196.

RODRIGUES, M.B., OLIVEIRA, J.L.G., SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G.N., GOMES, J.V., OLIVEIRA, M.S., SIQUEIRA, P.B., OLIVEIRA, A´. A, LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2019). The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro; Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 96, 423-431.

SICK, H. (1997). Ornitologia brasileira. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 pp.

SILVA-CARVALHO, L. M., PASTURA, D. G. N., GOMES, J. V., SIQUEIRA, P. B., RODRIGUES, M. B., LIMA, V. M.; BERTO, B. P. (2018a). *Isospora lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463.

SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G., RODRIGUES, M.B., GOMES, J.V., OLIVEIRA, M.S., SIQUEIRA, P.B., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., SOARES, S.S., OLIVEIRA, A´. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2018b). *Isospora sagittulae* McQuistion; Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the neotropical region. **Parasitology Research**, 117, 2635–2641.

SILVA-CARVALHO, L.M., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., RODRIGUES, M.B., ABREU, S.T., ORTU´ZAR-FERREIRA, C.N., FRANCO, H.A., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A´. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2019). *Isospora borbai* (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnateaters *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America. **Acta Parasitologica**, 64, 617–624.

WILLIAMS, R. B., THEBO, P., MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J.A. (2010). Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76, 69–76.

YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A.; RYAN, U. (2015). *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

CAPÍTULO IV

**ABORDAGENS MOLECULARRES E ESTATÍSTICAS PARA A DELIMITAÇÃO DE
ESPÉCIES DE EIMERIIDAE: UM CASO DE EXTREMO POLIMORFISMO EM
OOCISTOS EIMERIANOS DE POMBAS-AMARGOSAS *Patagioenas plumbea* Vieillot,
1818 (COLUMBIFORMES) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar, morfológica, estatística e molecularmente, oocistos eliminados de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 de uma localidade a 2197 metros de altitude próxima ao pico das Agulhas Negras, ponto mais alto do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Os oocistos se apresentaram extremamente polimórficos, com formato subesferoidal, ovóides ou elipsóides, além de apresentarem a presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. A regressão linear confirmou o polimorfismo extremo dos oocistos, mostrando que se todas as combinações de caracteres taxonômicos em oocistos (morfotipos) fossem superestimadas, 19 espécies diferentes poderiam ser identificadas/descritas. Por outro lado, a análise de comparação de médias entre oocistos com presença/ausência de características e os histogramas mostrou equivalências e regularidade na distribuição nas classes de medidas, que indicam a presença de uma única espécie nos oocistos medidos. As análises moleculares foram realizadas a partir do isolamento de oocistos individuais de diferentes morfotipos, os quais tiveram seu material genético extraído, amplificado e sequenciado em 4 *loci* não sobrepostos nos genes *cox1*, *cox3* e fragmentos de pequena e grande subunidade rDNA do DNA mitocondrial. As sequências foram 100% idênticas entre os morfotipos, com exceção de uma divergência muito pequena observada no *locus* que cobre parcialmente o gene *cox3*. A análise filogenética foi inconclusiva para o *locus* dentro do gene *cox1* tradicionalmente usado para coccídios eimerídeos, porém os outros *loci* devem ter um futuro promissor para estudos filogenéticos quando mais sequências para as mesmas regiões gênicas forem depositadas no GenBank. Finalmente, a análise multifatorial do presente trabalho sustentou que os oocistos polimórficos eliminados de *P. plumbea* são uma única espécie, que foi nomeada como *Eimeria patagioenasae*, tornando esta a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

Palavras-chave: *Eimeria patagioenasae*; coccídios; Oocistos; morfologia; Morfometria; Sequenciamento; filogenia; Aves neotropicais; Parque Nacional de Itatiaia; Brasil.

ABSTRACT

The current work aimed to analyze, morphologically, statistically and molecularly, oocysts shed from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) from a locality at 2.197m of altitude near the Agulhas Negras peak, the highest point of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The oocysts were extremely polymorphic, being subspheroidal, ovoidal or elipsoidal, in addition to having the random presence/absence of characteristic features associated with the oocyst wall, such as micropyle, micropyle cap, lateral micropyle and outer veil/rough wall. Linear regression confirmed the extreme polymorphism of oocysts, showing that if all combinations of taxonomic characters in oocysts (morphotypes) were overestimated, 19 different species could be identified/described. In contrast, the means comparison analysis between oocysts with presence/absence of characteristic features and the histograms showed equivalences and regularity in the distribution in the classes of measures, which indicate the presence of a single species in the measured oocysts. Molecular analyzes was performed from the isolation of individual oocysts of different morphotypes, which had their genetic material extracted, amplified and sequenced in 4 non-overlapping *loci* in *cox1*, *cox3* genes and fragments of small and large subunit rDNA of mitochondrial DNA. The sequences were 100% identical between the morphotypes, with the exception of a very small divergence observed at the *locus* that partially covers the *cox3* gene. The phylogenetic analysis was inconclusive for the *locus* within *cox1* gene traditionally used for eimeriid coccidians, however the other *loci* should have a promising future for phylogenetic studies when more sequences for the same genic regions are deposited in GenBank. Finally, the multifactorial analysis of the current work supported that the polymorphic oocysts shed from *P. plumbea* are a single species, which was named as *Eimeria patagioenasae*, making this the twenty-second eimerian description from Columbiformes.

Keywords: *Eimeria patagioenasae*; coccidia; oocysts; morphology; morphometry; sequencing; phylogeny; Neotropical birds; Parque Nacional de Itatiaia; Brazil.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da diversidade parasitária de animais silvestres é escasso quando comparado ao que se sabe sobre a diversidade de parasitas de animais domésticos e humanos. Em um estudo recente, Duszynski (2021) apontou que da diversidade atual de vertebrados, apenas uma parcela muito pequena foi examinada para coccídios. No mesmo sentido, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) demonstraram na época que das 367 espécies de aves Columbiformes no mundo, apenas 15 foram relatadas como hospedeiras coccídios.

Pombos e pombas (Columbiformes) são hospedeiros de uma ampla gama de parasitas, desde ectoparasitas como hipoboscídeos, malófagos, piolhos e ácaros até endoparasitas como helmintos, hemoprotozoários e coccídios (Atkinson et al. 2008; Taylor et al. 2017). Nesse sentido, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) realizaram uma revisão taxonômica de coccídios eimerídeos de Columbiformes, onde foram registradas 19 *Eimeria* spp e 2 *Isospora* spp. Desde então, duas novas descrições de *Eimeria* spp foram adicionadas: *Eimeria chalcoptereae* Yang, Brice, Berto; Ryan, 2020 e *Eimeria ferreirai* Oliveira; Berto, 2020 (Oliveira et al. 2020; Yang et al. 2020). Portanto, atualmente um total de 21 *Eimeria* spp são registrados para aves columbiformes.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo examinar amostras fecais de aves silvestres em uma localidade a 2.197 metros de altitude, próxima ao pico das Agulhas Negras, ponto mais alto do Estado do Rio de Janeiro. Oocistos com diferentes formas e características irregulares foram observados em pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), que é uma espécie columbiforme com média dependência florestal e relacionada a ambientes bem preservados na América do Sul; e no sudeste do Brasil, observados principalmente nas encostas de regiões montanhosas (Sick 1997; Mello et al., 2020; BirdLife Internacional 2023). Neste sentido, um estudo morfológico detalhado destes oocistos polimórficos é fornecido aqui, associado a estudos estatísticos e moleculares, visando a identificação específica destes oocistos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas de amostras

Uma única expedição foi realizada no planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO 2023). Essa expedição ocorreu em novembro de 2021, especificamente no Km 13 da Travessia Ruy Braga (22°24'29.97"S; 44°39'04.07"W), que é a trilha que leva ao planalto de altitude onde está localizado o pico das Agulhas Negras. Redes de neblina foram utilizadas para a captura das aves.

Três pombas-amargosas *P. plumbea* foram capturados. As aves capturadas foram especificamente identificadas (Ridgely et al. 2015; Mello et al. 2020), fotografado e atado com anéis de metal numerados fornecidos pela Agência Brasileira de Anilhagem de Aves (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE). Posteriormente, as aves foram mantidas em caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, quando foram soltas no mesmo local de captura. Cada gota fresca de fezes de cada ave foi colocada individualmente em um tubo de centrifuga com uma solução de dicromato de potássio 2.5% (K₂Cr₂O₇) (Dolnik 2006).

2.2 Análise Morfológica

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 7 dias. Os oocistos foram isolados por flutuação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1.20) e examinados microscopicamente pela técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014). Observações morfológicas, desenhos de linhas, fotomicrografias e medidas foram realizadas utilizando-se um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Desenhos de linhas, fotomicrografias e outras figuras foram editados usando dois softwares (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) da CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 2020, Corel Corporation, Canadá). Todas as medições foram realizadas em micrômetros e são apresentadas seguido da média entre parênteses.

2.3 Análise Estatística

Três métodos estatísticos foram empregados após avaliação prévia dos dados pelo teste de normalidade de D'Agostino's: (1) Análise de variância (ANOVA); utilizada para comparar medidas do diâmetro maior, diâmetro menor e índice morfométrico dos oocistos e esporocistos com diferentes características, utilizando o pacote estatístico Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007) para calcular a média, variância, grau de liberdade e valor de *p* (Sampaio 2002; Berto et al. 2014); (2) Foram elaborados histogramas para plotar os valores de diâmetro maior, diâmetro menor e índice morfométrico dos oocistos, bem como suas frequências relativas, de acordo com os métodos de Sampaio (2002) e Berto et al. (2014); (3) Regressão linear para determinar a distribuição dos oocistos utilizando métodos propostos por Norton e Joyner (1981) e posteriormente modificados por Berto et al. (2014). Os gráficos, a regressão de linhas, os pontos de dados, o valor de R² (coeficiente de determinação) e o coeficiente de reta de regressão foram obtidos utilizando-se o software Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, Washington).

2.4 Análise Molecular

Oocistos individuais, foram analisados morfolologicamente em detalhes e fotomicrografados em microscopia óptica, após isolados, ressuspensos em 90 µl PBS (ou seja, cada oocisto com morfologia analisada estava contido em cada suspensão de PBS), de acordo com as diretrizes de Dolnik et al. (2009).

Quatro ciclos de congelamento-descongelamento (- 4 °C e 96 °C, respectivamente) de 5 minutos cada foram aplicados para quebrar a parede do oocisto antes da extração do DNA para obter a lise completa do oocisto. Após esta etapa, foram adicionados 10 µl de proteinase K, deixando-a incubar em banho-maria a 56 °C por aproximadamente 2 h. A extração completa do DNA foi realizada utilizando o kit Qiagen DNeasy™ Blood and Tissue (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR de quatro loci diferentes (não sobrepostos) do genoma mitocondrial foi direcionada (**Figura 1**). Três desses loci foram projetados usando Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), e o quarto foi o locus COIBF1, desenvolvido principalmente por Dolnik et al. (2009) e amplamente aplicado a coccidianos eimeriídeos desde então (**Tabela 1**). Para amplificação, uma reação de PCR de 25 µl foi preparada usando 3 µl de DNA genômico (<1 µg), 12,5 µl de GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0,25 µl de cada Primer (0,2 µM) e 9 µl de água sem nuclease. As amplificações por PCR foram conduzidas usando as condições de ciclagem mostradas na **Tabela 1**. Os amplicons dos nested PCRs foram purificados usando o Qiagen

MinElute™ PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

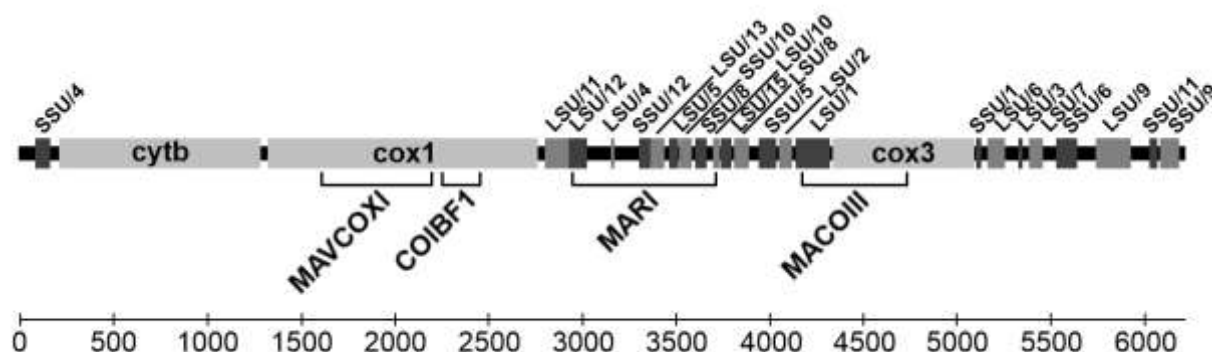


Figura 1. Organização do genoma mitocondrial de *Eimeria* spp. de aves (baseado no genoma mitocondrial completo de *Eimeria dispersa* disponível no GenBank/BLAST sob o número de acesso KJ608416): Os loci MAVCOXI (posicionados entre ~1.600–2.200 nt) e COIBF1 (posicionados entre ~2.250–2.500 nt) ocupam o gene *cox1*; o locus MARI (posicionado entre ~2.950–3.750 nt) ocupa fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU) e subunidade grande (LSU); e o locus MACOI (posicionado entre ~4.200–4.750 nt) ocupa o fragmento LSU/1 rDNA e o gene *cox3*.

2.5 Análises de sequência de DNA

Todos os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os iniciadores (*primers*) PCR forward e reverse da Ludwig Biotechnology, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi utilizado para o sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados no Programa Chromas 2.6. As sequências foram comparadas com outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados GenBank usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Os alinhamentos foram criados no MEGA versão 10.2.6 usando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). As relações filogenéticas foram reconstruídas usando a Inferência Bayesiana no Mr. Bayes versão 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) e o método de máxima verossimilhança no MEGA (Kumar et al. 2018).

Os modelos evolutivos mais adequados para todas as análises filogenéticas foram selecionados pela Seleção de Modelos no MEGA. A análise de Inferência Bayesiana foi conduzida sob o modelo evolutivo GTR +G para 1.000.000 de gerações, e as árvores foram resumidas após a remoção de 25% do burn-in. A análise de máxima verossimilhança foi realizada sob o modelo evolutivo TN93 +G, e os valores de *bootstrap* foram calculados por 1.000 réplicas. As árvores filogenéticas resultantes foram visualizadas em MrBayes e MEGA e exportadas em FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem para amplificação por PCR de quatro *loci* do genoma mitocondrial.

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequência primers</i>	<i>Condições de ciclismo</i>
COIBF1	COIBf1 (externo; <i>forward</i>)	5' GWTCATTAGTATGGGCACATCA 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	COIBr1 (externo; <i>reverse</i>)	5' CCAAGAGATAATACRAARTGGAA 3'	
	COIBf2 (interno; <i>forward</i>)	5' GGGCACATCATATGATGAC 3'	
	COIBr2 (interno; <i>reverse</i>)	5' ATAGTATGTATCATGTARWGCAA 3'	
MACOIII	MACOIII _f (<i>forward</i>)	5' CTGTAGAGTCGAGATGGAAACAA 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 42 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	MACOIII _r (<i>reverse</i>)	5' CCTAGAATAAACTGGCTGTAGAT AG 3'	
MAVCOXI	MAVCOXI _f (<i>forward</i>)	5' GCCAGGTCTATATGGTGGATATG 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por 54 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	MAVCOXI _r (<i>reverse</i>)	5' TGCCCAGACTAATGAACCTAAC 3'	
MARI	MARI _f (<i>forward</i>)	5' GCTCATCACACCCTTGTACTT 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por 54 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min.
	MARI _r (<i>reverse</i>)	5' CCCGGCTAAACTTCCCTTATT 3'	

3 RESULTADOS

3.1 Prevalência e Descrição

Três pombas-amargosas (*P. plúmbea*) foram examinadas e 02 (duas) testaram positivo para oocistos de coccídios. Esses oocistos se apresentaram polimórficos em tamanho, forma e na presença/ausência de certas características. No entanto, em qualquer caso, todos os morfotipos foram distintos das espécies de coccídios registradas como parasitos de Columbiformes (**Tabela 2**). Este material é descrito abaixo:

Eimeria patagioenasae Ortúzar-Ferreira; Berto (**Figuras 2, 3**)

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Oocistos (n = 40) subesferoidais (18%), ovovais (45%) ou elipsoidais (37%), 21–31 × 16–23 (26,1 × 20,1); Índice morfométrico de 1,0–1,6 (1,31). Bicamadas de parede, 1,5–2,0 (1,8 µm) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Alguns oocistos (38%) apresentaram uma membrana enrugada (provavelmente o véu externo) aderida à camada

externa da parede do oocisto, levando a uma aparência áspera da parede do oocisto. Micrópila presente na extremidade longitudinal da maioria dos oocistos (78%), 2,0–9,2 (4,7) de largura; aleatoriamente associada a um capuz polar (48%), 0,8–2,7 de altura $\times$ 4,0–10,5 de largura (1,6 $\times$ 7,1).

Uma micrópila lateral foi observada em alguns oocistos (35%), com 3,9–8,9 (6,6) de largura. Resíduo de oocisto ausente, mas 1–2 grânulos polares (geralmente 1) presentes, 2,3–3,1 $\times$ 1,3–2,4 (2,7 $\times$ 1,8).

Esporocisto (n = 27) elipsoidal alongado a fusiforme, 13–18 $\times$ 6–8 (15,0 $\times$ 7,4); Índice morfométrico de 1,8–2,3 (2,04).

Corpo de Stieda presente, achatado a semelhante a um botão, pouco discernível do corpo sub-Stieda em alguns esporocistos, 0,4–0,9 de altura $\times$ 0,9–1,5 de largura (0,6 $\times$ 1,2). Corpo sub-Stieda present, arredondado a trapezoidal, 0,8–1,4 de altura $\times$ 1,3–2,2 de largura (1,0 $\times$ 1,8).

Corpo de Para-Stieda ausente.

Resíduo de esporocisto presente, constituído por numerosos grânulos espalhados entre os esporozoítos.

Esporozoítos vermiformes, com corpos refratários posterior e anterior, 3,4–5,9 $\times$ 2,4–3,3 (4,4 $\times$ 2,8), e núcleo central.

3.1.1 Diagnóstico

Eimeria patagienasae é a única espécie de coccídio registrada na espécie hospedeira *P. plumbea*. Os oocistos de *E. patagienasae* são identificáveis pela presença aleatória de micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa, que podem ser subesferoidais, ovóides ou elipsoides, além das características típicas dos esporocistos fusiformes com corpos de Stieda e sub-Stieda (Figs. 2 e 3). Com base nesses e em outros caracteres taxonômicos, as diferenças entre *E. patagienasae* e outras *Eimeria* spp., registradas em Columbiformes, estão resumidas na **Tabela 2**. Das 21 espécies de coccídios registradas para Columbiformes até o momento, apenas *Eimeria turturi* Golemsky, 1976 tem forma (índice morfométrico de 1,3) e tamanho compatíveis com *E. patagioenasae*, no entanto, esta espécie é facilmente diferenciada pela ausência de micrópila e grânulo polar, além da forma, tamanho e outras características dos esporocistos.

Eimeria kapotei Chatterjee ; Ray, 1969, *Eimeria waiganiensis* Varghese, 1978, *Eimeria duculai* Varghese, 1980, *Eimeria palumbi* McQuistion, 1991, *Eimeria zenaidae* Adriano et al. 2003, *Eimeria janovyi* Bandyopadhyay et al. 2006, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška; Modrý, 2012, *Eimeria lyoni* Yabsley et al. 2015 e *E. chalcoptereae* são ligeiramente semelhantes em tamanho (mas não forma) a *E. patagioenasae*, além de serem facilmente diferenciadas pela ausência de micrópila e/ou outras características dos esporocistos.

Eimeria ferreirai é ligeiramente semelhante a *E. patagioenasae*, que são simpátricas (hospedeiras e coccídios) no Parque Nacional do Itatiaia; *E. patagioenasae* pode ser diferenciado, além do tamanho e forma, por micrópilas aleatoriamente presentes, forma de esporocisto e corpos de Stieda e sub-Stieda ligeiramente distintos, enquanto *E. ferreirai* tem apenas um corpo de Stieda bem definido como estrutura de excistamento.

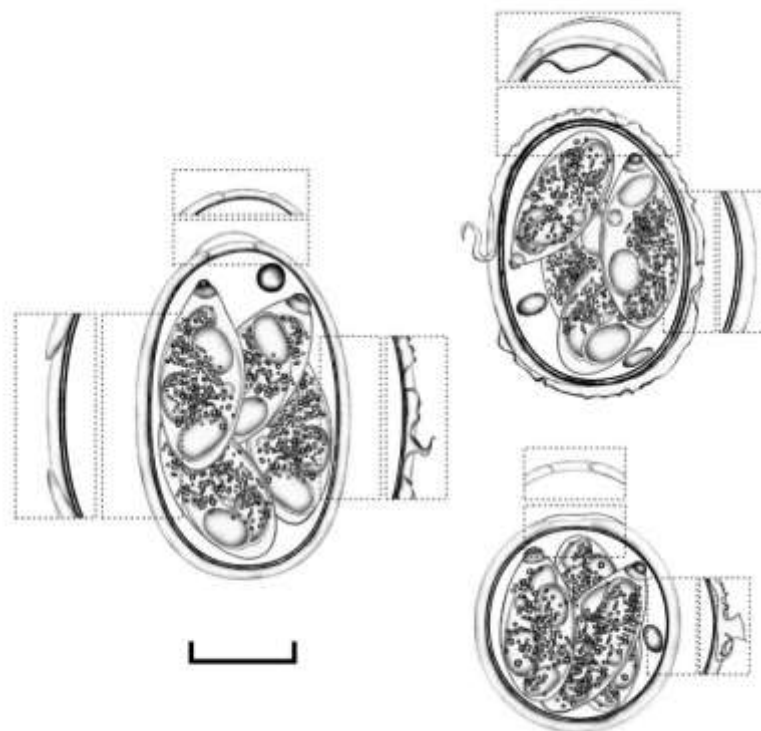


Figura 2. Desenhos de linhas de oocistos elipsoidais, ovoide (forma ovalada) e subesferoidais de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*, com presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. Barra de escala: 10 μ m.

3.1.2 Resumo Taxonômico

Hospedeiro-tipo: *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (Aves: Columbiformes: Columbidae), pomba-amargosa.

Localidade-tipo: Planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia (22°24'29.97"S; 44°39'04.07"W), Sudeste do Brasil. Material-tipo: Fotossíntipos, desenho de linhas e oocistos em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (Williams et al. 2010) estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRJ, sob o número de repositório P-132/2023.

Fotografias do espécime tipo-hospedeiro (simbiótipo) são depositadas na mesma coleção.

Sequência representativa de DNA: A amplificação do DNA dos *loci* COIBF1, MACOIII, MAVCOXI e MARI mostrou bandas claras em torno de ~250 pb, ~ 632 pb, ~ 653 pb e ~824 pb, respectivamente (**Figura 4**).

Sequências representativas foram depositadas no banco de dados do GenBank sob os números de acesso: OQ790143 (COIBF1, oocisto ovoide com capuz polar e micrópila); OQ790144 (COIBF1, oocisto subesferoidal com micrópila); OQ790137 (COIBF1, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790145 (MACOIII, oocisto subesferoidal com micrópila); OQ790140 (MACOIII, oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral); OQ790139 (MACOIII, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790138 (MAVCOXI, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790142 (MAVCOXI, oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral); OQ790141 (MARI, oocisto elipsoidal com véu externo/parede

rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral).

Registro no ZooBank: Para cumprir os regulamentos estabelecidos no Artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 2012), detalhes da nova espécie foram apresentados ao ZooBank.

O Life Science Identifier (LSID) do artigo é urn:lsid:zoobank.org:pub.

O LSID para o novo nome *Eimeria patagioenasae* Ortúzar-Ferreira; Berto é urn:lsid:zoobank.org:act.

Local de infecção: Desconhecido, oocistos foram recuperados das fezes.

Prevalência: 67% (2 de 3 aves examinadas).

Etimologia: O nome específico é derivado do nome genérico do hospedeiro-tipo.



Figura 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*: oocistos elipsoidais (A–H), ovais (I–N) e subesferoidais (O–R). Observe a camada interna (il), camada externa lisa (sol) e/ou véu externo/camada externa áspera (ov/rol) na parede do oocisto, micrópila lateral (lm), micrópila (m), capa de micrópila (mc), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpos Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala: 10 µm.

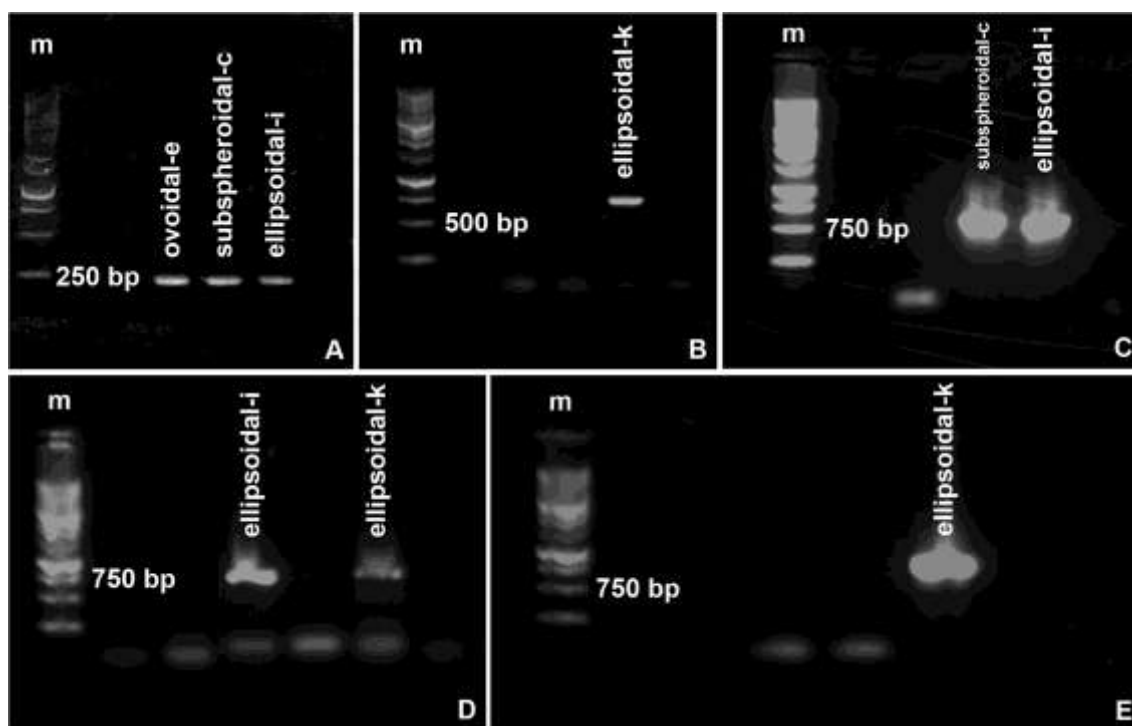


Figura 4. Perfil eletroforético de PCR para os locos COIBF1 (A), MACOIII (B, C), MAVCOXI (D) e MARI (E) do genoma mitocondrial de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*, obtido em gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular (m) Escada de DNA Promega 1 kb (250–10.000 pb). Os morfotipos “subesferoidal-c”, “ovoidal-e”, “elipsoidal-i” e “elipsoidal-k” referem-se à extração de DNA de oocistos individuais subesferoidais com micrópila; ovoidal com capa de micrópila e micrópila; elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.

Tabela 2. Morfologia comparada de *Eimeria* spp., registrada em Columbiformes do Mundo.

Coccidia	Hospedeiro	Localidade	Referências	Oocysts					Esporocistos									
				Forma	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Parede	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar	Forma	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Corpo de Stieda	Corpo de Substieda	Resíduo
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Ásia, India	Pinto (1928)	subesferoidal a ovoidal	17–21 (16.7)	16–18 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	suave	ausente	presente	presente	ovoidal	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	presente
			Nieschulz (1935)	Subesferoidal a elipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	suave	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
	<i>Streptopelia decaocto</i> Frivaldszky, 1838 <i>Columba palumbus</i> Linnaeus, 1758	Europa, Portugal	Oliveira et al. (2021)	subesferoidal a elipsoidal	16–21 (18.5)	14–17 (15.5)	1.0–1.4 (1.19)	suave	ausente	presente, 1–3	presente, 1–3	ovoidal ou ligeiramente reniforme	11–14 (12.2)	5–7 (5.9)	1.9–2.3 (2.08)	presente, triangular	ausente	presente
			Nieschulz (1935)	Subesferoidal a ovoidal	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	suave	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Ásia, India	Nieschulz (1935)	Subesferoidal a ovoidal	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	suave	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
<i>Eimeria columbae</i> Mitra ; Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Ásia, India	Mitra and Das Gupta (1937)	Subsferoidal a ovoidal	(16.4)	(14.4)	–	–	presente	ausente	–	elipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	presente
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Ásia, India	Ray (1952)	riniforme a elipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	suave com um amassado lateral	ausente	presente, assimétrio, com tampa da micrópila	–	amplamente ovoidal	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	presente
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee ; Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Ásia, India	Chatterjee and Ray (1969)	sub-spherical	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	presente, anterior	presente, 1–2	ovoidal	8–10	–	–	presente	–	presente, disperso
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i> (Linnaeus, 1758) <i>Chalcophaps indica</i> (Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Europe, Bulgaria	Golemansky (1976)	elipsoidal ou amplamente ovoidal	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	suave, ~1.5	ausente	ausente	ausente	elipsoidal alongado	11–13	6–8	–	ausente	–	presente, disperso
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	<i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	amplamente ovoidal	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	suave, ~1.5	ausente	presente, 4–6 (5)	presente, 2–4	ovoidal	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	presente, proeminente	presente, pequeno	presente, disperso
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	<i>Ducula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	amplamente ovoidal	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	suave, 1.5–2.5 (2.0)	ausente	discreto	presente, 1, ~2.0	alongado	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	presente, proeminente, cônico	ausente	presente, compactado, membrana-delimitado

<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	sub-spherical	19–22 (20)	18–21 (20)	1.0– (1.0)	suave, ~1.0	ausente	ausente	presente, 1, ~2.0	alongado	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	present	ausente	presente, compacto
<i>Eimeria palumbi</i> McQuistion, 1991	<i>Zenaida galapagoensis</i> Gould, 1841	South America Ecuador, Galápagos Islands	McQuistion (1991)	ovoidal a elipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0– 1.2 (1.16)	suave, ~2.0	presente, grânulos redondos a lascados	ausente	ausente	elipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	1.8– 2.1 (1.9)	presente, semelhante a um mamilo	ausente	presente, dispersos
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen ; Cordeiro, 2000	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); <i>Columbina squammata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano et al. (2000)	ovoidal a elipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1– 1.3 (1.2)	suave, ~1.3	ausente	ausente	presente	alongado	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0– 2.2 (2.1)	presente, protuberante, semelhante a um mamilo	ausente	presente, compacto
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen ; Cordeiro, 2003	<i>Zenaida auriculata</i> (Des Murs, 1847)	South America, Brazil	Adriano et al. (2003)	subesférico	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	1.2– (1.2)	rough, ~1.7	ausente	ausente	presente, 1	alongado	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7– 1.9 (1.8)	presente grande	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria janovy</i> Bandyopadhyay, Bhakta ; Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Ásia, India	Bandyopadhyay et al. (2006)	elipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	suave, ~1.1	ausente	ausente	present, 1, sub-spherical	pyriform	(12.1)	(10.1)	(1.2)	presente, grande, proeminente	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al- Shawa ; Al- Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Ásia, Saudi Arabia	Alyousif et al. (2009)	alongado elipsoidal	19– (21)	23 (15)	14–17 (1.2)	suave, 1–1.3 (1.2)	presente, irregular glóbulo	ausente	ausente	elipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	present, pequeno, semelhante a um mamilo	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška ; Modrý, 2012	<i>Columba bipalumbus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Czech and Slovak Republics	Jamriška and Modrý (2012)	elipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0– 1.4 (1.26)	suave, 0.6–1.5 (0.9)	ausente	ausente	presente, 2 irregular, ~2.0	ovoide alongado, ligeiramente assimétrico	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7– 2.2 (1.9)	presente	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones ; Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Africa, Madagascar	Ball et al. (2012)	subesférico	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0– 1.2 (1.1)	suave, ~0.8	ausente	ausente	ausente	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	presente	presente	presente
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey ; Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley et al. (2015)	subesférico a ovoidal	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1– 1.3 (1.2)	suave, ~1.0	ausente	ausente	presente, 1–2	ovoidal	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5– 1.9 (1.7)	presente, tipo botão	presente, arredondado	presente, disperso, granulos of ~1.0
<i>Eimeria</i> sp. of Yang <i>et al.</i> (2016)	<i>C. livia</i>	Oceania, Australia	Yang et al. (2016)	subesférico	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	suave, ~1.0	presente	ausente	presente	alongado ovoidal	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0– 2.2 (2.1)	presente	ausente	presente, compacted
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira ; Berto, 2019	<i>C. talpacoti</i>	América do Sul, Brazil	Ortúzar- Ferreira et al. (2020)	subesférico a elipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0– 1.2 (1.11)	suave, 1.0–1.2 (1.1)	presentes, granulos ligados e/ou difusos	inconspicuous	ausente	elipsoidal a ligeiramente assimétrica	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6– 2.0 (1.77)	presente, achatado a meia-lua- formada	presente, arredondado	presente, disperso

<i>Eimeria chalcoptereae</i> Yang, Brice, Berto; Ryan, 2020	<i>Phaps chalcoptera</i> (Latham, 1790)	Oceania, Australia	Yang et al. (2020)	subesférico,	22–25 (23.5)	21–24 (22.6)	1.0– 1.1 (1.04)	suave, 1.0–1.4 (1.2)	ausente	quase impercetível	presente, 2–3	elipsoidal	13–14 (13.5)	7–8 (7.2)	1.8– 2.0 (1.88)	presente, achatado a meia-lua	presente, arredondado para trapezoidal	Grânulos presentes, limitados por membrana
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira; Berto, 2020	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855; <i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard ; Bernard, 1792)	América do Sul, Brazil	Oliveira et al. (2020)	Subesférico a elipsoidal	19–25 (21.4)	16–21 (18.8)	1.0– 1.4 (1.15)	suave, 1.3–1.9 (1.6)	ausente	presente, com tampa de micrópila quase impercetível	presente, 1–2	alongado ovoide a bumerangue	12–15 (13.4)	6–8 (6.9)	1.8– 2.2 (1.95)	presente, triangular to lozangular	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria patagioenasae</i> Ortúzar-Ferreira ; Berto n.sp.	<i>Patagioenas plumbea</i> Vieillot, 1818	América do Sul, Brazil	Presente estudo	subesferoidal, ovoidal a elipsoidal	21–31 (26.1)	16–23 (20.1)	1.0– 1.6 (1.31)	suave, 1.5–2.0 (1.8), sometimes with outer veil adhered	ausente	presente aleatoriamente na extremidade longitudinal ou lateral, possivelmente com tampa de micrópila	presente, 1–2	elongate elipsoidal a fusiforme	13–18 (15.0)	6–8 (7.4)	1.8– 2.3 (2.04)	presente, achatado em forma de botão	presente, arredondado para trapezoidal	presente, disperso

3.2 Análise morfométrica e estatística

A análise de comparação de médias por ANOVA foi realizada de acordo com as características da parede do oocisto, presentes ou ausentes aleatoriamente. Conforme a **Tabela 3**, as médias foram equivalentes ($P>0,01$), em todas as dimensões morfométricas, entre oocistos com e sem véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.

Os histogramas de diâmetros maior e menor e índice morfométrico dos oocistos (**Figura 5**) e esporocistos (**Figura 6**) foram regulares à medida que as frequências aumentavam e diminuam nas classes de medidas. Esses resultados indicam uma única espécie/população nos oocistos e esporocistos medidos, de acordo com as diretrizes de Sampaio (2002) e Berto et al. (2014).

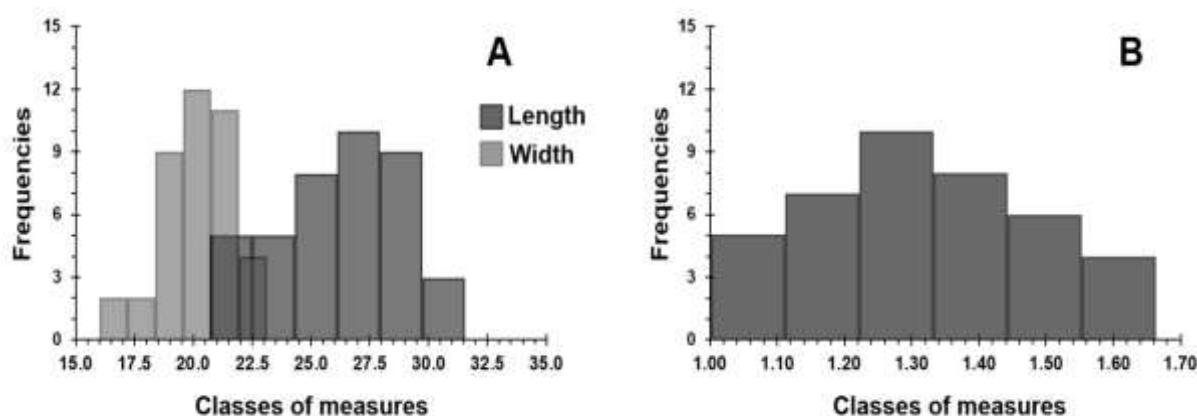


Figura 5. Histogramas de diâmetros maior e menor (A) e índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*.

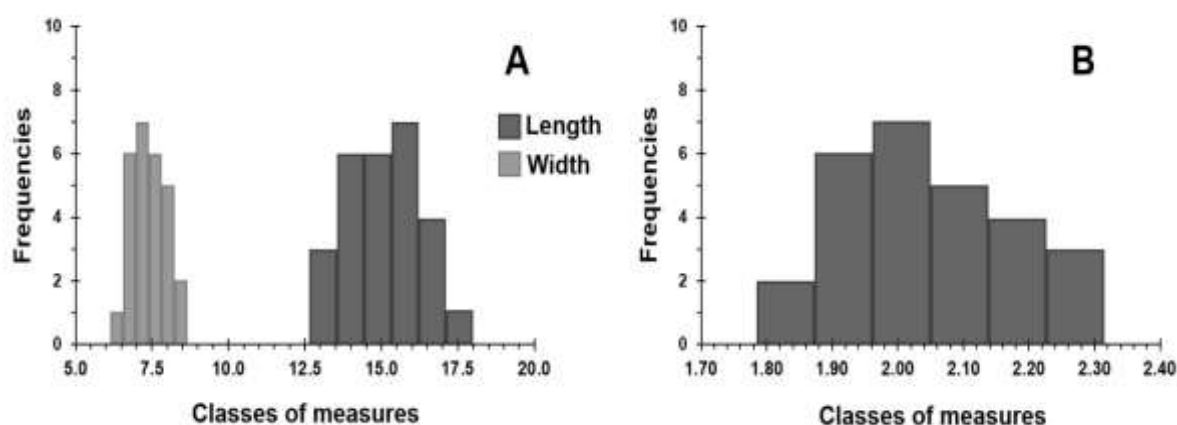


Figura 6. Histogramas de diâmetros maior e menor (A) e índice morfométrico (B) de esporocistos em oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*.

A regressão linear foi realizada para todos os oocistos (**Figura 7**) e esporocistos (**Figura 8**), mas cada formato de oocisto relacionados a combinações de características (morfortipo) foi individualizada e identificada nos gráficos. Como observado, não houve combinação de características correlacionadas com o tamanho/forma do oocisto nas regressões lineares do oocisto e do esporocisto, uma vez que as mesmas combinações de características coincidiram em oocistos subesferoidais, ovóides e elipsoidais, de diferentes tamanhos.

O valor muito baixo de R² e os pontos/oocistos distantes da linha de regressão indicaram a natureza extremamente polimórfica dos oocistos. Em contraste, a regressão linear dos esporocistos resultou em um valor de R² de 0,5, que é limítrofe para determinar uma distribuição uniforme (Berto et al., 2014), também confirmada pela proximidade dos pontos de dados/esporocistos à linha de regressão.

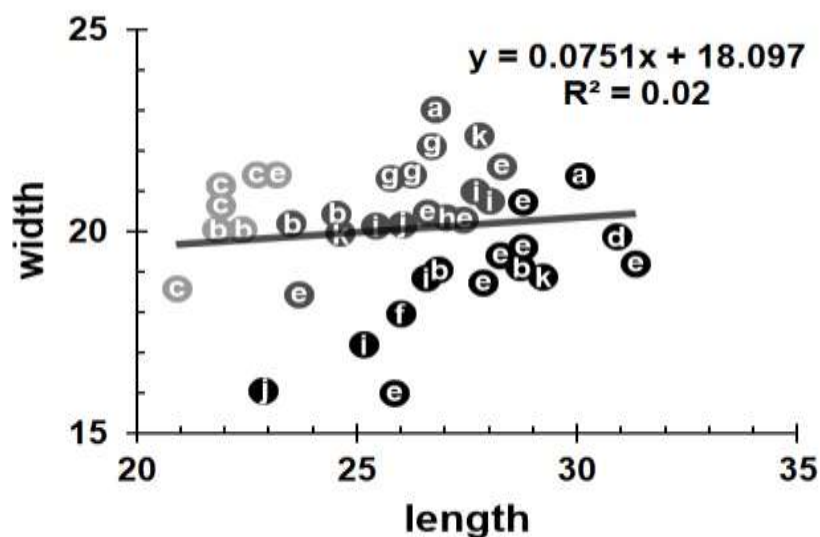


Figura 7. Distribuição dos oocistos subesferoidais (cinza-claro), ovóides (cinza escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 40). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfortipos): (a) parede do oocisto lisa e sem estruturas morfológicas associadas; b) com véu exterior/parede áspera; c) com micrópila; d) com micrópila lateral; e) com capuz polar e micrópila; f) com véu exterior/parede áspera e micrópila; g) com micrópila e micrópila lateral; h) com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.

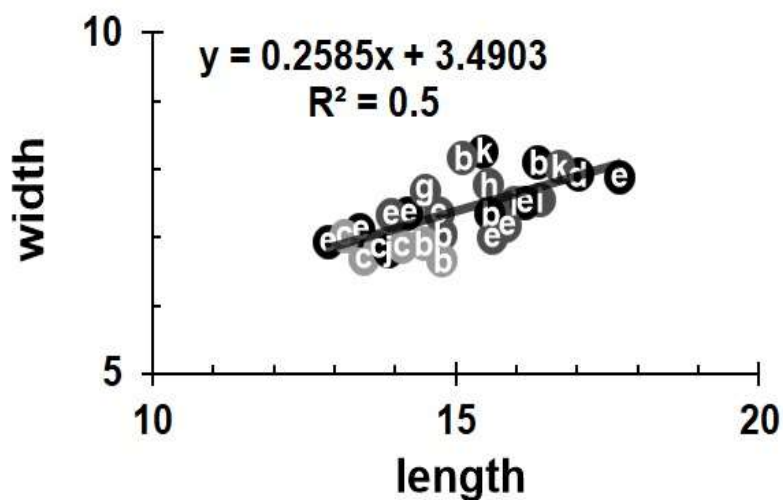


Figura 8. Distribuição dos esporocistos em oocistos subesferoidais (cinza-claro), ovóides (cinza escuro) e elipsóides (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 27). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfortipos): (b) com véu externo/parede rugosa; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.

Tabela 3. Análise estatística das comparações de médias de oocistos e esporocistos relacionados a caracteres taxonômicos aleatoriamente presentes ou ausentes em oocistos de *Eimeria patagioenasae*.

Dimensões morfométricas		Características							
		véu exterior/parede áspera		capuz polar		micrópila		micrópila lateral	
		presente(n=15)	ausente (n=25)	presente (n=19)	ausente (n=21)	presente (n=31)	ausente (n=9)	presente (n=14)	ausente (n=6)
Oocisto	Diâmetro maior(µm)	26.0 (22-30) ^a	26.2 (21-31) ^a	26.9 (23-31) ^a	25.5 (21-31) ^a	26.1 (21-31) ^a	26.2 (22-31) ^a	26.6 (23-31) ^a	25.9 (21-31) ^a
	Diâmetro menor (µm)	20.0 (18-22) ^a	20.1 (16-23) ^a	19.7 (16-22) ^a	20.4 (18-23) ^a	20.0 (16-22) ^a	20.4 (19-23) ^a	20.0 (16-22) ^a	20.1 (16-23) ^a
	Índice morfométrico	1.3 (1.1-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a	1.4 (1.1-1.6) ^a	1.3 (1.0-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a	1.3 (1.1-1.5) ^a	1.3 (1.2-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a
	Diâmetro maior(µm)	15.6 (15-17) ^a	14.7 (13-18) ^a	15.1 (13-18) ^a	15.0 (13-17) ^a	14.9 (13-18) ^a	15.4 (15-17) ^a	15.7 (14-17) ^a	14.8 (13-18) ^a
	Diâmetro menor (µm)	7.6 (6-8) ^a	7.2 (7-8) ^a	7.4 (7-8) ^a	7.3 (6-8) ^a	7.3 (7-8) ^a	7.4 (6-8) ^a	7.7 (7-8) ^a	7.2 (6-8) ^a
Esporocisto	Índice morfométrico	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.9-2.2) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a

^aTodas as médias (mesmas letras) dentro de cada coluna de caracteres taxonômicos foram equivalentes (P>0.01).

3.3 Análise molecular e filogenética

Análises moleculares de oocistos individuais recuperados de *P. plumbea* com diferentes combinações de caracteres taxonômicos (morfotipos) revelaram a presença de sequências eimerídeos diferindo de outros coccídios depositados no banco de dados do GenBank.

No *locus* COIBF1, oocistos de três morfotipos distintos (subesferoidal com micrópila; ovoidal com capa de micrópila e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral) foram 100% idênticos entre si e 99% semelhantes a *Isospora* spp.

Eimeria columbinae Ortúzar-Ferreira; Berto, 2019, que foi descrita a partir de rolinha-roxa, *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) no sudeste do Brasil, foi a espécie eimeriana mais próxima, com 98,2% de similaridade. *Eimeria labbeana* (Labbe, 1896) Pinto, 1928 e *E. ferreirai*, que são duas outras *Eimeria* spp., registradas em Columbiformes, sequenciadas para esse mesmo *locus* COIBF1, apresentaram 93,5% e 91,6% de similaridade, respectivamente.

No *locus* MACOIII, um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral apresentou 99,1% de similaridade com um oocisto do mesmo morfotipo, exceto pela presença do véu externo com aspecto de parede rugosa.

Em contraste, este mesmo oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral teve 99,8% de similaridade com um oocisto subesferoidal com apenas uma micrópila na extremidade longitudinal. Destes oocistos, as sequências mais próximas depositadas no GenBank neste *locus* MACOIII foram de *Eimeria dispersa* Tyzzer, 1929 e *Eimeria innocua* Moore; Brown, 1952, que são parasitas de perus, juntamente com alguns *Isospora* spp, com similaridade de 93%.

No *locus* MAVCOXI, os mesmos oocistos elipsoidais do mesmo morfotipo, com exceção do véu externo/parede rugosa, foram 100% idênticos entre si. Em comparação com as sequências depositadas no GenBank, as mais próximas foram *E. innocua* e *E. dispersa*, com 92,6% e 91,8% de similaridade, respectivamente.

No *locus* MARI apenas o oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral foi bem-sucedido na amplificação e sequenciamento. Em comparação com as sequências do GenBank, novamente *E. innocua* e *E. dispersa* foram as mais próximas, com 92,9% de similaridade.

A análise filogenética baseada nos *loci* COIBF1, MACOIII, MAVCOXI e MARI incluiu sequências de coccídios disponíveis no GenBank (**Figuras 9 - 12**). Uma *Choleoeimeria* sp. (KT203395) de uma cobra-real da pradaria *Lampropeltis calligaster* (Harlan, 1827) foi usada como grupo externo.

Na árvore filogenética construída a partir do *locus* COIBF1 (**Figura 9**) os oocistos polimórficos de *P. plumbea* formaram um grupo monofilético com *Isospora* spp, de passeriformes, estando em polifilia com as demais *Eimeria* spp. de Columbiformes. Já na árvore filogenética construída a partir do *locus* MACOIII (**Figura 10**) as sequências do presente estudo estavam em um grande clado com *Eimeria* spp., de galinhas, perus, gansos, coelhos, cavalos, além de *Isospora* spp., de passeriformes e outros coccídios eimerídeos.

Finalmente, nas árvores filogenéticas construídas a partir dos *loci* MAVCOXI e MARI (**Figuras 11, 12**), grupos monofiléticos com *E. innocua* e *E. dispersa* foram formados. Essa relação foi razoavelmente apoiada em todas as análises.



Figura 9. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (COIBF1) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números dos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'ovoidal-e' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; ovulais com capuz polar e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.



Figura 10. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MACOIII) que cobre parcialmente o gene *cox3* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'elipsoidal-k' e



Figura 11. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MAVCOXI) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos elipsoidais com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.



Fig. 12. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MARI) que ocupa fragmentos de pequenas e grandes subunidades rDNA do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. O morfotipo 'elipsoidal-k' refere-se a um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.

4 DISCUSSÃO

O número mínimo de amostras de hospedeiros visando descrições ou relatos de espécies de coccídios não é consensual ou pré-determinado, como pode ser observado na literatura científica, onde novas espécies de coccídios foram descritas até mesmo por uma única ave hospedeira (Berto et al. 2011). Entretanto, quanto maior o número de amostras (de diferentes exemplares, espécies e localidades), maior será a delimitação e precisão da padronização/tipificação de uma espécie de coccídio (Ortúzar-Ferreira et al. 2021; Berto e Lopes 2020).

O baixo número de pombas-amargosas *P. plumbea* (*P. plumbea*) capturados e analisados no presente estudo se justifica pela raridade e dificuldade de captura desta pomba no Parque Nacional de Itatiaia/RJ. Após mais de 10 anos de expedições bimestrais no parque, apenas esses 03 (três) exemplares de *P. plumbea* foram capturados nesta área de difícil acesso e trabalho de campo no planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia. Em qualquer caso, o número muito razoável de oocistos analisados (40) de 02 (dois) das 03 (três) pombas capturadas garantiu um estudo morfológico, estatístico e molecular preciso, até porque os estudos moleculares complementares foram realizados em oocistos individuais.

Os oocistos, identificados e descritos como *E. patagioenasae*, eram extremamente variáveis em tamanho, formato e presença e ausência de vários traços característicos associados à parede do oocisto (**Figuras 2 e 3**). Estas variações foram em grande parte aleatórias; ou seja, não foi possível padronizar/tipificar determinados tamanhos e formas associados à presença/ausência de determinados traços característicos (morfotipos).

Essa afirmação também é apoiada pela regressão linear dos oocistos (**Figura 7**), onde 11 combinações de características diferentes foram distribuídas aleatoriamente ao longo da linha de regressão em oocistos de diferentes tamanhos e formas. Se cada combinação de características associadas à forma/tamanho do oocisto fosse superestimada, 19 diferentes morfotipos/espécies poderiam ser identificados/descritos. Em contrapartida, os esporocistos foram uniformes, morfológica e morfometricamente, dentro de oocistos de morfotipos distintos, como mostrado na **Figura 8**, reforçando a hipótese de uma única espécie nos oocistos observados.

Aliado a isso, os histogramas foram regulares nas frequências distribuídas nas classes de medidas (**Figuras 5 e 6**) e a análise de comparação de médias mostrou que não há diferenças significativas entre oocistos com e sem micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa (**Tabela 3**); portanto, indicando fortemente a presença de uma única espécie nas amostras fecais de *P. plumbea*. Algumas espécies eimerianas foram diferenciadas e descritas com base em variações moderadas no tamanho, formato e rugosidade da parede do oocisto, como em Casas et al. (1995) na descrição de 03 (três) novas espécies de *Eimeria* spp. de capivaras, em contraste com Flausino et al. (2014), que redescreveram *Eimeria caviae* Sheather, 1924 com tendo oocistos subesferoidais, ovóides e elipsoidais. No presente trabalho, baseado principalmente em análises morfológicas e estatísticas morfométricas dos oocistos,

uma avaliação e identificação conservadora foi definida, indicando as variações extremas em determinados caracteres taxonômicos como intraespecíficos, ou seja, polimorfismos.

Polimorfismo é uma característica populacional na qual uma única espécie apresenta variações em sua forma, tamanho e outras características; portanto, uma variação em nível de espécie (intraespecífica) (Gardner e Duszynski 1990; Wiens 1999; Amorim 2002; Berto e Lopes 2020).

Em genética de populações, o termo polimorfismo indica uma transitoriedade de alelos onde coexistem dois ou mais alelos do mesmo *locus*; ou seja, polimorfismo são as variações fenotípicas/genotípicas intrínsecas a uma espécie (Amorim, 2002). Entretanto, além desse polimorfismo intrínseco da espécie, outros fatores podem estar associados.

A partir das revisões de Fayer (1980) a Berto e Lopes (2020), vários autores indicam que estresse, nutrição e imunidade do hospedeiro, plasticidade fenotípica, dose infectante, tempo de excreção de oocistos no período pré-patente, drogas anticoccidianas, fatores abióticos associados à esporulação e metodologia de mensuração, podem estar relacionados ao polimorfismo oocisto.

Nesse contexto, destacam-se os seguintes trabalhos: Duszynski (1971) relata um aumento no tamanho dos oocistos de *Eimeria separata* Becker ; Hall, 1931 durante o período pré-patente; Parker e Duszynski (1986) identificaram um polimorfismo extremo em oocistos de *Eimeria reichenowi* Yakimoff; Matschoulsky, 1935, posteriormente relacionada a uma plasticidade fenotípica (Gardner; Duszynski, 1990), que é definida como a capacidade de um único genótipo exibir uma variedade de fenótipos em resposta à variação no ambiente (Pigliucci 2001); Fayer (1980) e Berto e Lopes (2020) sintetizam que os diferentes ambientes selvagens, antropizados e de confinamento dos hospedeiros podem interferir na morfometria e no número de oocistos que são relatados por Gomez et al. (1982) e Berto et al. (2008); Greif et al. (1996) verificaram que a resistência a drogas anticoccidianas pode gerar polimorfismo; Berto et al. (2014) demonstram que em espécies coccídios com oocistos com índice morfométrico (relação L/W) maior 1,1 (geralmente forma ovoide/elipsoidal), a observação de polimorfismo é mais comum, uma vez que a medida dimensional do oocisto (que é tridimensional) é imprecisa quando os oocistos não estão em posição estritamente longitudinal; enquanto nos oocistos subesferoidais (índice morfométrico de 1,0-1,1) essa imprecisão é bastante atenuada. No contexto deste último caso, todos os oocistos ovóides e elipsoidais medidos no presente trabalho foram cuidadosamente verificados e medidos na posição longitudinal, reduzindo ao máximo essa imprecisão morfométrica.

Do ponto de vista evolutivo, o polimorfismo pode representar um processo de especiação em curso, que Wiens (1999) denomina de macroevolução, ou seja, o processo gradual no qual certos caracteres taxonômicos podem ser eliminados ou incorporados na formação de uma nova espécie. Wiens (1999) também afirma que o polimorfismo pode ter um profundo impacto na delimitação das espécies e, consequentemente, nos estudos taxonômicos e filogenéticos; portanto, caracteres polimórficos não podem ser negligenciados.

Alguns estudos relatam esse processo polimórfico de especiação em coccídios eimeriídeos: Gardner e Duszynski (1990) observaram polimorfismo em oocistos de *Eimeria opimi* Lambert, Gardner e Duszynski, 1988 em diferentes espécies de tuco-tucos *Ctenomys* spp., na Bolívia, que foram associados a um processo de especiação e adaptação do hospedeiro; Silva-Carvalho et al. (2020) observaram variações morfológicas e genotípicas em *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira e Lopes, 2015 de diferentes espécies de formigueiros, que também foram associadas ao processo de especiação adaptativa a diferentes espécies hospedeiras. Nesse contexto, Berto e Lopes (2020) resumem que as intensas recombinações genéticas em determinados momentos da especiação, principalmente na adaptação a novos hospedeiros, devem gerar caracteres taxonômicos aleatórios dependendo se os genes estão presentes/ativos ou não. Portanto, a possibilidade de *E. patagioenasae* estar

em um processo polimórfico de especiação e adaptação do hospedeiro é proeminente.

Os oocistos de *E. patagioenasae* compartilham alguns caracteres taxonômicos típicos com *E. ferreirai*, como o tamanho e a micrópila na posição longitudinal do oocisto, além de *E. labbeana*, que possui micrópilas longitudinais e laterais. Além disso, *E. ferreirai* possui a mesma localidade que *E. patagioenasae*, tendo seus hospedeiros simpátricos no Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil. Possivelmente *E. patagioenasae* está especiando em uma adaptação a *P. plumbea* de um eimeriano ancestral comum a *Eimeria* spp. de Columbiformes, em um processo onde ocorrem muitas recombinações genéticas levando ao polimorfismo fenotípico observado.

Os resultados moleculares confirmaram a definição de uma única espécie nos oocistos (de diferentes morfotipos) eliminados pelos pombas-amargosas *P. plumbea*, uma vez que pequenas divergências genéticas foram observadas apenas no *locus* MACOIII, enquanto para os *locos* COIBF1 e MAVCOXII as sequências foram idênticas entre os diferentes morfotipos. Vale ressaltar que a maior divergência molecular de 0,9% (5 nt; 561/566 identidades) no *locus* MACOIII foi entre oocistos morfologicamente semelhantes (oocistos elipsoides com mais de três características associadas à parede do oocisto), em comparação com divergência molecular de 0,2% (1 nt; 565/566 identidades) entre os oocistos morfologicamente mais dissimilares (oocistos subesferoidais e elipsoidais, amplamente distintos na parede do oocisto). Nesse sentido, entende-se que as pequenas divergências moleculares detectadas no *locus* MACOIII não foram associadas aos diferentes morfotipos, reforçando a decisão do presente trabalho em identificar os diferentes morfotipos como variações intraespecíficas de *E. patagioenasae*. Ao mesmo tempo, as substituições de nucleotídeos no *locus* MACOIII mostram algum polimorfismo genético, que apesar de não ter sido diretamente correlacionado com morfotipos específicos, enfatiza que o polimorfismo morfológico e morfométrico nos oocistos deve ser intrínseco à espécie ou relacionado ao processo de especiação/adaptação do hospedeiro, e não relacionado aos fatores externos mencionados anteriormente. Em contraste com o trabalho atual, Hafeez et al. (2014) nomearam duas *Isospora* spp., morfológica e morfometricamente indiferenciadas, com base em uma divergência molecular de 1,4% (11 nt) em um *locus* de 761 nt do gene *cox1*. A divergência molecular obtida em Hafeez et al (2014) foi razoavelmente próxima à do presente estudo (1,4% vs. 0,9%), mas é importante ressaltar que estes são *loci* distintos e não sobrepostos no DNA mitocondrial. O *locus* utilizado por Hafeez et al. (2014) foi posicionado entre ~1.700–2.500 nt de DNA mitocondrial, o que se sobrepõe parcialmente aos *loci* COIBF1 e MAVCOXII, obtendo-se 100% de identidade entre os morfotipos do presente trabalho (**Figura 1**). Assim, apesar do número moderado de depósitos de sequências coccídios eimeriídeos no GenBank, ainda não há consenso ou esclarecimento de qual região gênica do DNA mitocondrial e qual proporção/número de divergência molecular são fundamentais para a delimitação das espécies.

Existem apenas cinco sequências de *loci* do gene *cox1* de *Eimeria* spp., de Columbiformes, depositadas no GenBank. Os primeiros depósitos foram de Yang et al (2016) para *loci* dos genes da subunidade ribossômica pequena (18S) e grande (28S) RNA e *cox1* para uma *Eimeria* sp., recuperada de *Columba livia* Gmelin, 1789, na Austrália. *Eimeria columbinae* foi sequenciada para o *locus* COIBF1 e um *locus* do gene 18S (Ortúzar-Ferreira et al. 2020).

Eimeria ferreirai e *E. chalcoptereae* foram descritas com depósitos de sequências no gene *cox1*, e também nos genes 18s e 28s para *E. chalcoptereae* (Yang et al. 2020; Oliveira et al., 2020). *Eimeria labbeana* foi suplementada morfologicamente e teve sequências do *locus* COIBF1 e um *locus* 18S depositados (Oliveira et al. 2021). Por fim, Taroda et al. (2020) depositaram sequências de um *locus* no gene *cox1* de oocistos eimerianos de avoantes *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) no Brasil, mas nenhuma espécie foi morfologicamente identificada neste trabalho. Assim, *E. patagioenasae* torna-se a quinta espécie nominal registrada para Columbiformes a ter uma identificação molecular.

Análises moleculares de loci dos genes nucleares 18S e 28S foram utilizados no presente estudo, mas não houve sucesso na amplificação, possivelmente devido à metodologia de extração de DNA a partir de um único oocisto que fornece poucas cópias de DNA nuclear, ao contrário da maior quantidade de DNA mitocondrial disponível em cada esporozoíto/oocisto (Dolnik et al. 2009). De qualquer forma, a utilização dos loci dos genes 18S e 28S é mais adequada para estudos evolutivos de eventos mais profundos, enquanto os genes mitocondriais foram considerados o mais adequados para diferenciação e detecção de espécies de eventos evolutivos recentes (Ogedengbe et al. 2011, 2015); portanto, são mais consistentes com os objetivos do estudo atual.

As análises filogenéticas foram inconclusivas, pois não formaram grupos monofiléticos com *Eimeria* spp., de Columbiformes, o que seria um resultado esperado para o *locus* COIBF1, ou porque não há sequências de eimerianos de Columbiformes depositadas para as mesmas regiões gênicas dos *loci* MACOIII, MAVCOXI e MARI. De fato, o *locus* COIBF1, apesar de ser o melhor-sucedido na amplificação de um oocisto individual, demonstrou ser inadequado para análise filogenética por não apresentar resultados consistentes com dados filogenéticos, morfológicos ou ecológicos (Ortúzar-ferreira et al. 2022).

Por outro lado, os *loci* MACOIII, MAVCOXI e MARI, que possuem sequências mais longas e em outras regiões do DNA mitocondrial (**Figura 1**), apresentaram grupos monofiléticos associados aos seus respectivos grupos hospedeiros (**Figuras 10, 11 e 12**), mostrando-se *loci* com futuro promissor em estudos filogenéticos quando mais coccídios eimerianos forem sequenciados nessas mesmas regiões gênicas. Vale destacar o *locus* MAVCOXI, que apresentou resultados consistentes e bem sustentados na árvore filogenética (**Figura 11**) e pertence ao gene *cox1*, considerado um dos principais genes para delimitação de espécies no chamado 'código de barras da vida' (Ogedengbe 2011).

Conclui-se que a delimitação e descrição das espécies deve ser um processo detalhado e multifatorial, principalmente no caso de espécies extremamente polimórficas, a fim de evitar erros de identificação e descrições inválidas, ao mesmo tempo em que apresenta com maior compreensibilidade e especificidades as características inerentes a uma espécie (Dayrat, 2005). Nesse contexto, “Taxonomia Integrativa” é o nome dado ao uso de múltiplas ferramentas complementares que permitem analisar e inferir sobre um material biológico para descrever a biodiversidade (Dayrat, 2005; Fujita et al., 2012; Hoberg et al., 2015). No caso da identificação de espécies de coccídios eimerídeos, a abordagem multifatorial da análise da morfologia, estatística morfométrica, estudos moleculares e filogenéticos, considerações sobre a biologia e ecologia do parasita e do hospedeiro, como por exemplo: especificidade, sítios de infecção e nichos ecológicos) expressam a 'Taxonomia Integrativa' (Dayrat, 2005; Berto et al., 2014; 2023; Berto (Lopes, 2020). Assim, a abordagem multifatorial do presente trabalho apoiou a definição dos oocistos polimórficos eliminados de *P. plumbea* como uma única espécie, *E. patagioenasae*, tornando esta a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO E. A., THYSSEN P. J., CORDEIRO N. S. *Eimeria curvata* (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95:53–55, 2000.
- ADRIANO E. A., THYSSEN P. J., CORDEIRO N. S. A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. **Acta Protozoologica**, 42:71–73, 2003.
- ALYOUSIF M. S., AL-SHAWA Y. R., AL-ASIRI S. S. *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, 39:383–388, 2009.
- AMORIM D. S. Fundamentos de Sistemática Filogenética. **Holos Editora**: Ribeirão Preto, 2002.
- AYRES M., AYRES M., AYRES D. L., SANTOS A. A. S. **BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas**. Mamirauá: Belém, 2007.
- ATKINSON C. T., THOMAS N.J., HUNTER D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Wiley-Blackwell, Singapore, 2008.
- BALL S. J., DASZAK P., SWINNERTON K. R., JONES C. G., SNOW K.R. A new species of *Eimeria* (Apicomplexa:Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. **African Zoology** 47:369–372, 2012.
- BANDYOPADHYAY P. K., BHAKTA J. N., SHUKLA R. A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoea) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). **Zoos Print Journal** 21:2386–2387, 2006.
- BERTO B. P., FLAUSINO W., ALMEIDA C. R. R, LOPES C. W. G Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese, *Anser anser* L., 1758 from two distinct sites. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 30:215–219, 2008.
- BERTO B. P., FLAUSINO W., MCINTOSH D., TEIXEIRA-FILHO W. L., LOPES C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology** 80:159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>, 2011.
- BERTO B. P., MCINTOSH D., LOPES C. W. G Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia**, Vet 23:1–15, 2014.
- BERTO B. P., LOPES C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **Journal Parasitology**, 106:707–713, 2020.

BIRDLIFE INTERNATIONAL Species factsheet: *Patagioenas plumbea*. <http://www.birdlife.org>. Accessed 14 April, 2023.

BERTO B. P., MACHADO E. L., HOSSOTANI C. M. D. S., BERETTA B. M. S, SILVA D. R. R, NAKAMURA A. A., MEIRELES M. V. Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): Worldwide distribution, morphological and molecular characterization, revaluations and establishment of junior synonyms. **Systematic Parasitology**, 2023.

CASAS M. C., DUSZYNSKI D. W., ZALLES L. M. Three new eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from Eastern Bolivia and Southern Venezuela. **Journal Parasitology** 81:247–251, 1995.

CHATTERJEE D. K., RAY H. N. *Eimeria kapotei*, from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. Proc 24th, **Indian Science Congress**, 56:512, 1969.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, 85:407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>, 2005.

DOLNIK O. V. The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, 100:155–160. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>, 2006.

DOLNIK O. V., PALINAUSKAS V., BENSCH S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal Parasitology**, 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>, 2009.

DUSZYNSKI D.W. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. **Journal Parasitology**, 57:948–952. <https://doi.org/10.2307/3277841>, 1971.

DUSZYNSKI D. W., WILBER P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal Parasitology**, 83:333–336, 1997.

DUSZYNSKI D. W. Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. **Folia parasitologica**, 68:001, 2021.

FAYER R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Veterinary Parasitology**, 6:75–103, 1980.

FLAUSINO G., LOPES C. W. G, TEIXEIRA-FILLHO W. L., FURTADO T. T., MCINTOSH D, BERTO B. P. Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Acta Protozoologica**, 53:269–276, 2014.

FUJITA M. K., LEACHÉ A. D., BURBRINK F. T., MCGUIRE J. A., MORITZ C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, 27:480–488, 2012.

GARDNER S. L., DUSZYNSKI D. W. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. **Journal Parasitology**, 76:805–811, 1990.

GOLEMANSKY V. (1976) Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. **Acta Protozoologica**, 15: 399–404, 1976.

GOMEZ F. M., NAVARRETE I., RODRIGUEZ R. L. Influence of environmental factors on different populations of *Isospora lacazei* Labbe 1893 (Protozoa: Apicomplexa). **Revista Ibero-latinoamericana de parasitología**, 42:185–196, 1982.

GREIF G., STEPHAN B., HABERKORN A. Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. **Parasitology Research**, 82:706–714, 1996.

HAFEEZ M. A., STÁSIK I., DELNATTE P., EL-SHERRY S., SMITH D. A., BARTA J. R. Description of two new *Isospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Parasitology Research**, 113:3287–3297, 2014.

HOBERG E. P., AGOSTA S. J., BOEGER W. A., BROOKS D. R. (2015) An integrated parasitology: revealing the elephant through tradition and invention. **Trends in Parasitology**, 31:128–133, 2015.

ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 14 April 2023.

ICZN International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin Zoological Nomenclature**, 69:161–169, 2012.

JAMRIŠKA J., MODRÝ D. A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae). **Acta Protozoologica**, 51:329–333, 2012.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35:1547–1549, 2018.

MCQUISTION T. E. *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida galapagoensis*). **Transactions of the American Microscopical Society**, 110:178–181, 1991.

OLIVEIRA M. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., ORTÚZAR-FERREIRA C. N., MARONEZI C., THODE-FILHO S., CARDOZO S. V., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., BERTO B. P. *Eimeria ferreirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil. **Zootaxa** 4821:148–160, 2020.

OLIVEIRA M. S., RAMILO D.W., MELLO E. R., CARDOZO S. V., CAETANO I., BRAZIO E., FONSECA I. P., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., BERTO B. P. Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928

(Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal. **Parasitology Research**, 120:3569–3580, 2021.

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., OLIVEIRA M. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., FRANCO H. A., THODE-FILHO S., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Coccidia of Columbiformes of the World: A taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. **Parasitology Research**, 119:329–333, 2020.

MELLO D. J. M, MELLO G. J. M, MALLET-RODRIGUES F., LIMA L.M. Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação. **Editoração Irmãos Mello**, Rio de Janeiro, 2020.

MITRA A. N, DAS-GUPTA M. On a species of *Eimeria* (Coccidia–Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. Proc 24th, **Indian Science Congress**, 24:291, 1937.

NORTON C. C., JOYNER L. P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. **Parasitology** 83:269–279, 1981.

NIESCHULZ O. Ueber Kokzidien der Haustauben. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg** 134:390–393, 1935.

OGEDENGBE J. D., HANNER R. H., BARTA J. R. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **International Journal Parasitology** 41:843–850, 2011.

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., ANDRADE L. A. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., OLIVEIRA M. S., MELLO E. R., CARDOZO S. V., OLIVEIRA Á. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Molecular identification of *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil. **Zootaxa**, 5168, 83–91, 2022.

PARKER B. B., DUSZYNSKI D. W. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. **Journal Parasitology**, 72:602–604, 1986.

PIGLIUCCI M. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. The Johns Hopkins **University Press**, Baltimore, 2001.

PINTO C. Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa). **C. R. Seances Society Biology** 98:564–1565, 1928.

RAY D. K. On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae*, from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). **Journal Parasitology**, 38:546–547, 1952.

RIDGELY R. S., GWYNNE J. A., TUDOR G., ARGEL M. **Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste. Horizonte**, São Paulo, 2015.

RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D. L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M. A., HUELSENBECK J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Parasitology**, 61:539–542, 2012.

SAMPAIO I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. **FEP MVZ Editora**, Belo Horizonte, 2002.

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

SILVA-CARVALHO L. M, GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., OLIVEIRA M. S., OLIVEIRA Á. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 2020.

SILVA, RODRIGUES, LOPES, BERTO, LUZ, FERREIRA; LOPES, (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 97:847–855, 2015.

TARODA A., BARROS L. D., SEIXAS M., CARDIM S. T., SASSE J. P., MINUTTI A. P., VIDOTTO O., GARCIA J. L. First molecular detection of *Eimeria* spp. in eared doves (*Zenaida auriculata*) from Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 41:1259–1266, 2020.

TAYLOR M. A., COOP R. L., WALL R. L. **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017.

VARGHESE T. *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the greenwinged ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea. **Journal Parasitology**, 64:312–314 <https://doi.org/10.2307/3279680>, 1978.

VARGHESE T. Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. **Parasitology** 80:183–187, 1980.

WIENS J. J. Polymorphism in Systematics and Comparative Biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 30:327–362, 1999.

WILLIAMS R. B., THEBO P., MARSHALL R. N., MARSHALL J. A. Coccidian oöcysts as type–specimens: long–termstorage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76:69–76, 2010.

YABSLEY M. J., BAILEY K., ADAMS H. C. A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, *Zenaida macroura* (Columbiformes: Columbidae). **Comparative Parasitology**, 82:231–234, 2015.

YANG R., BRICE B., ELLIOT A., RYAN U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. **Experimental Parasitology**, 166:124–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.009>, 2016.

YANG R., BRICE B., BERTO B. P., RYAN U. M. Morphological and genetic characterization of *Eimeria chalcopterae* (Apicomplexa: Eimeriidae) in a common bronzewing pigeon (*Phaps chalcoptera*) (Latham, 1790) in Western Australia. **Parasitology Research**, 119:3729–3737. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06844-8>, 2020.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Após a obtenção dos resultados deste estudo pode-se concluir o seguinte:

- 1- É recomendável que a descrição de espécies coccidianas seja feita primariamente a partir do estudo morfológico de oocistos e que a identificação molecular complemente confirmando a identificação e delimitação das espécies, além de fundamentar o estudo filogenético.
- 2- A caracterização molecular de coccídios de Passeriformes mostram que sequências mais longas e múltiplos genes são mais conclusivos nas análises filogenéticas;
- 3- Com base nas características morfológicas e moleculares, *I. ferox* foi redescrita documentando um novo hospedeiro, *T. sulphurescens*, e uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, além do hospedeiro-tipo *M. Ferox* na Ilha da Marambaia, sudeste do Brasil.
- 4- Uma pequena sequência de apenas 250 bp talvez não permita maior resolução no estudo filogenético;
- 5- Sequências com mais de 600 bp de outras regiões do gene COI, como as geradas pela *primer* JAV (Genovez-Oliveira et al., 2020), podem apresentar melhores estimativas filogenéticas no futuro;
- 6- O *primers* JAV não teve sucesso na amplificação das amostras no estudo de Mello et al., (2022); no entanto, tem sido demonstrado em qualquer caso, que genes mitocondriais, como o COI, são mais adequados para trabalhar com oocistos individuais, pois o número de cópias de DNA mitocondrial é muito maior do que o número de cópias de DNA nuclear, favorecendo assim a amplificação de genes mitocondriais
- 7- *Isospora basileuterusi* foi considerada como nova espécie para a ciência, sendo a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através do sequenciamento do gene COI.
- 8- Baixas densidades e a ausência de sinais clínicos observados nos espécimes de aves capturados em diferentes momentos no Parque Nacional do Itatiaia, é compatível com o bom estado de conservação do parque;
- 9- O *primer* utilizado para amplificar e sequenciar a região gênica de 250 pb de COI tem sido considerado inadequado para estudos filogenéticos, embora esteja sendo razoavelmente apropriado para a delimitação de *Isospora* spp. de passeriformes até então;
- 10- *I. leptopogoni* foi considerada nova para a ciência, sendo a terceira espécie descrita de Rhynchocyclidae e a sétima registrada na parvordem Tyrannida;

- 11- *Eimeria patagioenasae* pode ser distinguida de todas as outras 21 espécies eimerianas por ser a única a apresentar capuz polar cobrindo sua micrópila superior, além da presença de um véu externo na parede externa dos oocistos.
- 12- Potencialmente *E. patagioenasae* está em um processo polimórfico de especiação e adaptação à *P. plumbea* a partir um eimeriano ancestral comum a *Eimeria* spp. de Columbiformes.
- 13- *Eimeria patagioenasae* é a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese abordou a caracterização, descrição morfológica e molecular de diferentes espécies coccídianas de aves silvestres e redescrição morfológica, com complementação de diagnóstico molecular de uma espécie já conhecida pela ciência. Alguns dos resultados aqui descritos, trazem informações importantes e ineditismo, como a descoberta das espécies *I. basileuterusi*, *I. leptopogoni* e *E. patagioenasae* apresentadas nos capítulos II, III e IV, respectivamente, e a adição de novos caracteres taxonômicos à *I. ferox* a partir de um novo hospedeiro *T. sulphurens*.

Baseado no presente estudo, fica demonstrado que a identificação molecular é uma ferramenta de complementação de grande importância diante de tantas variáveis que dificultam a taxonomia, como polimorfismos e baixo número de amostras, por exemplo.

Por último, outras pesquisas poderão ser realizadas, buscando conhecer melhor a ecologia dos coccídios, promovendo descrições, redescições e descobertas com maior riqueza de detalhes e informações.