

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

TESE

**Diversidade de hemosporídeos (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) em aves
Passeriformes da Mata Atlântica em Minas Gerais, Brasil: ecologia,
morfologia, taxonomia, filogenia e delimitação computacional de espécies**

Luísa de Oliveira

2018



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

**DIVERSIDADE DE HEMOSPORÍDEOS (*Plasmodium* E *Haemoproteus*)
EM AVES PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA EM MINAS
GERAIS, BRASIL: ECOLOGIA, MORFOLOGIA, TAXONOMIA,
FILOGENIA E DELIMITAÇÃO COMPUTACIONAL DE ESPÉCIES**

LUÍSA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

e Co-orientação do Professor
Roberto Júnio Pedroso Dias

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2018

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

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

O48d Oliveira, Luísa de, 1986-
Diversidade de hemosporídeos (Plasmodium e Haemoproteus) em aves Passeriformes da Mata Atlântica em Minas Gerais, Brasil: ecologia, morfologia, taxonomia, filogenia e delimitação computacional de espécies / Luísa de Oliveira. - 2018.
104 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Roberto Júnio Pedroso Dias.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2018.

1. Hemoparasitos. 2. Aves silvestres. 3. Diagnóstico microscópico. 4. Caracterização molecular. 5. Delimitação de espécies. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II. Dias, Roberto Júnio Pedroso, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

LUÍSA DE OLIVEIRA

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

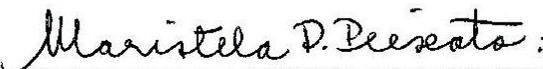
TESE APROVADA EM 05/12/2018



Huarrisson Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
(Orientador)



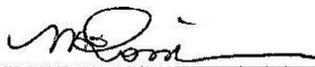
Carlos Luiz Massard. Dr. UFRRJ



Maristela Peckle Peixoto. Dra. UFRRJ



Maria Tavares D'Agosto. Dra. UFJF



Mariana Fonseca Rossi. Dra. UFJF

Dedico esse trabalho à minha família, pelo amor, carinho e apoio. Especialmente à minha Mãe, meu exemplo de vida, que de tudo fez para que minha caminhada fosse mais leve, peça fundamental nesta história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* pela vida, por estar sempre presente, por acalmar meu coração na hora da angústia e por me guiar para o melhor caminho.

Aos meus pais, *Luiz Estêvão de Oliveira* e *Ilza Pires Oliveira*, que me educaram da melhor forma, me proporcionaram ensino de qualidade e estão sempre me aconselhando e torcendo para que eu realize meus sonhos.

Aos meus irmãos, *Jaqueline*, *Luiz Henrique* e *Susana* por todos os momentos, felizes ou tristes, que fizeram com que eu amadurecesse mentalmente e espiritualmente. Especialmente à *Susi* por ter me acompanhado de perto esses quatro anos, sempre se preocupando, apoiando e me aconselhando.

Ao *Flávio Soares Rocha*, meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, agradeço por todo carinho, amor, incentivo e compreensão.

Ao professor *Huarrisson Azevedo Santos* pela oportunidade, receptividade, por todos os ensinamentos, pela orientação e principalmente pela confiança.

Ao professor *Roberto Dias*, pela co-orientação, pela imensa ajuda com o desenvolvimento das diretrizes deste trabalho, pelos ensinamentos, apoio e por todos os conselhos.

À professora *Marta D'Agosto*, pela oportunidade e receptividade no Laboratório de Protozoologia (UFJF), desde minha Iniciação Científica, sempre ensinando e incentivando. Pelo “projeto aves”, do qual foi coordenadora e proporcionou a realização deste trabalho.

Ao professor *Carlos Luiz Massard*, pela receptividade na rural e no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, por todos os ensinamentos, palavras de apoio e carinho.

Ao professor *Érik Daemon (in memorian)*, pelo incentivo, pela organização das coletas e contribuições para o trabalho.

À professora *Mariana Rossi*, pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo, por todos os ensinamentos e imensa ajuda com as análises filogenéticas.

Ao professor *Ralph Maturano*, pela parceria, contribuições com o “projeto aves” e identificação das aves.

À professora *Simone Cardoso*, por toda atenção e ajuda com as análises estatísticas.

Aos amigos do *Laboratório de Hemoparasitos e Vetores* e do *Laboratório de Sanidade Avícola* da UFRRJ, *Claudia Bezerra*, *Gabriela Vitari*, *Maristela Peckle*, *Marcus Sandes*, *Renata Lins*, *Danielle Godinho*, *Débora Martins*, *Patrícia Gonzaga*, *Roberta Tolomelli*, *Tays Araújo*, *Thamyris Sampaio*, pela receptividade, paciência, ajuda com as coletas e contribuições com o trabalho, pelo carinho, apoio e por todos os momentos de descontração.

A todos os *amigos do Laboratório de Protozoologia* (UFJF) e do *Laboratório de Artrópodes Parasitos* (UFJF), pela amizade, carinho, pela ajuda com as coletas, pelas palavras de incentivo, pelos estudos, conversas e por dividirem comigo momentos de alegria, de tensão e experiências que contribuíram para o meu crescimento.

À *Elen Juliana*, *Felipe Santos*, *Talys Assumpção* e *Glauber Barino*, pela ajuda com as análises.

À *Dani Coelho* pela amizade, carinho, pela ajuda com as coletas e no laboratório, pelas caronas, conversas, conselhos e por dividir comigo os momentos mais difíceis e também os mais alegres em Seropédica.

À *Glaucyana Gouvêa*, por tudo, pelo carinho, paciência, conselhos, ensinamentos, imensa ajuda e disposição e acima de tudo pela amizade.

A todos os *professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias*, pelos ensinamentos, experiências e oportunidade.

Ao *PPGCV*, pela oportunidade de ingressar e concluir esta pós-graduação e aos coordenadores, professores *José Luis Fernando Luque Alejos* e *Fábio Barbour Scott*, pela responsabilidade com as atividades administrativas.

Ao secretário administrativo, *Arthur Santiago Júnior*, pela paciência, compreensão e responsabilidade.

Ao *CNPq*, pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio para a realização do projeto e idas a congressos e cursos, que me proporcionaram experiência, aprendizado e crescimento.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

BIOGRAFIA

Luísa de Oliveira, filha de Luiz Estêvão de Oliveira e Ilza Pires Oliveira, nasceu em 31 de agosto de 1986, na cidade de São Vicente de Minas, Sul de Minas Gerais.

Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual José Bonifácio em São Vicente de Minas, o qual foi concluído no ano de 2001 e na mesma escola cursou o ensino médio, concluído em 2004.

Em agosto de 2008 ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais e em julho de 2012 diplomou-se Licenciada em Ciências Biológicas. Durante sua vida acadêmica foi bolsista de Treinamento Profissional e bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Protozoologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto.

Em 2013, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, nível de Mestrado, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto, sendo bolsista pela CAPES. O título de Mestre foi obtido no ano de 2014.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica-RJ, sob orientação do Professor Doutor Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do Professor Doutor Roberto Júnio Pedroso Dias, sendo bolsista pelo CNPq.

RESUMO

DE OLIVEIRA, Luísa. **Diversidade de hemosporídeos (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) em aves Passeriformes da Mata Atlântica em Minas Gerais, Brasil: ecologia, morfologia, taxonomia, filogenia e delimitação computacional de espécies.** 2018. 104p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Os hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são parasitos comuns em aves. Esses parasitos causam patologias sanguíneas e teciduais, resultando em doenças severas como a malária aviária. Recentemente numerosos estudos relataram sequências de DNA desses hemoparasitos indicando que uma rica diversidade de espécies ainda está por ser descoberta. Entretanto, a maioria das linhagens permanece não identificada em nível específico, sendo necessário investir em diversas ferramentas para conhecer a biodiversidade destes parasitos. A Mata Atlântica brasileira apresenta uma das maiores avifaunas do mundo e estudos sobre hemosporídeos em aves de vida livre deste bioma são escassos. No presente estudo foram examinadas 442 aves da família Thraupidae e 28 da família Passerellidae, de fragmentos da Mata Atlântica de Minas Gerais para verificar a ocorrência de espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus*. A prevalência e intensidade de infecção foram registradas por meio de análises microscópicas e comparadas em função de fatores associados aos hospedeiros e ao ambiente de captura das aves. Além disso, a análise do gene mitocondrial citocromo b dos parasitos foi realizada para auxiliar na identificação de algumas espécies e trabalhar a delimitação de espécie computacional, um novo método para área de hemosporídeos. A prevalência de hemosporídeos em aves da família Thraupidae foi alta (60,4%), sendo que a maioria das infecções foi de *Plasmodium* spp. (99%). A parasitemia e a prevalência variaram com alguns fatores ecológicos adotados. Em Passerellidae foi registrada prevalência de 71%. O método computacional delimitou seis espécies de *Plasmodium* e uma espécie de *Haemoproteus* parasitando aves *Tachyphonus coratus*. E uma espécie de *Haemoproteus* foi detectada, por meio da caracterização morfológica e molecular, parasitando aves das espécies *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis*. Esse estudo mostra que os parasitos hemosporídeos estão presentes com intensidade nas aves da Mata Atlântica e que isso pode estar relacionado com a alta diversidade dos hospedeiros e vetores no bioma, assim como, a fatores ecológicos, biológicos e também com alterações ambientais. O novo método de delimitação utilizado pode ajudar a compreender a distribuição dos hemosporídeos pelo mundo e a conhecer as espécies circulantes nas populações de aves silvestres. O estudo mostra ainda a importância de integrar metodologias para identificação das espécies destes parasitos, o que ajudará na compreensão do papel potencial desses organismos como agentes de doenças e sua influência sobre a ecologia das aves, questões importantes para serem trabalhadas na conservação das espécies aviárias.

Palavras-chave: Aves silvestres, hemoparasitos, gene *cytb*, delimitação de espécies, evolução, conservação.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Luísa. **Haemosporidian diversity (*Plasmodium* and *Haemoproteus*) in Passerine birds of the Atlantic Forest in Minas Gerais, Brazil: ecology, morphology, taxonomy, phylogeny and computational species delimitation.** 2018. 104p. Thesis (Doctor in Sciences, Veterinarian Parasitology) Instituto de Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Hemosporidian of the *Plasmodium* and *Haemoproteus* genus are common parasites in birds. These parasites cause blood and tissue pathologies, resulting in severe diseases such as avian malaria. Recently numerous studies have reported DNA sequences of these hemoparasites indicating that a rich diversity of species is yet to be discovered. However, most of the lineages remain unidentified at a specific level, and it is necessary to invest in several tools to know the biodiversity of these parasites. The Brazilian Atlantic Forest presents one of the largest avifauna in the world and studies on hemosporidian in free-living birds of this biome are scarce. In the present study, 442 birds of the family Thraupidae and 28 of the family Passerellidae, from fragments of the Atlantic Forest of Minas Gerais were examined to verify the occurrence of species of *Plasmodium* and *Haemoproteus*. The prevalence and intensity of infection were recorded through microscopic analysis and compared according to factors associated with the hosts and the bird catching environment. In addition, analysis of the mitochondrial cytochrome b gene of the parasites was performed to assist in the identification of some species and to make the delimitation of computational species, a new method for the area of haemosporidian. The prevalence in birds of the Thraupidae family was high (60.4%), with the majority of infections being *Plasmodium* spp. (99%). Prevalence and infection intensity varied with some ecological factors adopted. A prevalence of 71% was recorded in Passerellidae. The computational method delimited six species of *Plasmodium* and one species of *Haemoproteus* parasitizing *Tachyphonus coratus*. One species of *Haemoproteus* was detected, through morphological and molecular characterization, parasitizing *Tangara sayaca* and *Zonotrichia capensis*. This study shows that haemosporidian are present in birds in the Atlantic Forest and that this can be related to the high diversity of hosts and vectors in the biome, as well as ecological, biological and also environmental changes. The new method of delimitation used can help to understand the distribution of haemosporidian around the world and to know the circulating species in the populations of wild birds. The study also shows the importance of integrating methodologies to identify the species of parasites, which will help in understanding the potential role of these organisms as agents of diseases and their influence on bird's ecology, important issues to be addressed in the conservation of avian species.

Keywords: Wild birds, haemoparasites, *cytb* gene, species delimitation, evolution, conservation.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Análise descritiva e bivariada das características ambientais e características das aves infectadas por *Plasmodium* spp., diagnosticadas por meio da leitura de esfregaços sanguíneos sob microscopia óptica..... 26
- Tabela 2.** Parasitemia média total de *Plasmodium* spp. em aves machos e fêmeas positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo, coletadas na estação seca e chuvosa. A análise de variância foi utilizada na comparação dos valores médios de parasitemia, comparando-se os grupos de aves positivas por sexo em cada estação do ano de coleta..... 27

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Prevalência e parasitemia de *Haemoproteus* spp. em aves das famílias Thraupidae e Passerellidae da Mata Atlântica de Minas Gerais..... 61
- Tabela 2.** Caracterização dos gametócitos jovens, macrogametócitos e microgametócitos de *Haemoproteus* spp. em *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis* (1) e (2) da Mata Atlântica de Minas Gerais..... 61
- Tabela 3.** Morfometria comparativa dos eritrócitos dos hospedeiros e gametócitos de *Haemoproteus* sp. de *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis*..... 67
- Tabela 4.** Divergências genéticas com base em fragmentos de 479 pb do gene mitocondrial citocromo b entre as linhagens de *Haemoproteus coatneyi* e *Haemoproteus erythrogravidus* usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito..... 71
- Tabela 5.** Linhagens que foram previamente atribuídas às morfoespécies *Haemoproteus coatneyi* e *H. erythrogravidus**, linhagens do presente estudo (negrito) que agruparam no mesmo clado, seus respectivos hospedeiros e a localidade que os hospedeiros infectados foram capturados..... 72

LISTA DE FIGURAS

REVISAO DE LITERATURA

- Figura 1.** Representação do ciclo biológico de *Plasmodium relictum*, parte superior vetor (17– 24), parte inferior ave (1–16). I, II – merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária. 1 – esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 – criptozoítos; 4 – merozoíto em macrófago; 5, 6 – metacriptozoíto; 7 – merozoítos nos eritrócitos; 8 – gametócitos; 9 – merozoítos nos eritrócitos; 10, 11 – merontes eritrocitários; 12 – merozoíto em células endoteliais de capilares; 13, 14 – fanerozoítos; 15 – merozoítos em eritrócitos; 16 – gametócitos; 17 – macrogameta; 18 – exflagelação dos microgametas; 19 – fertilização do macrogameta; 20 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 – oocisto jovem; 22, 23 – esporogonia; 24 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (VALKIŪNAS, 2005)..... 7
- Figura 2.** Representação do ciclo biológico de *Haemoproteus mansonii*, parte superior vetor (14–21), parte inferior ave (1–13). 1 – esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 – merontes exoeritrocíticos primários; 4 – merozoítos em células endoteliais; 5, 6 – crescimento e megalomerontes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítos na célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 – crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 – merozoítos em eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogameta; 15 – exflagelação dos microgametas; 16 – fertilização do macrogameta; 17 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 – esporogonia; 21 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (VALKIŪNAS, 2005)..... 9

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Pontos de captura das aves e coleta de sangue em cinco locais da região de Juiz de Fora, Zona da Mata, Minas Gerais. CAE (Sítio Vista Alegre), CHA (Sítio Paraíso da Barra), JB (Jardim Botânico-UFJF), PASS (Granja Passarada) e SBMV (Fazenda Volta Grande)..... 20
- Figura 2.** Espécies de aves da família Thraupidae. Os números entre parênteses representam (número de indivíduos infectados/número de indivíduos examinados). Indivíduos do sexo masculino são apresentados (imagens adaptadas de DEL HOYO et al., 2018)..... 24
- Figura 3.** Prevalência de hemosporídeos (*Plasmodium*/*Haemoproteus*) por espécie de ave estudada. Os números em cima das barras indicam o número total de aves. As barras cinza escuro indicam as espécies de aves que tiveram o “n” amostral maior do que 10. Os asteriscos indicam as espécies de aves que apresentaram gametócitos nos esfregaços sanguíneos. Os triângulos indicam as duas espécies de aves que apresentaram indivíduo infectado por *Haemoproteus* spp..... 25

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Relações evolutivas entre linhagens do gene mitocondrial citocromo b das morfoespécies de hemosporídeos estimadas pela análise de Máxima Verossimilhança (ML). *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Nós com valores suportes > 50% são indicados próximos aos cladogramas. As sequências do presente estudo estão em negrito. Barra representa 4 substituições por 100 posições de nucleotídeos..... 41
- Figura 2.** Espécies de *Plasmodium* encontradas em *Tachyphonus coronatus* e delimitadas pelo método MPTP. Foram evidenciadas somente as linhagens do presente trabalho (em negrito) e as morfoespécies que se agruparam a elas..... 43
- Figura 3.** Espécie de *Haemoproteus* encontrada em *Tachyphonus coronatus* e delimitada pelo método MPTP. Foi evidenciado somente o clado que contém as linhagens do presente trabalho (em negrito) e as morfoespécies que se agruparam a elas..... 44
- Figura 4.** Gráfico representando as ordens de aves parasitadas pelas espécies delimitadas no presente trabalho pelo MPTP. Cada cor representa uma espécie, “n” representa o número de vezes que aquela espécie foi registrada no geral. Os números entre parênteses mostram quantas vezes cada espécie foi registrada nas ordens das aves..... 45
- Figura 5.** Mapa da distribuição geográfica das espécies de parasitos delimitadas no presente estudo pelo MPTP..... 46

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Tangara sayaca* de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens e em crescimento (a–d); macrogametócitos (e–k); microgametócitos (l–p). Setas indicam o núcleo dos parasitos; cabeças de setas indicam grânulos de pigmentos. Barra = 12 µm..... 64
- Figura 2.** Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Zonotrichia capensis* (1) de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens (a–d); macrogametócitos (e–j); microgametócitos (k–p). Seta preta indica o núcleo do parasito; cabeças de setas pretas indicam grânulos de pigmentos. Setas pretas com cabeça aberta indicam vacúolos. Setas brancas indicam protrusões formadas nos eritrócitos infectados, cabeças de setas brancas indicam atenuação na parte central dos gametócitos. Barra = 11 µm..... 65

Figura 3. Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Zonotrichia capensis* (2) de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens (a–d); macrogametócitos (e–j); microgametócitos (k–p). Seta preta indica o núcleo do parasito; cabeças de setas pretas indicam grânulos de pigmentos. Setas pretas com cabeça aberta indicam vacúolos. Setas brancas indicam protrusões formadas nos eritrócitos infectados, cabeças de setas brancas indicam atenuação na parte central dos gametócitos. Barra = 11 µm..... 66

Figura 4. Relações evolutivas entre linhagens das morfoespécies de *Haemoproteus* estimadas pela análise de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*). A topologia representada é da IB. Nós com valores suportes > 50% são indicados próximos aos clados ML/BI, respectivamente. (-) indica valores < 50%. As sequências do presente estudo estão em negrito. *Leucocytozoon* spp. foram usadas como grupo externo. Barra representa 20 substituições por 100 posições de nucleotídeos..... 70

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 A Ordem Haemosporida..... | 3 |
| 2.2 Ciclo Biológico de <i>Plasmodium</i> | 5 |
| 2.3 Ciclo Biológico de <i>Haemoproteus</i> | 8 |
| 2.4 Haemosporida em Aves Silvestres do Brasil..... | 9 |
| 2.5 Identificação de Espécies em Haemosporida..... | 11 |
| 2.6 Delimitação Computacional de Espécies..... | 13 |
| 2.7 Parasitismo, Ecologia e Conservação da Avifauna..... | 14 |
| CAPÍTULO I | 15 |
| 3 HEMOSPORÍDEOS (<i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp.) EM AVES DA FAMÍLIA THRAUPIDAE (PASSERIFORMES) DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS, BRASIL: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS HOSPEDEIROS E AMBIENTAIS NA TAXA DE INFECÇÃO | 15 |
| RESUMO | 16 |
| ABSTRACT | 17 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.2.1 Locais de coleta..... | 20 |
| 3.2.2 Captura das aves e coleta de sangue..... | 20 |
| 3.2.3 Análises microscópicas..... | 21 |
| 3.2.4 Análises dos dados..... | 21 |
| 3.3 RESULTADOS | 23 |
| 3.3.1 Espécies de aves examinadas..... | 23 |
| 3.3.2 Prevalência e parasitemia..... | 24 |
| 3.4 DISCUSSÃO | 28 |
| 3.5 CONCLUSÕES | 31 |
| CAPÍTULO II | 32 |
| 4 ALTA DIVERSIDADE DE HEMOSPORÍDEOS EM <i>Tachyphonus coronatus</i>, AVE ENDÊMICA DA AMÉRICA DO SUL, BASEADA NA DELIMITAÇÃO COMPUTACIONAL DE ESPÉCIES | 32 |
| RESUMO | 33 |
| ABSTRACT | 34 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 35 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.2.1 Descrição da área estudada e coleta de sangue..... | 37 |
| 4.2.2 Análises microscópicas..... | 37 |
| 4.2.3 Análises dos dados..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4 Extração do ácido nucleico (DNA)..... | 37 |
| 4.2.5 Detecção molecular..... | 38 |
| 4.2.6 Sequenciamento..... | 38 |
| 4.2.7 Análises filogenéticas..... | 38 |
| 4.2.8 Delimitação de espécies..... | 39 |
| 4.3 RESULTADOS..... | 40 |
| 4.3.1 Prevalência, intensidade parasitária, sazonalidade e agregação..... | 40 |
| 4.3.2 Reconstrução filogenética..... | 40 |
| 4.3.3 Delimitação das espécies..... | 42 |
| 4.3.4 Distribuição das espécies em hospedeiros aviários no mundo..... | 45 |
| 4.4 DISCUSSÃO..... | 47 |
| 4.5 CONCLUSÕES..... | 52 |
| CAPÍTULO III..... | 53 |
| 5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Haemoproteus</i> sp. EM PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS..... | 53 |
| RESUMO..... | 54 |
| ABSTRACT..... | 55 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 56 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 58 |
| 5.2.1 Área de estudo e coleta de sangue..... | 58 |
| 5.2.2 Análises microscópicas, morfológicas e morfométricas..... | 58 |
| 5.2.3 Extração de DNA..... | 58 |
| 5.2.4 Detecção Molecular..... | 59 |
| 5.2.5 Sequenciamento..... | 59 |
| 5.2.6 Análises filogenéticas..... | 59 |
| 5.2.7 Delimitação de espécies..... | 60 |
| 5.3 RESULTADOS..... | 61 |
| 5.3.1 Prevalência e intensidade de infecção..... | 61 |
| 5.3.2 Caracterização morfológica e morfométrica de <i>Haemoproteus</i> spp. em <i>Tangara sayaca</i> e <i>Zonotrichia capensis</i> (1) e (2)..... | 61 |
| 5.3.3 Linhagens do gene citocromo b (<i>cytb</i>) e reconstrução filogenética..... | 69 |
| 5.3.4 Delimitação Computacional das Espécies..... | 72 |
| 5.3.5 Hospedeiro aviário e distribuição..... | 72 |
| 5.4 DISCUSSÃO..... | 74 |
| 5.5 CONCLUSÕES..... | 77 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 78 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |

| | |
|--|-----------|
| ANEXOS..... | 97 |
| A – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA) DA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF)..... | 98 |
| B – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 29268-3 e 29268-4..... | 99 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Haemosporida (Apicomplexa) possui muitos parasitos de importância médica, incluindo as espécies de *Plasmodium*, causadoras da malária (GARNHAM, 1966). Conhecidos como hemosporídeos, os parasitos dessa ordem podem ser de grande importância epidemiológica por acarretar grandes prejuízos econômicos para a saúde pública e animal, causando sérios agravos a saúde, incluindo a morte do hospedeiro (TALISUNA et al., 2004). Esses parasitos são protozoários heteroxenos obrigatórios com merogonia em células de tecidos e células sanguíneas de mamíferos, aves, répteis e anfíbios e a gametogonia ocorre nos eritrócitos destes hospedeiros, já o processo sexual e a esporogonia é desenvolvida em dípteros hematófagos (GARNHAM, 1966). Além das ameaças à saúde humana, os hemosporídeos possuem importância ecológica, principalmente para a conservação de espécies hospedeiras susceptíveis (ATKINSON et al., 2000).

Nos últimos 15 anos, estudos sobre a distribuição e a diversidade de parasitos hemosporídeos em hospedeiros silvestres cresceram acentuadamente, principalmente em hospedeiros aviários (CLARK et al., 2014; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018). Aves do mundo todo se encontram parasitadas com diversas espécies de Haemosporida, as quais estão divididas em quatro famílias: Haemoproteidae, Plasmodiidae, Garniidae e Leucocytozoidae (VALKIŪNAS, 2005). O gênero *Haemoproteus* da família Haemoproteidae e o gênero *Plasmodium* da família Plasmodiidae contêm a maior parte dos hemosporídeos com aproximadamente 140 e 55 espécies descritas, respectivamente (DIMITROV et al., 2014; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018).

Tradicionalmente, a identificação e a classificação destes parasitos são realizadas por meio da caracterização morfológica das fases evolutivas circulantes no sangue dos hospedeiros vertebrados, que são visualizadas em esfregaços sanguíneos sob microscopia óptica (GARNHAM, 1966). No entanto, essa ferramenta é um tanto limitada quando se trata de aves silvestres, pois a maioria das aves capturadas apresenta baixa parasitemia o que dificulta a caracterização (VALKIŪNAS, 2005).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, o estudo das sequências de DNA tornou-se indispensável para auxiliar na identificação das espécies de hemosporídeos (CLARK et al., 2015). Numerosas sequências de DNA são encontradas no MalAvi, banco de dados criado para depositar somente linhagens do gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*) dos hemosporídeos aviários (BENSCH et al., 2009). A grande quantidade de sequências no MalAvi indica uma rica diversidade genética e a possível existência de muitas espécies não descritas (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018). No entanto, a maior parte das linhagens depositadas não é identificada em nível específico e a caracterização molecular não está disponível para a maioria dos hemosporídeos descritos (MalAvi *database*, BENSCH et al., 2009). O acúmulo de dados moleculares e a ambiguidade que se tem para determinar as espécies de hemosporídeos mostra que permanecemos em um território inexplorado no que diz respeito a caracteres taxonômicos informativos para delimitar espécies (OUTLAW; RICKLEFS, 2014).

Vários critérios foram sugeridos para delimitar as espécies de hemosporídeos, incluindo a concordância entre dados de sequências multi-locus e níveis absolutos de divergência genética ou diferenças fixas de nucleotídeos (FALK et al., 2011; BENSCH et al., 2007; OUTLAW; RICKLEFS, 2014). De acordo com Outlaw e Ricklefs (2014), a concordância dos dados multi-locus seria a melhor alternativa se não houvesse dificuldade em amplificar o DNA mitocondrial dos parasitos e se os marcadores para os genomas nucleares e do apicoplasto fossem adequados às análises filogenéticas e populacionais, uma vez que são muito curtos e carecem de caracteres informativos. Desse modo, métodos alternativos para

estudos sobre delimitação de espécies na ordem Haemosporida devem ser utilizados a fim de integrar informações e contribuir para melhorias na taxonomia do grupo.

A delimitação computacional de espécies é uma nova metodologia que utiliza algoritmos computacionais para delimitar ou validar unidades evolutivas significantes (ESUs) (RYDER, 1986). Essa ferramenta se baseia no conceito filogenético de espécie (ELDREDGE; CRACRAFT, 1980) e tem sido valiosa para detectar os limites entre as espécies de procariontes e eucariontes (CARSTENS; DEWEY, 2010; YANG; RANNALA, 2010; MEIER-KOLTHOFF et al., 2013; FUJISAWA et al., 2016; MELLO et al., 2018). Diante da grande quantidade de informações sobre o gene mitocondrial *cyt b* de hemosporídeos aviários, tal método pode ser uma ferramenta boa e prática para compreender a distribuição da diversidade genética deste grupo de parasitos.

No Brasil, embora haja poucos estudos com hemosporídeos aviários, dois deles exemplificam a diversidade de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em várias espécies de aves da região Sudeste e da Amazônia, mostrando uma elevada riqueza de linhagens destes parasitos (LACORTE et al., 2013; FECCHIO et al., 2017a). A riqueza de linhagens, a diversidade de habitats e espécies hospedeiras sugerem uma biodiversidade oculta de hemosporídeos nas comunidades de aves do Brasil (MalAvi database, BRAGA et al., 2011).

A Mata Atlântica brasileira é um dos principais *hotspots* (áreas que possuem grande biodiversidade e concentração de espécies endêmicas) do mundo, no entanto, sofre constantemente com a ação antrópica e a destruição ambiental (MMA, 2002). O bioma possui aproximadamente 850 espécies aviárias, sendo que a maioria é endêmica e muitas estão ameaçadas de extinção (CAMPANILI; SCHÄFFER, 2010). O parasitismo é um dos fatores que contribui para a perda da biodiversidade e particularmente, infecções por hemosporídeos podem ser mais uma ameaça para as aves desse ecossistema, uma vez que estes parasitos podem levar os hospedeiros à morte e em casos mais extremos levar à extinção de espécies susceptíveis (ATKINSON et al., 2000). Desse modo, compreender a diversidade, os padrões de distribuição e os aspectos evolutivos desses parasitos nos hospedeiros aviários é importante para a implementação e investimentos em programas de conservação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Ordem Haemosporida

Os hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) são protozoários parasitos que se desenvolvem no sangue e nos tecidos de animais como anfíbios, répteis, aves, mamíferos, e são transmitidos a estes hospedeiros por dípteros hematófagos (GARNHAM, 1966). O ciclo biológico dos parasitos da ordem Haemosporida é semelhante e possui fase assexuada e sexuada (GARNHAM, 1966). A presença de macrogametócitos e microgametócitos que se desenvolvem independentemente, zigoto móvel (ou oocineto), esporozoítos e esquizontes são as principais características encontradas no desenvolvimento destes parasitos (GARNHAM, 1966; REMPLE, 2004).

Os estudos com hemosporídeos em hospedeiros aviários passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade destes parasitos com os agentes da malária humana, pertencentes ao gênero *Plasmodium* (SÁ, 2011). Em 1885, o biólogo russo, Vassily Danilewsky, encontrou vários estágios do desenvolvimento eritrocítico dos parasitos ao examinar o sangue de anfíbios, répteis e aves. Danilewsky estudou detalhadamente as formas encontradas, ilustrando-as e descrevendo-as e observou que os parasitos de aves eram muito semelhantes aos parasitos da malária (VALKIŪNAS, 2005; PERKINS, 2014).

As principais características para a definição da ordem Haemosporida foram então formuladas por Danilewsky (VALKIŪNAS, 2005). Adicionalmente, vários estudos contribuíram para o melhor conhecimento do grupo apresentando informações importantes como, a exflagelação e a formação do oocineto que foi observada no sangue de um corvo infectado com *Haemoproteus* sp. na América do Norte em 1897 (MACCALLUM, 1898); a produção de esporos em mosquitos que alimentaram em aves infectadas por *Plasmodium relictum* observada por Sir Ronald Ross em 1929 (MARZAL, 2012) e a fase exoeritrocítica de *Hemoproteus columbae* no endotélio pulmonar de pombo no Brasil descoberta por Aragão (1907), que mostrou pela primeira vez a capacidade de um hemoparasito se multiplicar em células do tecido (SÁ, 2011). Posteriormente, James e Tate (1937) descreveram merontes exoeritrocíticos de *Plasmodium* sp. e em 1943 o pesquisador brasileiro, Wladimir Lobato Paraense, mostrou grandes avanços para o entendimento do desenvolvimento do ciclo exoeritrocítico de *Plasmodium gallinaceum* em *Gallus gallus* (SÁ, 2011).

Historicamente a classificação de Haemosporida foi bem dinâmica, sendo que a divisão em famílias, gêneros e subgêneros foi feita diferentemente por vários autores. GARNHAM (1966) defendeu a separação dos gêneros em três famílias, Plasmodiidae Mesnil, 1903, Haemoproteiidae Doflein, 1916 e Leucocytozoidae Fallis e Bennett, 1961. Posteriormente Lainson et al. (1971) propuseram a família Garniidae Lainson, Landau e Shaw, 1971. A classificação em famílias foi realizada de acordo com caracteres observados nas formas evolutivas encontradas no hospedeiro vertebrado, como a presença do grânulo de pigmento e merogonia eritrocítica = Plasmodiidae; presença de grânulo de pigmento sem merogonia eritrocítica = Haemoproteidae; ausência de grânulo de pigmento com merogonia eritrocítica = Garniidae e ausência de grânulo de pigmento e sem merogonia eritrocítica = Leucocytozoidae (LAINSON et al., 1971). Levine (1988) agrupou todas as famílias e as chamou de Plasmodiidae, mas a utilização dessa classificação foi interrompida. Deste modo, Valkiūnas (2005) deu continuidade à classificação defendida por Garnham (1966) e Lainson et al. (1971) e publicou um livro com todas as espécies das quatro famílias, descritas com base em caracteres morfológicos e táxon dos hospedeiros, o qual foi intitulado “Parasitos da Malária Aviária e Outros Hemosporídeos” e atualmente a maioria dos pesquisadores ou especialistas segue essa convenção.

Antes que fossem agrupados em famílias, os gêneros, classificados de acordo com os padrões tradicionais, foram divididos em quatro: *Haemoproteus* Kruse, 1890, *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885, *Fallisia* Lainson, Landau & Shaw, 1974 e *Leucocytozoon* Berestneff, 1904 (VALKIŪNAS, 2005). A classificação genérica, no entanto, apresenta muitas incongruências tanto em relação aos caracteres morfológicos quanto aos traços da história de vida e ao táxon do hospedeiro (PERKINS, 2014). Dentre os muitos exemplos dessas inconsistências, a ausência de grânulo de pigmento em *Plasmodium azurophilum* e *Plasmodium gemini* confronta a classificação tradicional, uma vez que a presença deste caractere foi um dos parâmetros utilizados para separar as espécies e inclui-las no gênero *Plasmodium* (PERKINS; SCHALL, 2002; PERKINS; AUSTIN, 2009).

A classificação tradicional também levou à divisão subgenérica que é amplamente utilizada para a identificação das espécies de hemosporídeos (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018). Inicialmente foram definidos quatro subgêneros de *Plasmodium*: *Haemamoeba*, Grassi & Feletti, 1890; *Novyella*, *Giovannolaia* e *Huffia* Corradetti, Garnham & Laird, 1963 (CORRADETTI et al., 1963) e posteriormente dois subgêneros foram propostos: *Bennettinia* criado por Valkiūnas (1997) e *Papernaia*, criado por Landau et al. (2010). Este último foi descrito para parasitos semelhantes aos do subgênero *Novyella* cujos merontes eritrocíticos não possuem glóbulos, no entanto, a origem e função deste caractere não foram esclarecidas, fazendo com que *Papernaia* seja considerado sinônimo do subgênero *Novyella* até que informações adicionais estejam disponíveis (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018).

No gênero *Haemoproteus* são definidos os subgêneros *Haemoproteus* Kruse, 1890 e *Parahaemoproteus* Bennett, Garnham & Fallis, 1965 (BENNETT et al., 1965). Os parasitos foram separados nestes subgêneros de acordo com as espécies de seus vetores, sendo que no subgênero *Haemoproteus* são incluídas as espécies transmitidas por moscas da família Hipoboscidae e em *Parahaemoproteus* são incluídas as espécies transmitidas por mosquitos da família Ceratopogonidae (KRIŽANAUSKIENĖ et al., 2013).

O gênero *Leucocytozoon* foi dividido nos subgêneros *Leucocytozoon* Berestneff, 1904 e *Akiba* Bennett, Garnham & Fallis, 1965, baseado nas espécies de vetores. Os vetores de *Akiba* são mosquitos da família Ceratopogonidae e para as espécies do subgênero *Leucocytozoon* são moscas da família Simuliidae (VALKIŪNAS, 2005).

Deste modo, a seguinte classificação é aceita pelos taxonomistas atualmente:

Ordem: Haemosporida

Família: Haemoproteidae

Gênero: *Haemoproteus*

Subgênero *Parahaemoproteus*

Subgênero *Haemoproteus*

Família: Plasmodiidae

Gênero: *Plasmodium*

Subgênero *Haemamoeba*

Subgênero *Giovannolaia*

Subgênero *Novyella*

Subgênero *Bennettinia*

Subgênero *Huffia*

Família: Garniidae

Gênero: *Fallisia*

Subgênero *Plasmodioides*

Família: Leucocytozoidae

Gênero: *Leucocytozoon*

Subgênero *Leucocytozoon*

Subgênero *Akiba*

A classificação tradicional (caracteres morfológicos, traços da história de vida e táxon do hospedeiro), levou à descrição de mais de 132 espécies de *Haemoproteus*, 38 espécies de *Plasmodium*, 35 espécies de *Leucocytozoon* e uma espécie de *Fallisia*, as quais foram encontradas em aproximadamente 4.000 espécies de aves estudadas mundialmente (VALKIŪNAS, 2005). Embora a região Neotropical tenha poucas espécies de Haemosporida registradas quando comparada com as regiões temperadas, há registros de 18 espécies de *Plasmodium*, sendo *Novyella* e *Giovannolaia* os subgêneros mais abundantes e 28 espécies de *Haemoproteus*, das quais, a maioria pertence ao subgênero *Parahaemoproteus* (VALKIŪNAS, 2005). No Brasil, o registro de espécies do gênero *Plasmodium* é substancialmente maior do que o número de espécies de *Haemoproteus* (VALKIŪNAS, 2005). Em relação ao gênero *Leucocytozoon*, até o momento não havia registros em aves do país, no entanto, Fecchio et al. (2018a) apresentaram dados de sequências genéticas apontando a presença de *Leucocytozoon* spp. em aves da Amazônia, entretanto, essas informações não são confirmadas por dados morfológicos (FECCHIO et al., 2018a). Da mesma forma, não existe registro de *Fallisia* spp. em aves brasileiras e estudos direcionados para investigação de espécies deste gênero seriam interessantes, uma vez que este parasito já foi registrado em lagartos do Brasil (LAINSON et al., 1974).

2.2 Ciclo Biológico de *Plasmodium*

Os parasitos da malária (*Plasmodium*) são espécies generalistas encontrados em aves do mundo todo. Os dípteros da família Culicidae são os transmissores do agente patogênico da malária aviária e somente as fêmeas desses insetos se alimentam de sangue e, conseqüentemente, participam da propagação da infecção. (VALKIŪNAS, 2005; SANTIAGO-ALARCON et al., 2012). As características do ciclo de vida de *Plasmodium* são apresentadas abaixo; e são principalmente obtidas a partir de observações em *Plasmodium relictum*, pois, essa é uma espécie amplamente distribuída em hospedeiros vertebrados pelo mundo e já foi muito bem estudada (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005).

O ciclo biológico de *Plasmodium* apresenta três estágios obrigatórios principais: 1- merogonia exoeritrocítica (esquizogonia); 2- merogonia eritrocítica e produção de gametócitos, os quais são infectantes para vetores; e 3- processo sexual e esporogonia que ocorrem nos insetos dípteros, que injetam esporozoítos infecciosos e iniciam novas infecções em hospedeiros vertebrados (Figura 1). A merogonia exoeritrocítica é dividida em primária ou pré-eritrocítica (I e II) e secundária ou pós-eritrocítica (IV). A merogonia exoeritrocítica primária consiste em duas gerações de merontes teciduais, que são chamados de criptozoítos (2 e 3) e metacriptozoítos (5 e 6), respectivamente. A merogonia exoeritrocítica secundária incluem várias gerações de merontes que são chamados de fanerozoítos (13 e 14) (VALKIŪNAS et al. 2005; 2018).

A merogonia eritrocitária (III) ocorre somente nas espécies de *Plasmodium*, essa fase não acontece nos demais hemosporídeos, o que é importante na identificação, patogenicidade e na transmissão experimental de *Plasmodium*, sendo possível a transmissão do parasito de hospedeiros infectados para não-infectados por uma simples inoculação de sangue (VALKIŪNAS, 2005; MARZAL, 2012).

Na glândula salivar do vetor estão presentes os esporozoítos (24), que são inoculados nas aves durante o repasto-sanguíneo e invadem as células endoteliais e mononucleares fagocíticas (1) dando origem à primeira geração de merontes exoeritrocíticos ou criptozoítos (2). Esses merontes produzem dezenas de merozoítos (3) que ainda não são capazes de infectar os eritrócitos circulantes. Essa fase é conhecida como merogonia exoeritrocítica primária (I). Então, os criptozoítos desenvolvem-se em metacriptozoítos (4) nos macrófagos de diferentes órgãos, por exemplo, baço, pulmão, fígado e medula óssea, por meio de

reprodução assexuada do parasito (5), liberando assim, grande quantidade de merozoítos (6) e a segunda geração de parasitos da merogonia exoeritrocítica primária é formada (II). Os parasitos possuem morfologia semelhante nas duas fases anteriores, uma diferença está no número de metacriptozoítos formados que é bem maior do que de criptozoítos. Os merozoítos liberados a partir daí já são capazes de infectar os eritrócitos circulantes (7) dando origem a gametócitos (8) e ocorre também a merogonia eritrocitária (III) onde merozoítos que invadiram eritrócitos (9) se desenvolvem em merontes (10) e formam novos merozoítos que são liberados quando os eritrócitos se rompem (11) os quais vão invadir células endoteliais e mononucleares fagocíticas (12) ou vão infectar novos eritrócitos (15) onde se desenvolvem em gametócitos (16).

Parte dos merozoítos liberados na circulação pela merogonia exoeritrocitária (6) pode também invadir células endoteliais e mononucleares fagocíticas em diversos tecidos (12) e se desenvolver por reprodução assexuada em fanerozoítos (ou merontes teciduais) (13), essa fase é chamada de merogonia exoeritrocitária secundária (IV). Os merontes permanecem por longos períodos nos tecidos e quando se rompem liberam grande quantidade de merozoítos (14), realizando a manutenção da infecção em fase crônica e a liberação de parasitos na circulação durante as recaídas. Em geral, a maturação desta fase coincide com o aumento significativo da parasitemia. É importante destacar que no momento que os merozoítos invadem os eritrócitos (7, 9, 15) eles passam a ser chamados de trofozoítos, os quais absorvem a hemoglobina e após algum tempo, estará visível o pigmento malárico ou hemozoína, produto da digestão dessa proteína (VALKIŪNAS, 2005).

Os gametócitos na circulação (8, 16) são ingeridos pelo vetor e rapidamente inicia o processo de gametogênese, onde os gametócitos assumem formato redondo e escapam dos eritrócitos no intestino médio do vetor (17 e 18). A mudança nos níveis de oxigênio e dióxido de carbono é um dos principais estímulos para que isso aconteça. O macrogametócito produz macrogametas arredondados (17), o microgametócito sofre um processo de exflagelação que dá origem a oito microgametas móveis (18) e então ocorre a fertilização do macrogameta (19) em ambiente extracelular e o zigoto se transforma em um oocineto de formato arredondado que penetra na membrana peritrófica (20) e atravessa a membrana epitelial do intestino. O oocineto se transforma em oocisto que é circundado por uma espécie de cápsula (21). Em seguida, ocorre a esporogonia enquanto no oocisto se desenvolvem em vários centros germinativos, e numerosos corpos unicelulares alongados são formados, denominados esporozoítos (22). Quando o oocisto amadurece (23) os esporozoítos são liberados e se movem pela hemocele até penetrarem nas glândulas salivares do vetor (24). Os esporozoítos são as formas infectantes para as aves e são injetados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. A taxa de esporogonia depende das peculiaridades das espécies de parasitos e vetores, assim como da temperatura e outros fatores. A temperatura ótima para o desenvolvimento do parasito no vetor é aproximadamente 25°C para *P. relictum*. A esporogonia dessa espécie no vetor *Culex pipiens* se completa sete dias após a ingestão de gametócitos maduros. Se os mosquitos forem mantidos a temperaturas próximas a 4°C ocorre a degeneração dos oocistos. No entanto, existem diversas temperaturas ideais e uma série de particularidades nos ciclos de vida das diferentes espécies de parasitos (VALKIŪNAS, 2005).

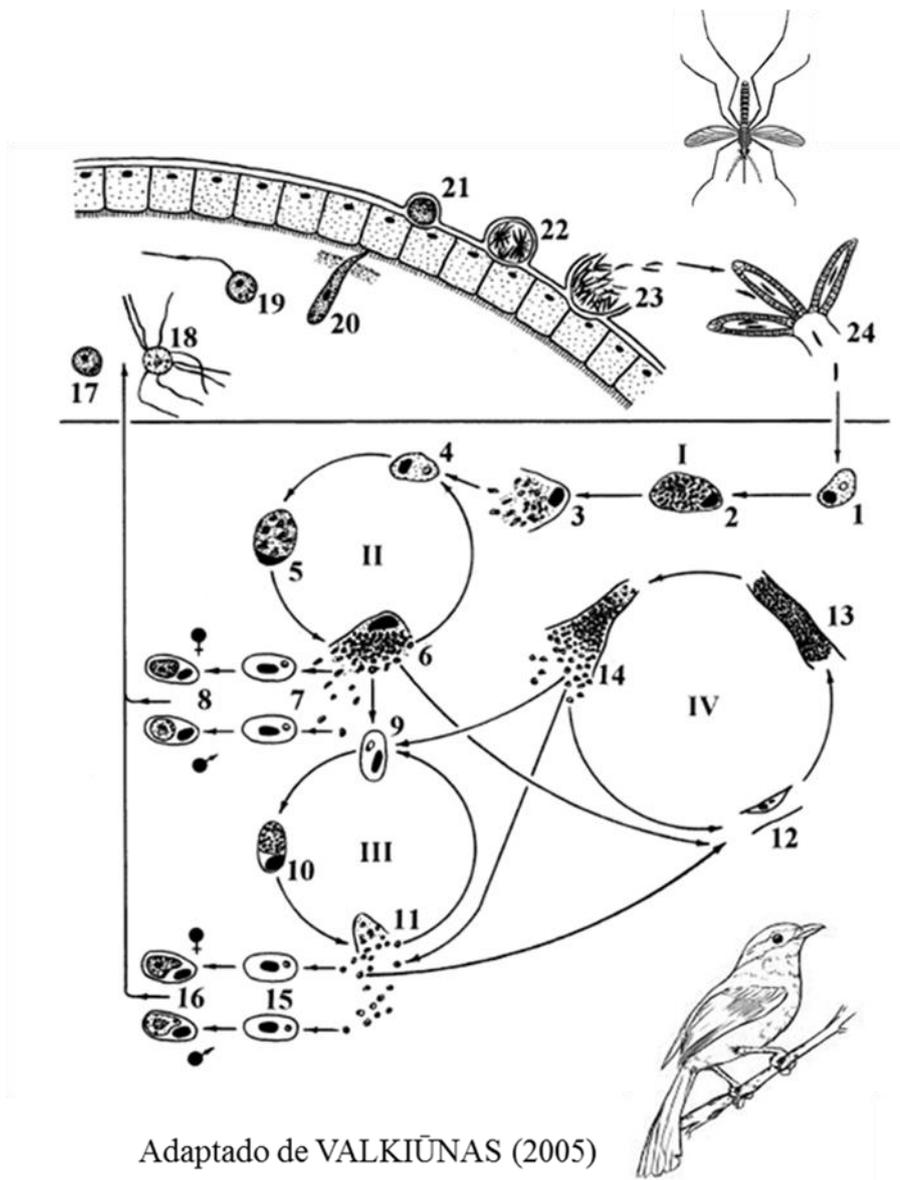


Figura 1. Representação do ciclo biológico de *Plasmodium relictum*, parte superior vetor (17– 24), parte inferior ave (1–16). I, II – merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária. 1 – esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 – criptozoítos; 4 – merozoítos em macrófago; 5, 6 – metacriptozoítos; 7 – merozoítos nos eritrócitos; 8 – gametócitos; 9 – merozoítos nos eritrócitos; 10, 11 – merontes eritrocitários; 12 – merozoítos em células endoteliais de capilares; 13, 14 – fanerozoítos; 15 – merozoítos em eritrócitos; 16 – gametócitos; 17 – macrogameta; 18 – exflagelação dos microgametas; 19 – fertilização do macrogameta; 20 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 – oocisto jovem; 22, 23 – esporogonia; 24 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (VALKIŪNAS, 2005).

2.3 Ciclo Biológico de *Haemoproteus*

O ciclo de vida de *Haemoproteus* em aves foi estudado em mais ou menos 7% das espécies do parasito conhecidas. Muito semelhante ao ciclo de vida de *Plasmodium*, as principais diferenças estão nas espécies de vetores e na merogonia eritrocítica que não ocorre no ciclo de *Haemoproteus*. Os vetores de *Haemoproteus* spp. são moscas da Família Hippoboscidae ou mosquitos da Família Ceratopogonidae, *Culicoides* spp., estes conhecidos como “mosquitos-pólvora”. Diferente dos mosquitos transmissores de *Plasmodium* e dos *Culicoides*, tanto o macho quanto a fêmea das moscas hipoboscídeas alimentam-se de sangue e são susceptíveis à infecção (VALKIŪNAS, 2005; SANTIAGO-ALARCON et al., 2012). O ciclo de vida de *Haemoproteus* é apresentado abaixo (Figura 2) e suas características foram baseadas no desenvolvimento da espécie *Haemoproteus mansonii* (VALKIŪNAS, 2005).

O ciclo pode começar quando os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do inseto são inoculados na ave e atingem as células endoteliais (1) desenvolvendo em merontes exoeritrocíticos de primeira geração (2,3). Isso ocorre em diferentes órgãos como, fígado, baço, rins, musculatura esquelética e mais frequentemente nos pulmões. Os merontes formam então merozoítos que possuem formas e tamanhos variáveis. Esses merozoítos podem infectar novas células (4); em algumas espécies eles crescem e desenvolvem-se em megalomerontes no tecido muscular ou cardíaco e nas células endoteliais dos capilares (5,6) podendo chegar a 400 µm, se estendendo ao longo das fibras musculares e cercados por uma fina parede hialina. Os merozoítos formados neste processo podem infectar as células sanguíneas (7) e se desenvolverem em gametócitos (8). Além disso, os merozoítos de primeira geração infectam as células reticuloendoteliais do baço (9), onde se desenvolverão em merontes maduros no baço (10,11) os quais irão liberar merozoítos capazes de infectar as células sanguíneas (12) e se desenvolverem em gametócitos (13). É importante ressaltar que pelo menos duas gerações teciduais acontecem antes do surgimento dos gametócitos na circulação. A fase pré-patente pode variar de 11 a 21 dias. Somente os gametócitos se desenvolvem em eritrócitos e uma célula pode ser parasitada por mais de um merozoíto, mas somente um ou dois conseguem atingir a maturidade. Os gametócitos que são capazes de fazer a gametogênese aparecem com 2 a 6 dias após os merozoítos infectarem os eritrócitos e a capacidade de produzir gametas diminui após esse período (VALKIŪNAS, 2005).

Da mesma forma como ocorre para *Plasmodium*, assim que o inseto ingere os gametócitos durante o repasto sanguíneo, a gametogênese inicia-se (14,15). Os gametócitos assumem formato redondo e saem dos eritrócitos no intestino do vetor. Macrogametas arredondados são produzidos pelo macrogametócito e oito microgametas móveis são originados pela exflagelação do microgametócito (15). Então, no ambiente extracelular ocorre a fertilização e formação do zigoto (16) o qual se transforma em oocineto móvel. O oocineto migra através da camada epitelial do intestino médio do vetor e arredondam-se debaixo da lâmina basal dando origem ao oocisto (18). O oocisto sofre esporogonia (19) e numerosos esporozoítos (20) são formados. Após a maturação do oocisto, os esporozoítos se movem pela hemocele e penetram nas glândulas salivares do vetor (21). As formas infectantes para as aves são esses esporozoítos que são injetados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, fechando seu ciclo biológico. Sabe-se que as espécies de *Haemoproteus* que se desenvolvem em *Culicoides* spp. levam entre sete e 10 dias para completar todo o ciclo no vetor, e em Hippoboscidae levam mais de 10 dias, baseado nas espécies já estudadas. Vale ressaltar que, assim como em *Plasmodium*, há formação de hemozoína nos gametócitos, além disso, há grânulos de valutin em algumas espécies. Esses grânulos podem ser de tons violeta ou azuis e sua natureza ainda não é compreendida.

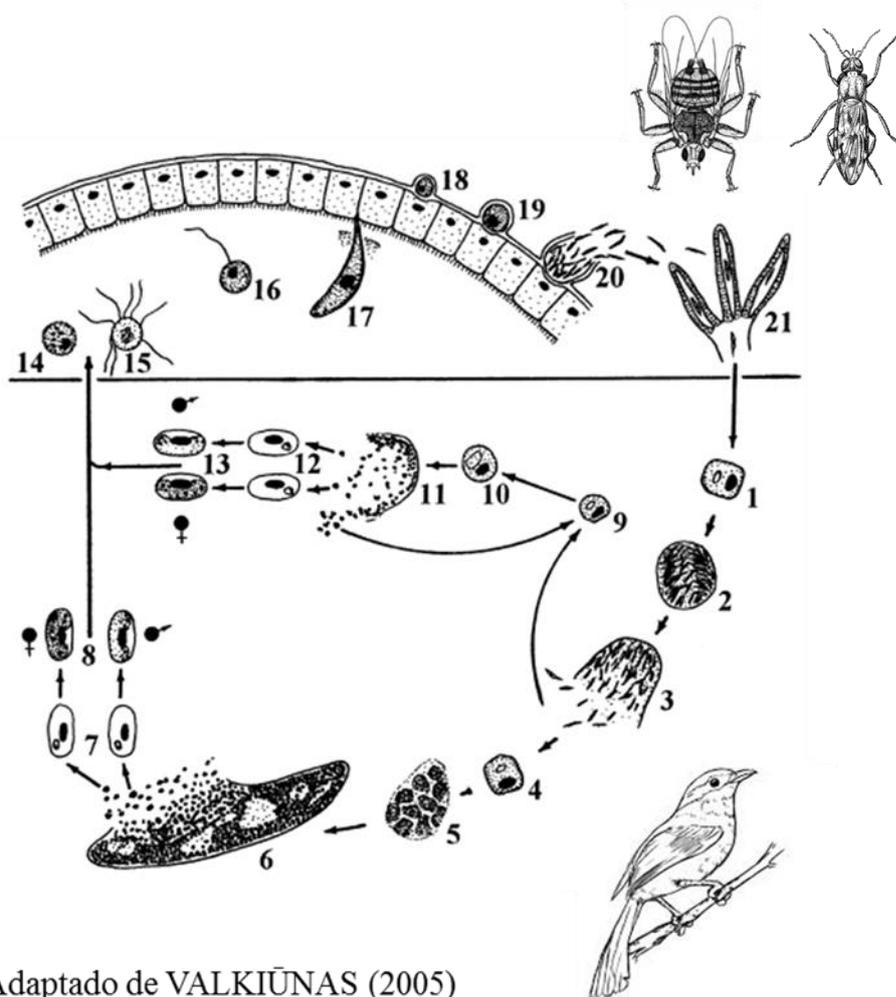


Figura 2. Representação do ciclo biológico de *Haemoproteus mansonii*, parte superior vetor (14–21), parte inferior ave (1–13). 1 – esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 – merontes exoeritrocíticos primários; 4 – merozoítos em células endoteliais; 5, 6 – crescimento e megalomeroentes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítos na célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 – crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 – merozoítos em eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogameta; 15 – exflagelação dos microgametas; 16 – fertilização do macrogameta; 17 – oocineto penetrando na membrana peritrofica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 – esporogonia; 21 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (VALKIŪNAS, 2005).

2.4 Haemosporida em Aves Silvestres do Brasil

O Brasil apresenta grande diversidade de ecossistemas que compõem a segunda avifauna mais rica do mundo, com aproximadamente 1919 espécies, ficando atrás somente da Colômbia (SAVE Brasil, 2018). As aves são conhecidas por abrigar grande quantidade de hemoparasitos, no entanto, informações sobre hemosporídeos em aves brasileiras são escassas e isso dificulta realizar estimativas da diversidade desses parasitos no país.

O estudo com hemosporídeos em aves no Brasil teve início, com um grande marco para a história do grupo, quando Aragão (1907,1908) estudou o ciclo biológico de *Haemoproteus columbae* e descobriu a fase exoeritrocítica no endotélio pulmonar de pombo. Desde então, muitos registros de hemosporídeos em aves brasileiras foram feitos e Lucena (1941) publicou uma revisão contendo aves infectadas por várias espécies de hemoparasitos na região Neotropical. As espécies registradas no Brasil foram *Plasmodium vaughani*, *Plasmodium cathemerium*, *Plasmodium elongatum*, *Plasmodium lutzi*, *Plasmodium nucleophilum*, *Plasmodium praecox*, *Haemoproteus columbae*, *Haemoproteus danilewskyi*, além de muitos registros nos quais os parasitos foram identificados apenas em nível de gênero. Esses parasitos foram identificados com base em caracteres morfológicos ou de acordo com a espécie do hospedeiro vertebrado e a maioria foi registrada no estado de São Paulo. Deste modo, estudos sobre a prevalência de parasitos em aves começaram a surgir e alguns anos depois da publicação de Lucena (1941), Lainson et al. (1970) diagnosticaram hemoparasitos em Passeriformes da região Amazônica brasileira encontrando prevalência de 10%. Dois grandes estudos sobre hemoparasitos em aves silvestres da região Sudeste do Brasil foram realizados na década de 80. Bennett e Lopes (1980) estudaram 3.449 aves de 195 espécies e encontraram prevalência de 1,8% para *Plasmodium* spp. e 3,6% para *Haemoproteus* spp., em seguida Woodworth-Lynas et al. (1989) juntaram os dados do trabalho de Bennett e Lopes (1980) a novos dados; estudando um total de 15.574 aves silvestres, nas quais encontraram prevalência de 7,5% para o gênero *Plasmodium* e 39,9% para o gênero *Haemoproteus*, esses resultados foram obtidos por meio da microscopia ótica e não houve identificação específica.

Após o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular na década de 90, estudos que utilizam a PCR como método de diagnóstico de parasitos tornaram-se essenciais na identificação de infecções causadas por hemosporídeos aviários. No Brasil, Ribeiro et al. (2005) utilizaram os métodos microscópico e molecular para comparar a prevalência de *Plasmodium* spp. em aves da Mata Atlântica de Minas Gerais e registraram 16,5% e 39,6% de prevalência para os métodos, respectivamente. Utilizando somente a microscopia como ferramenta de análise, Fecchio et al. (2007) registraram prevalência de 6,9% para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves do Cerrado brasileiro. Analisando esfregaços sanguíneos de aves da Mata Atlântica, Sebaio et al. (2010) detectaram prevalência de 9,2% para *Plasmodium* spp. e 3,2% para *Haemoproteus* spp. Belo et al. (2011) também analisando aves do Cerrado, encontraram 49% de prevalência para *Plasmodium* spp./ *Haemoproteus* spp., utilizando tanto a microscopia quanto a PCR para diagnóstico, além disso, identificaram 21 linhagens mitocondriais, incluindo 11 de *Plasmodium* e 10 de *Haemoproteus*. Dando continuidade aos estudos com aves do Cerrado, Fecchio et al. (2011) encontraram prevalência de 7,1% para *Haemoproteus* e 3,6% para *Plasmodium*, utilizando apenas microscopia como ferramenta de identificação. Leite et al. (2013) estudaram aves silvestres de uma área urbana de Palmas no estado de Tocantins e registraram prevalência de 23,15% para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. Em outro estudo realizado por Fecchio et al. (2013) com aves do Cerrado, dessa vez utilizando métodos moleculares, foi encontrada prevalência de 21% para *Haemoproteus* e *Plasmodium* e 18 linhagens distintas do gene mitocondrial citocromo b foram registradas. Em 2018, Tostes et al. (2018) encontraram prevalência de 64,44% de *Plasmodium unalis* ao estudarem uma população de *Turdus* na Mata Atlântica de Minas Gerais e detectaram sete novas linhagens deste parasito. Todos estes estudos tiveram como foco principal, diagnosticar e registrar o quanto os parasitos dos gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* são prevalentes nas aves silvestres pesquisadas.

No entanto, além de detectar a prevalência, há estudos com aves no Brasil que focam em verificar a diversidade genética de hemosporídeos, baseando principalmente no gene mitocondrial *cytb* dos parasitos. Villar et al. (2013) mostraram a diversidade genética de

hemosporídeos em diferentes regiões do continente americano e no Brasil encontraram 10 diferentes linhagens de *Plasmodium* em aves migratórias da espécie *Mycteria americana*. Laccorte et al. (2013) caracterizaram a diversidade genética de linhagens de hemosporídeos encontrados em comunidades de aves de três habitats diferentes no Sudeste do Brasil, identificando 89 linhagens de *Plasmodium* e 22 de *Haemoproteus*, com 86% delas identificadas pela primeira vez. Na Bacia amazônica, Roos et al. (2015) estudando a espécie migratória *Rynchops niger*, revelaram prevalência de 20% de hemosporídeos e identificaram por meio do sequenciamento genético do gene *cytb*, uma linhagem de *Haemoproteus* e duas linhagens de *Plasmodium*. Estas linhagens já tinham sido descritas em diferentes regiões do continente americano, incluindo uma região no sudeste do Brasil (LACCORTE et al., 2013). Outro estudo realizado por Bosholn et al. (2016) revelou quatro linhagens de *Plasmodium* em *Lepidothrix coronata* na Amazônia Central e nesse mesmo bioma, Fecchio et al. (2017a) identificaram 265 linhagens de hemosporídeos entre 2661 aves estudadas, revelando prevalência de 15,3% para o gênero *Plasmodium* e 2,4% para o gênero *Haemoproteus*. Estes estudos indicam que uma ampla gama de hemosporídeos ainda está por ser descoberta entre as aves dos diversos biomas brasileiros.

2.5 Identificação e Delimitação de Espécies em Haemosporida

Definir o que é espécie é indispensável para estudar a biodiversidade do planeta. No entanto, desde o surgimento da Teoria Sintética da Evolução na década de 1930 e o estabelecimento da sistemática filogenética como método de classificação, os conceitos de espécies são intensamente discutidos (CRACRAFT, 2000). Atualmente, existem mais de 24 conceitos distintos de espécies (MAYDEN, 1997), os quais são adotados de acordo com a área de estudo ou com o objetivo do pesquisador.

De acordo com Perkins (2000) as definições de espécies podem ser agrupadas em três classes amplas: conceitos de similaridade de espécies que se baseiam em características fenotípicas únicas dos organismos; conceitos de espécies biológicas ou reprodutivas que avalia a capacidade da reprodução sexual dos organismos para cruzar e produzir descendentes férteis; e conceitos filogenéticos ou baseados em linhagens que enfatizam a história evolutiva compartilhada das populações (monofilia). Esse autor sugeriu ainda que o ideal seria abordar cada um desses três principais tipos de conceitos para as descrições de espécies.

Avaliar o conceito biológico em Haemosporida é difícil, pois devido ao fato dos organismos deste grupo apresentarem um ciclo de vida complexo, faltam informações sobre o isolamento reprodutivo entre as espécies definidas. Isso fez com que a maioria dos pesquisadores utilizasse as variações nos conceitos de espécies morfológicas e filogenéticas (OUTLAW; RICKLEFS, 2014).

Desde a descoberta dos hemosporídeos, há mais de 130 anos, até o início do século XXI, a classificação dos parasitos deste grupo foi realizada de acordo com os métodos tradicionais que são baseados no conceito da similaridade morfológica. Assim, os caracteres observados por microscopia como o número de merozoítos por merontes, a forma dos gametócitos, a presença ou ausência de pigmento de hemozoína, o tipo de célula hospedeira infectada, os danos causados nas células infectadas e a espécie de hospedeiro infectado foram os principais parâmetros utilizados para descrever as espécies e classificar os parasitos da ordem Haemosporida (GARNHAM, 1966; PERKINS, 2000; VALKIŪNAS, 2005). No entanto, os parasitologistas começaram a observar que esses traços poderiam não ser confiáveis, pois a morfologia e a história de vida dos parasitos podem variar de acordo com as espécies hospedeiras e as características morfológicas determinadas a partir de esfregaços sanguíneos, dependendo das técnicas utilizadas, podem ser alteradas e resultar em diferenças significativas na aparência dos parasitos sob a microscopia de luz (PERKINS, 2000).

Com o advento da biologia molecular, no início do século XXI, as informações obtidas a partir do sequenciamento genético passaram a revelar diferenças entre parasitos, que antes eram classificados como uma mesma espécie com base na morfologia. As espécies que eram indistinguíveis morfologicamente, mas que apresentavam diferenças no DNA, ficaram conhecidas como espécies crípticas (BENSCH et al., 2004). Um exemplo importante foi demonstrado por Perkins (2000), que ao trabalhar com o sequenciamento de linhagens de hemosporídeos de lagartos, descobriu que a espécie *Plasmodium azurophilum*, descrita morfologicamente infectando glóbulos vermelhos e glóbulos brancos, era na verdade composta por duas linhagens distintas, porém iguais vistas sob microscopia óptica. Desde então, muitos casos de complexos de espécies crípticas em hemosporídeos aviários foram descritos e um deles foi registrado em aves de rapina, em que a espécie *Leucocytozoon toddi* apresentou 10,9% de divergência genética entre suas linhagens e os pesquisadores sugeriram que *L. toddi* representava um conjunto de espécies crípticas (SEHGAL et al., 2006). Poucos anos após essa sugestão, Valkiūnas et al. (2010) fizeram uma análise minuciosa das formas citoplasmáticas desse mesmo organismo e observaram que na verdade havia duas espécies que se distinguiam morfologicamente. Outro exemplo de espécie críptica foi registrado por Palinauskas et al. (2015), que identificaram uma nova espécie, *Plasmodium homocircumflexum*, a partir de *Plasmodium circumflexo*, descrita anteriormente com base na morfologia. Os autores chegaram a esse resultado por meio da análise morfológica dos estágios sanguíneos e teciduais em combinação com a análise molecular de um fragmento do gene mitocondrial citocromo (*cytb*).

Embora o desenvolvimento das técnicas moleculares tenha sido um grande avanço para a taxonomia de Haemosporida, atualmente há um acúmulo de linhagens de parasitos do grupo sem identificação específica (BENSCH et al., 2009). Somente no MalAvi, banco de dados criado para depositar linhagens do gene *cytb* de hemosporídeos aviários, há mais de 3000 linhagens (MalAvi *database*, BENSCH et al., 2009).

Com o objetivo de descrever novas espécies a partir das linhagens do *cytb*, Hellgren et al. (2007) sugeriram o uso da porcentagem genética, em que 5% de divergência seria a taxa limite para a diferenciação. Segundo os autores, uma vez que as linhagens apresentem valores de divergência acima desse limite elas são distintas morfologicamente. No entanto, existem numerosos exemplos de espécies bem estabelecidas que diferem em menos do que 1% no gene *cytb* e que são facilmente distinguíveis morfologicamente, como por exemplo, *Haemoproteus jenniae* e *Haemoproteus iwa*, *Haemoproteus pallidus* e *Haemoproteus minutus*. Estas espécies apresentaram divergência de 0,6% entre as linhagens do gene citocromo b (LEVIN et al., 2012; HELLGREN et al., 2007).

No cenário atual, não existem critérios e nem consenso sobre qual conceito se basear para a descrição de espécies em Haemosporida. Embora seja comum encontrar trabalhos que descrevam espécies baseando-se somente na similaridade morfológica (VALKIŪNAS, 2005; ZEHTINDJIEV et al., 2012) ou trabalhos que utilizam apenas a caracterização molecular (MERINO et al., 2012; VALKIŪNAS et al., 2011); o uso de ambas as metodologias concomitantemente tem sido a abordagem mais aceita (PALINAUSKAS et al., 2007; MANTILLA et al., 2016; TOSTES et al., 2018; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018). Entretanto, combinar caracterização morfológica e molecular em estudos com aves silvestres, não tem sido uma tarefa fácil. Primeiro porque a grande maioria das aves capturadas apresenta baixa parasitemia muitas vezes impossibilitando o detalhamento morfológico (VALKIŪNAS, 2005). E segundo, devido à alta taxa de coinfeção, em que as aves são infectadas por mais de uma espécie de hemosporídeos. Esse é um grande problema para a caracterização molecular, uma vez que os protocolos de PCR tendem a favorecer a amplificação de sequências de DNA dos parasitos com a maior parasitemia (CHAGAS et al., 2013) ou os “primers” podem melhor corresponder a uma espécie, do que outras (ZEHTINDJIEV et al., 2012).

Desse modo, métodos adicionais são necessários para descrever novas espécies e conhecer a biodiversidade dos hemossporídeos aviários, o que poderá futuramente auxiliar os estudos de conservação. Segundo Frankham et al. (2004) o estabelecimento do *status* taxonômico dos organismos de acordo com a maior diversidade de caracteres possível é uma das premissas da genética da conservação, pois não se pode proteger o que não se conhece.

2.6 Delimitação Computacional de Espécies

Com a dificuldade encontrada em estabelecer espécies morfológicas, principalmente devido à diversidade críptica, e com a grande quantidade de dados moleculares acumulados nos últimos anos, o conceito filogenético pode conduzir alternativas objetivas e rápidas para descrever as espécies de hemossporídeos (OUTLAW; RICKLEFS, 2014). O conceito filogenético de espécies define as espécies como um agrupamento de organismos com padrões de ancestralidade e descendência, os quais o diferem de outros agrupamentos (ELDREDGE; CRACRAFT, 1980).

Na última década, com base no conceito filogenético de espécie, foram desenvolvidos algoritmos computacionais para a delimitação de espécies. A delimitação computacional utiliza sequências moleculares para delimitar ou validar unidades evolutivas significativas (ESUs) (RYDER, 1986). E muitas abordagens computacionais utilizam a Teoria da Coalescência com o objetivo de identificar a transição de um processo coalescente em nível de população para um processo de especiação macroevolutivo na árvore filogenética (MELLO et al., 2018).

Métodos de delimitação de espécies coalescentes têm sido amplamente utilizados (ENCE; CARSTENS, 2011; YANG; RANNALA, 2010) e aplicados com sucesso pra muitos táxons, particularmente vertebrados (CARSTENS; DEWEY, 2010; SMITH et al., 2013; MUSHER; CRACRAFT, 2018; MELLO et al., 2018) e insetos (PONS et al., 2006; HUANG; KNOWLES, 2016). Embora essa abordagem seja menos frequente em protozoários, esse grupo pode ser altamente diversificado (BOENIGK et al., 2012; ZHAO et al., 2016). Em Haemosporida essa metodologia é incipiente e apenas um estudo foi realizado com o objetivo de delimitar espécies no gênero *Leucocytozoon* em aves do Alasca (GALEN et al., 2018). Os pesquisadores utilizaram algoritmos computacionais de delimitação multi-locus (GMYC e BPP), e estes mostraram que o gênero *Leucocytozoon* é altamente rico de espécies no local estudado, sugerindo a existência de uma diversidade extraordinária em nível específico em todo o mundo.

Além das metodologias multi-locus, abordagens computacionais de lócus único também são úteis para estabelecer ESUs. Um dos principais é o algoritmo PTP (*Poisson tree process*) que se baseia no critério da máxima verossimilhança sendo fundamentado na teoria da coalescência visando encontrar diferenças significativas entre as relações reconstruídas entre e dentro das espécies, as quais são refletidas pelo comprimento de ramos na topologia da árvore (ZHANG et al., 2013). Como o comprimento de ramo representa o número médio esperado de substituições por sítio, o PTP assume que o número de substituições entre as espécies é maior que o número de substituições dentro das espécies (ZHANG et al., 2013). Na mesma linha segue o algoritmo MPTP (*Multi-rate Poisson Tree Process*), versão do PTP que melhora a estimativa em filogenias que possuem diferentes taxas inter e intraespecíficas. A taxa de especiação pode ser constante entre espécies irmãs, porém a taxa de coalescência intraespecífica e a diversidade genética podem variar significativamente mesmo entre espécies irmãs, de modo que o MPTP permite explicar as diferentes taxas de eventos de ramificação dentro de cada espécie delimitada (KAPLI et al., 2017).

Desse modo, os diversos métodos de delimitação computacional podem auxiliar na descrição de espécies e ser relevante principalmente na área da parasitologia, uma vez que

doenças infecciosas frequentemente emergem de grupos patogênicos (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991), para os quais é fundamental a delimitação de uma linhagem evolutiva independente para o manejo de conservação.

2.7 Parasitismo, Ecologia e Conservação da Avifauna

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro altamente degradado pela ação antrópica e atualmente apresenta apenas 7% da cobertura vegetal original (SOSMA; INPE, 2015). Apesar disso, a fauna e a flora da mata é uma das maiores e mais diversas do mundo (LIMA, 2014) o que chama atenção para estudos de conservação biológica.

A introdução de agentes patogênicos e a proliferação de doenças infecciosas têm sido ligadas a ações antrópicas, composição ambiental e mudanças climáticas (LOGIUDICE et al., 2003), e à medida que o contato entre espécies silvestres aumenta, eleva-se o risco de infecções (WEISS; MICHAEL, 2004). Em ambientes que possuem grande diversidade de hospedeiros e vetores, os parasitos são capazes de infectar espécies residentes e migratórias, o que lhes permite colonizar novas áreas, as quais podem abrigar hospedeiros suscetíveis suficientes e vetores circulantes adequados, ampliando o alcance geográfico dos parasitos (HELLGREN et al., 2009).

A virulência de hemosporídeos aviários irá depender da sensibilidade dos hospedeiros e da linhagem dos parasitos, podendo desempenhar importante papel como fator limitante na distribuição, abundância e sobrevivência de aves nativas em determinados ambientes (BENSCH et al., 2000). A introdução de uma infecção ou doença de uma população resistente em uma população susceptível pode causar declínio rápido de populações e diminuir a biodiversidade, uma vez que doenças e parasitos tem sido provavelmente responsáveis por um número considerável de extinções de espécies silvestres (DOBSON; MAY, 1986; MCCALLUM; DOBSON, 1995). Um exemplo disso aconteceu no Havaí, onde a introdução de uma linhagem de *Plasmodium relictum* e seu vetor, em algumas florestas da ilha, resultou no declínio de populações e até mesmo a extinção de espécies nativas (VAN RIPER III et al., 1986, ATKINSON et al., 2000).

Estudos abrangentes sobre a dinâmica parasito-hospedeiro e fatores ambientais podem ser altamente relevantes para a conservação e para a compreensão da complexidade dos sistemas ambientais, onde a variedade de vetores e parasitos, bem como, as ações antrópicas dificultam a avaliação dos efeitos ecológicos sobre a aptidão dos hospedeiros (KNOWLES et al., 2011, SEHGAL et al. 2012, LAPOINTE et al. 2012). Na Mata Atlântica brasileira pouco se conhece sobre o papel que os hemosporídeos exercem nas populações aviárias. Estudos que abordam esse tema são importantes para investimentos em conservação, principalmente, neste bioma que sofre com o desmatamento constante e muitas espécies são alvo do tráfico de animais silvestres.

CAPÍTULO I

3 HEMOSPORÍDEOS (*Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.) EM AVES DA FAMÍLIA THRAUPIDAE (PASSERIFORMES) DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS, BRASIL: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS HOSPEDEIROS E AMBIENTAIS NA TAXA DE INFECÇÃO

RESUMO

A Mata Atlântica é considerada um dos maiores *hotspot* do mundo. No entanto, é um bioma que vem sofrendo constante degradação desde a colonização, o que resultou na perda de mais de 90% da sua cobertura vegetal. Ainda assim, aves e dípteros hematófagos são encontrados em abundância no bioma, podendo abrigar alta variedade de parasitos. Os hemosporídeos são parasitos encontrados em várias espécies de aves no mundo e são conhecidos por causarem prejuízos aos seus hospedeiros. A infecção pode variar de acordo com a composição ambiental, mudanças climáticas e com as características dos hospedeiros. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência e a parasitemia de hemosporídeos (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) em aves da família Thraupidae de fragmentos de Mata Atlântica da Zona da Mata mineira, bem como relacionar a variação da prevalência com os locais e época de coleta, sexo e idade dos hospedeiros. Redes de neblina foram utilizadas para capturar as aves, a partir das quais foram obtidas amostras de sangue para produção de esfregaços sanguíneos. Estes foram examinados sob microscopia óptica para cálculo de prevalência e parasitemia e análises estatísticas foram realizadas para estimar a variação da prevalência. Foram examinadas 442 aves representantes de 21 espécies. Destas, 267 (60,4%) estavam infectadas por hemosporídeos, sendo o gênero *Plasmodium* o mais prevalente (99,25%) seguido por *Haemoproteus* (1,12%). Foi registrada coinfeção (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) em apenas uma ave (0,37%). A prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. apresentou variação significativa somente em relação ao local de captura das aves, em que aves capturadas em áreas abertas estavam mais infectadas do que as aves capturadas em áreas florestais. Quanto aos grupos etários e ao sexo dos hospedeiros não houve diferença significativa para a prevalência de *Plasmodium* spp. A parasitemia foi muito baixa para a maioria das aves examinadas (0,01% a 0,09%). A prevalência total encontrada no presente estudo é alta quando comparado com outros trabalhos realizados no Brasil e na região neotropical. A variação da prevalência na comunidade de aves estudadas pode ser explicada pelas diferenças do habitat. Embora a relação da prevalência com a estação de captura das aves, a idade e o sexo não tenha sido significativa, vários estudos demonstraram que existe influência desses fatores sobre as infecções de hemosporídeos aviários. Estes resultados são importantes para compreender a distribuição e quais fatores estão ligados à proliferação de doenças parasitárias na vida selvagem. Ainda mais em ambientes com alta diversidade de hospedeiros e vetores e com mudanças ambientais constantes, como é o caso da Mata Atlântica.

Palavras-chave: Hemosporídeos, prevalência, parasitemia, aves, Thraupidae, Mata Atlântica.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is considered one of the largest hotspots in the world. However, it is a biome that has undergone constant degradation since colonization, which has resulted in the loss of more than 90% of its vegetation cover. Nevertheless, birds and hematophagous diptera are found in abundance in the biome, being able to harbor a high variety of parasites. Haemosporidian are parasites found in several bird species in the world and are known to cause damage to their hosts. The infection can vary according to the environmental composition, climatic changes and the characteristics of the hosts. The aim of this study was to evaluate the prevalence and parasitemia of haemosporidian (*Plasmodium* and *Haemoproteus*) in birds of the family Thraupidae of Atlantic Forest fragments of the Zona da Mata mineira, as well as to relate the prevalence variation with the sites and time of collection, sex and age of hosts. Mist nets were used to capture the birds, from which blood samples were obtained for the production of blood smears. These were examined under optical microscopy to calculate prevalence and parasitaemia and statistical analyzes were performed to estimate prevalence variation. A total of 442 birds representing 21 species were examined. Of these, 267 (60.4%) were infected with hemsporidian, the genus *Plasmodium* being the most prevalent (99.25%) followed by *Haemoproteus* (1.12%). Coinfection (*Plasmodium* and *Haemoproteus*) was recorded in only one bird (0.37%). The prevalence of *Plasmodium* spp. presented significant variation only in relation to the capture site of birds, in which birds captured in open areas were more infected than the birds captured in forest areas. Regarding the age groups and hosts sex, there was no significant difference in the prevalence of *Plasmodium* spp. The parasitaemia was very low for most birds examined (0.01% to 0.09%). The total prevalence found in the present study is high when compared to other studies performed in Brazil and in the Neotropical region. The prevalence variation in the studied avian community can be explained by habitat differences. Although the prevalence relationship with the catchment season, age and host sex were not significant, several studies have demonstrated that these factors influence avian hemsporidian infections. These results are important in understanding the distribution and what factors are linked to the proliferation of parasitic diseases in wildlife. Still more in environments with high diversity of hosts and vectors and with constant environmental changes, as is the case of the Atlantic Forest.

Keywords: Haemosporidian, prevalence, parasitaemia, avian, Thraupidae, Atlantic Forest.

3.1 INTRODUÇÃO

Hemosporídeos são protozoários pertencentes à ordem Haemosporida, filo Apicomplexa, que parasitam diversas espécies de vertebrados. As aves são os hospedeiros mais bem estudados e apresentam distribuição global destes parasitos (GARNHAM, 1966). Os parasitos do gênero *Plasmodium*, conhecidos como os agentes causadores da malária, e os parasitos do gênero *Haemoproteus* tem o maior número de espécies registradas em aves. De acordo com Valkiūnas (2005) a maior ocorrência de parasitos do gênero *Haemoproteus* pode estar relacionado com a abundância dos vetores. Dípteros hematófagos da família Culicidae são conhecidos como vetores das espécies de *Plasmodium* e dípteros das famílias Hippoboscidae e Ceratopogonidae como os vetores das espécies de *Haemoproteus*. Entretanto, o papel potencial desses organismos como agentes de doenças e sua influência sobre a ecologia dos hospedeiros não são completamente compreendidos (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991).

A prevalência de hemosporídeos é um dos fatores mais estudados para aves das diversas regiões do mundo. Os estudos mostram uma alta variação nas taxas de prevalência entre as espécies de aves de uma comunidade (zero a 100%) (GREINER et al., 1975; WHITE et al., 1978; LATTA; RICKLEFS, 2010; HAM-DUEÑAS et al., 2017). As causas dessa variação podem estar relacionadas tanto aos traços da história de vida e aos fatores evolutivos dos hospedeiros (HAMILTON; ZUK, 1982; FECCHIO et al., 2011, DIMITROV et al., 2018), quanto às condições climáticas, estrutura do hábitat e exposição aos vetores (HESS et al., 2001; FECCHIO et al., 2013; FERREIRA-JUNIOR et al., 2016). Além disso, as mudanças ambientais induzidas pelo homem, como desmatamento e fragmentação de habitats podem influenciar nas interações parasito-hospedeiro e causar variações na prevalência (BENNETT et al., 1992; CHASAR et al., 2009; REINOSO-PÉREZ et al. 2016; FERREIRA-JUNIOR et al., 2017). Dessa forma, estudos sobre a prevalência de hemosporídeos são importantes para compreender as causas ecológicas e evolutivas das variações dessas infecções nas diversas populações e comunidades de aves silvestres.

No Brasil, estudos com a prevalência de hemoparasitos já foram realizados para aves silvestres do Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica (BENNETT; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005, FECCHIO et al., 2007, 2011, 2017; LEITE et al., 2013; SEBAIO et al., 2012; TOSTES et al., 2017; FERREIRA-JUNIOR et al., 2017). Os métodos de identificação de hemosporídeos utilizados nestes estudos foram microscopia óptica e/ou análise molecular, os quais revelaram valores de prevalência entre 4,58% e 64,4% (BENNETT; LOPES, 1980; TOSTES et al., 2017).

As infecções de parasitos são consideradas como umas das mais importantes pressões seletivas sobre aves (SEEGAR et al., 1976; ARRIERO et al., 2008). Para explicar a variação da prevalência de hemoparasitos entre as espécies aviárias, algumas hipóteses que associam fatores ecológicos, evolutivos e a história de vida dos hospedeiros foram formuladas e testadas. A hipótese de Hamilton e Zuk (1982) é uma das mais famosas, esta postula que parasitos e patógenos são um dos fatores responsáveis pela evolução e manutenção das características sexuais secundárias em aves, como por exemplo, a coloração da plumagem. Além disso, o sistema de acasalamento, assim como o desenvolvimento embrionário também já foram utilizados para explicar a variação da prevalência entre as espécies de aves em determinadas localidades (READ, 1991; RICKLEFS, 1992). Outras hipóteses como a sazonalidade, abundância dos vetores, modificação do hábitat, altura dos ninhos, sexo, idade e massa corporal dos hospedeiros, já foram testadas para explicar a variação da prevalência de hemoparasitos em aves de diversas regiões do mundo (HAM-DUEÑAS et al., 2017). Entretanto, na Mata Atlântica brasileira pouco se conhece sobre quais fatores estão influenciando nas taxas de prevalência e parasitemia nas populações de aves.

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência e a parasitemia de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em diversas espécies de aves da família Thraupidae, que foram capturadas em fragmentos de Mata Atlântica na Zona da Mata de Minas Gerais. Além disso, as características dos hospedeiros como a idade e o sexo, e as características do hábitat como local de captura e época de coleta foram analisadas para testar suas influências sobre as taxas de prevalência de *Plasmodium* spp. Os valores de parasitemia média de *Plasmodium* spp. foram analisados de acordo com o sexo dos hospedeiros e com as estações seca e chuvosa.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Locais de coleta

As coletas foram realizadas em fragmentos de Mata Atlântica e em locais próximos a esses fragmentos que estão localizados no município de Juiz de Fora na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. Os locais são: Sítio Paraíso da Barra, Chácara, 21° 68' S, 43°22' W, elevação de 796 m; Sítio Vista Alegre, Caeté/ Juiz de Fora, 21° 48' S, 43° 15' W, elevação de 494m; Granja Passarada, Juiz de Fora, 21° 48' S, 43° 19' W, elevação de 615m; Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, 21 ° 44' S, 43° 32' W, elevação de 715m e Fazenda Volta Grande, Santa Bárbara do Monte Verde, 21° 58' S, 43° 41' W, elevação de 798m. Os pontos de coleta do Jardim Botânico/UFJF e da Fazenda Volta Grande situavam-se dentro dos fragmentos da Mata Atlântica, os quais apresentam árvores de médio e grande porte, formando uma floresta fechada e densa. Em meio a esses fragmentos encontram-se corpos de água como córregos e lagos. Os pontos de coleta das demais localidades foram fixados em ambientes abertos como bordas de fragmentos de floresta. O clima da região é do tipo Cwa (subtropical de altitude) segundo a classificação de Köppen (1970), com estação fria e seca entre os meses de maio a setembro (estação seca) e estação quente e úmida entre os meses de outubro a abril (estação chuvosa).

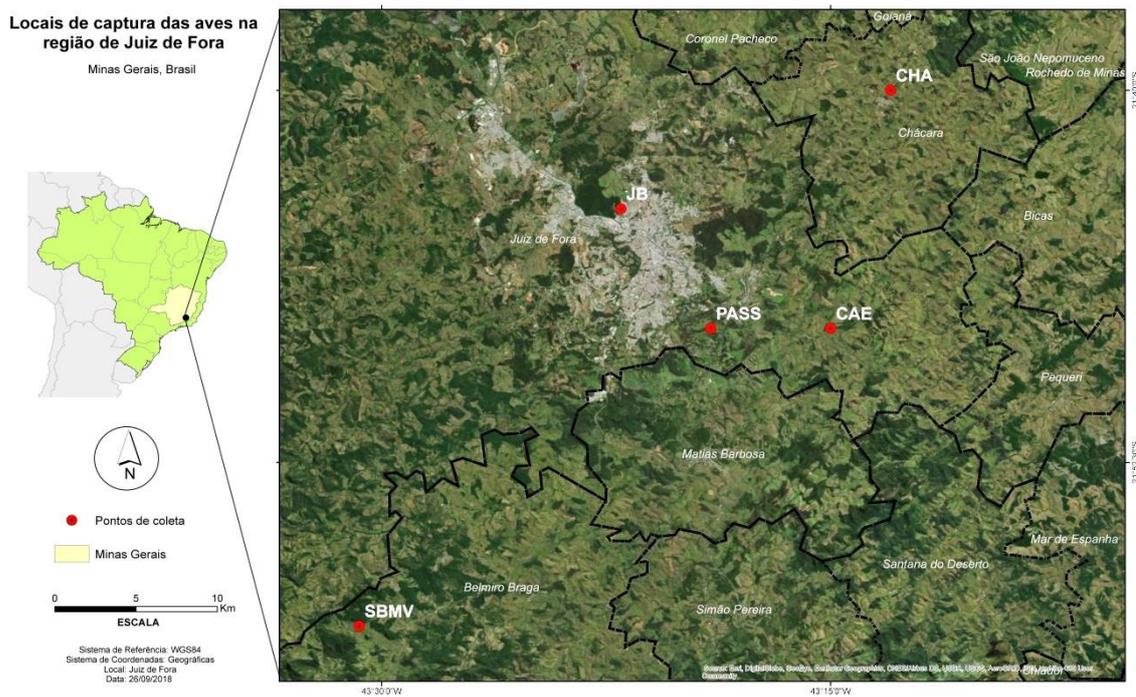


Figura 1. Pontos de captura das aves e coleta de sangue em cinco locais da região de Juiz de Fora, Zona da Mata, Minas Gerais. CAE (Sítio Vista Alegre), CHA (Sítio Paraíso da Barra), JB (Jardim Botânico-UFJF), PASS (Granja Passarada) e SBMV (Fazenda Volta Grande).

3.2.2 Captura das aves e coleta de sangue

As coletas foram realizadas mensalmente com duração de três a cinco dias consecutivos, entre abril de 2013 e dezembro de 2015. Para a captura das aves, foram utilizadas 10 redes de neblina, de 12 m de comprimento por 3m de altura e malha de 36 mm.

As redes permaneciam abertas por 8h aproximadamente, desde o nascer do sol até o final da tarde, totalizando 12.672 hm² de esforço amostral. As redes foram vistoriadas em intervalos de 20-30 minutos para a retirada das aves, as quais foram marcadas com anilhas para que não houvesse reamostragem. As aves capturadas foram examinadas fisicamente e as seguintes informações foram registradas: data de captura, idade, sexo, massa corporal, medidas morfométricas e características fenotípicas, como cor da plumagem, morfologia do bico e pernas, sendo realizada a identificação das espécies de acordo com Ridgely et al. (2009) e Sigrist (2014).

Amostras de sangue foram obtidas com seringas e agulhas a partir da punção da veia braquial em uma das asas e mantidas em caixas térmicas com gelo até o final da tarde, quando foram levadas para o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz Fora. Estas amostras foram armazenadas em *freezer* (-20° C) para estudos futuros. Em média, três esfregaços sanguíneos por indivíduo foram preparados em campo diretamente do sangue extravasado após a punção da veia braquial. O volume de sangue coletado não excedeu 1% do peso total do animal. Após os procedimentos de amostragem, as aves foram liberadas imediatamente. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Juiz de Fora (protocolo nº 042/2012) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 29268-3 e 29268-4).

3.2.3 Análises microscópicas

Os esfregaços de sangue foram secados ao ar logo após sua preparação e em seguida foram fixados em metanol absoluto por 3 min, no mesmo local de coleta. No Laboratório de Protozoologia da UFJF, os esfregaços foram corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em água destilada na proporção de 1:9. Para o exame microscópico foi utilizado um microscópio de luz Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan), equipado com uma câmera digital Olympus Evolt E-330, para registrar as formas evolutivas dos parasitos. As lâminas foram examinadas sob o aumento de 600X por 20 min para detecção de parasitos. Em seguida 100 campos microscópicos foram observados em ampliação de 1000X para cálculo da parasitemia.

3.2.4 Análises dos dados

Os valores de prevalência foram calculados segundo Bush et al. (1997), que define prevalência como o número de hospedeiros infectados com determinado parasito dividido pelo número total de hospedeiros examinados, com o valor dado em porcentagem. E o cálculo da parasitemia (intensidade da infecção) foi feito seguindo o método de Godfrey et al. (1987), no qual é quantificado o número de formas de parasitos encontrado em 100 campos microscópicos do esfregaço sanguíneo de cada ave.

A normalidade dos dados da parasitemia foi avaliada por meio do teste “Lilliefors”, a 5% de significância. A análise de “Kruscall-Wallis”, a 5% de significância, foi utilizada para os dados que não apresentaram normalidade (não paramétrico) confrontando os dados de parasitemia da seguinte forma: fêmea estação seca x fêmea estação chuvosa; macho estação seca x macho estação chuvosa; fêmea estação chuvosa x macho estação chuvosa; fêmea estação seca x macho estação seca. As análises foram realizadas por meio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Uma análise descritiva dos valores de prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. foi realizada considerando um intervalo de confiança de 95% de significância. As características das aves (sexo e idade) e ambientais (localidade e estação do ano) foram

comparadas em função da prevalência, por meio do teste Qui-quadrado com correção de Yates em nível de 5% de significância. Para estas análises utilizou-se o programa R v.3.5.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018). As aves que não tiveram o sexo e a idade determinada e/ou não registrada foram excluídas das análises estatísticas, bem como as aves com infecção exclusiva por *Haemoproteus* spp.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Espécies de aves examinadas

Foram analisadas 442 aves pertencentes a 21 espécies da família Thraupidae da ordem Passeriformes (Figura 2).

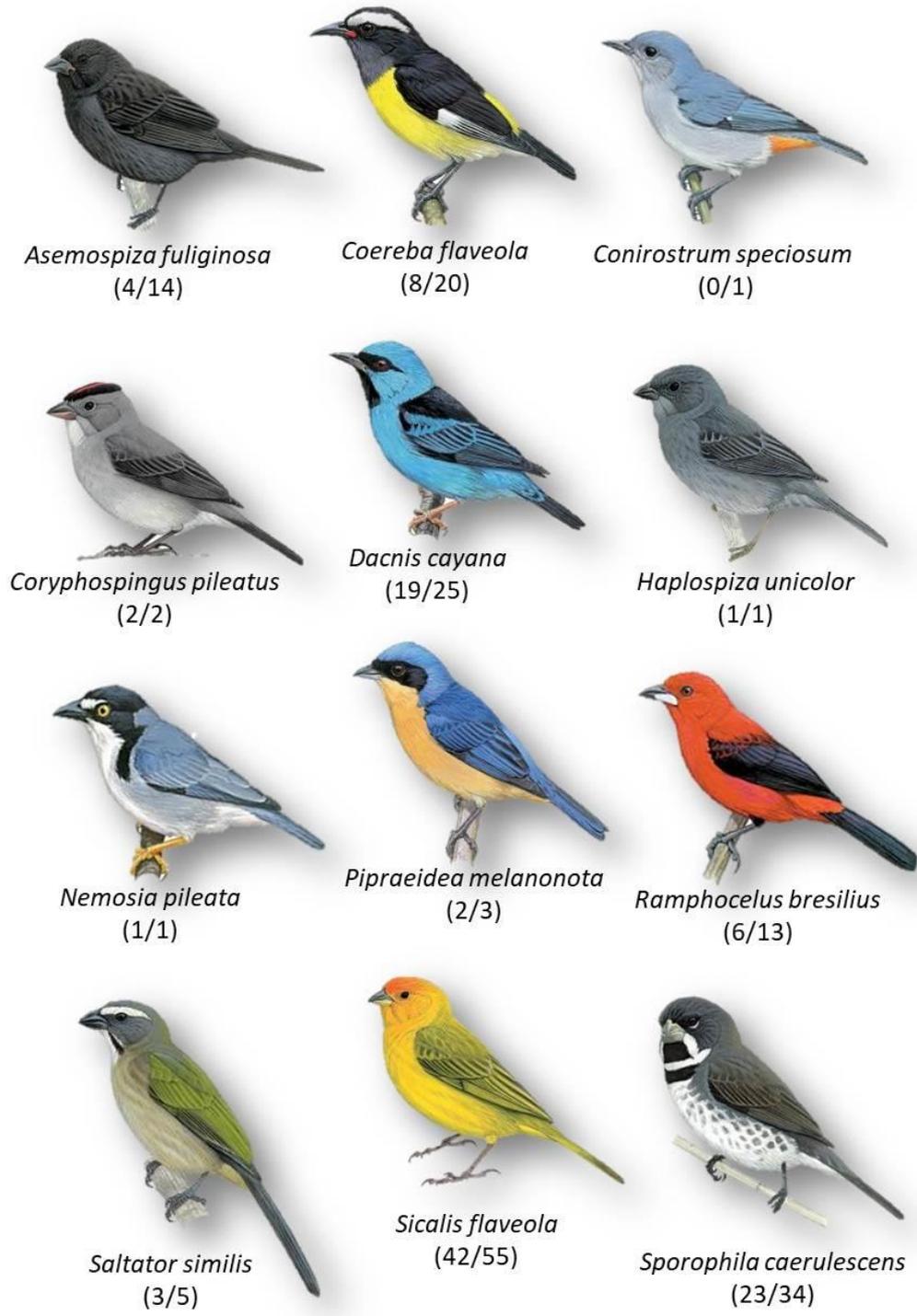


Figura 2. Espécies de aves da família Thraupidae. Os números entre parênteses representam (número de indivíduos infectados/número de indivíduos examinados). Indivíduos do sexo masculino são apresentados (imagens adaptadas de DEL HOYO et al., 2018).

Continuação

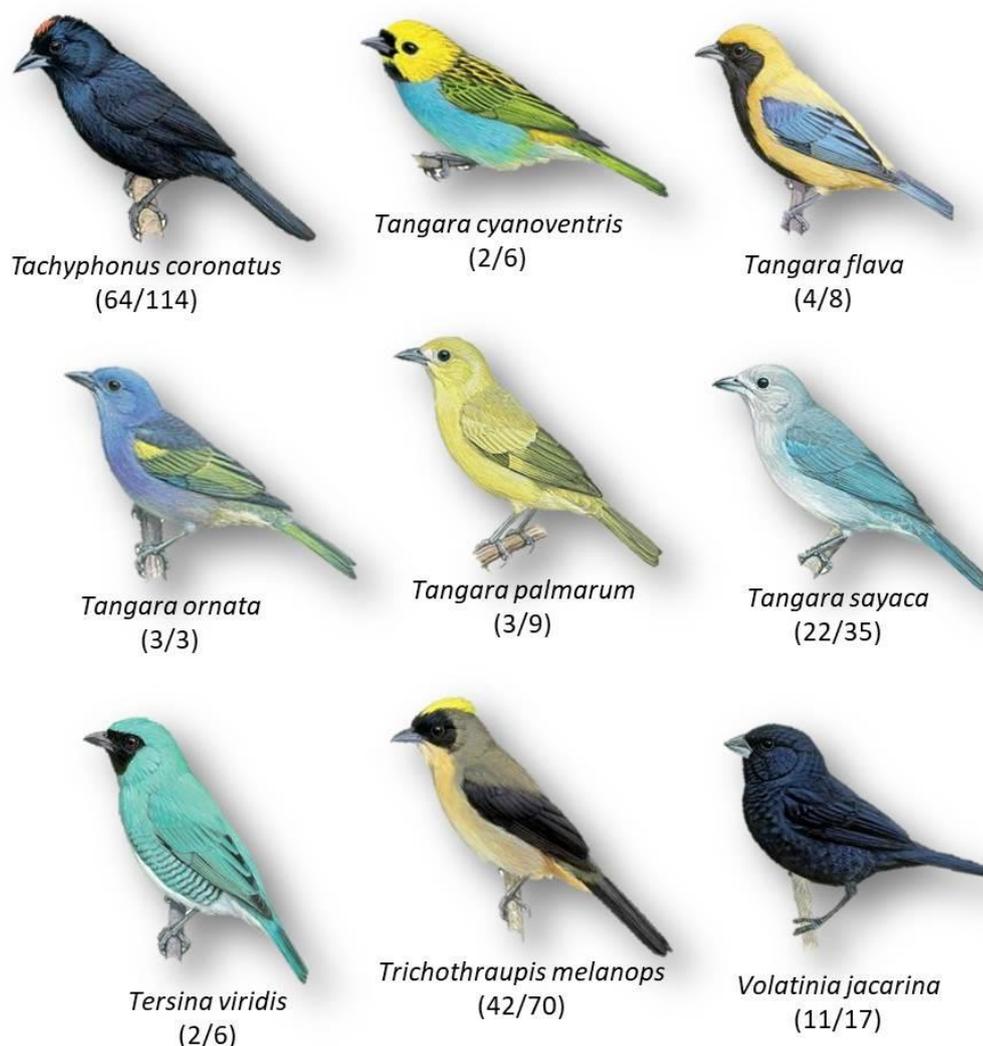


Figura 2. Espécies de aves da família Thraupidae. Os números entre parênteses representam (número de indivíduos infectados/número de indivíduos examinados). Indivíduos do sexo masculino são apresentados (imagens adaptadas de DEL HOYO et al., 2018).

3.3.2 Prevalência e parasitemia

Das 442 aves examinadas 267 indivíduos (60,4%) estavam parasitados por hemossporídeos (*Plasmodium* e *Haemoproteus*). O gênero *Plasmodium* foi o mais abundante sendo encontrado em 265 aves (99,25%) e o gênero *Haemoproteus* foi registrado somente em três aves (1,12%), sendo uma delas pertencente à espécie *Tangara sayaca* e as outras duas à espécie *Tachyphonus coronatus*. Em um indivíduo (0,37%) da espécie *T. coronatus* foi registrada infecção mista (*Plasmodium* e *Haemoproteus*). Se levarmos em consideração as espécies de aves com *n* amostral acima de 10 indivíduos, *Sicalis flaveola* foi a espécie mais parasitada com 42 indivíduos (76,3%) infectados dos 55 capturados e *Asemospiza fuliginosa*

foi a espécie menos parasitada com quatro indivíduos (28,5%) infectados dos 14 espécimes examinados (Figura 2 e 3).

As espécies de aves em que pelo menos um indivíduo apresentou gametócitos entre os estágios evolutivos nas lâminas examinadas foram: *Dacnis cayana*, *Sicalis flaveola*, *Tachyphonus coronatus*, *Tangara sayaca*, *Trichothraupis melanops* e *Volatinia jacarina*.

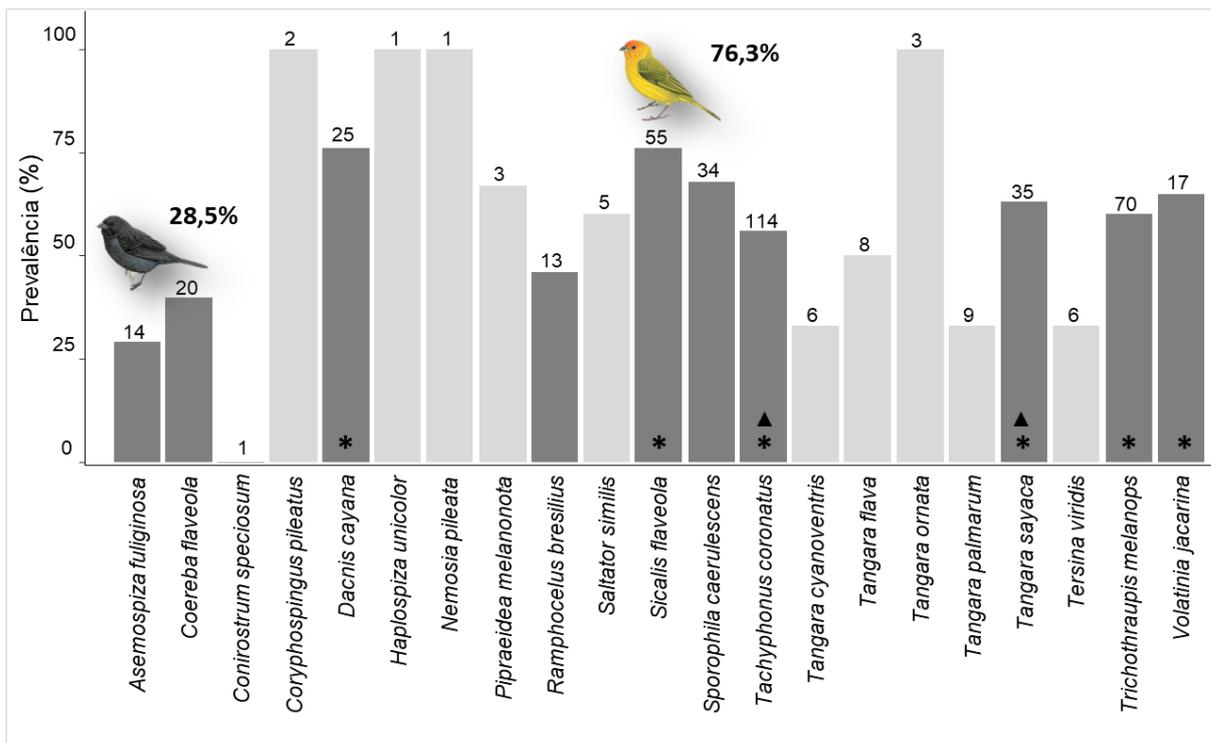


Figura 3. Prevalência de hemsporídeos (*Plasmodium*/*Haemoproteus*) por espécie de ave estudada. Os números em cima das barras indicam o número total de aves. As barras cinza escuro indicam as espécies de aves que tiveram o “n” amostral maior do que 10. Os asteriscos indicam as espécies de aves que apresentaram gametócitos nos esfregaços sanguíneos. Os triângulos indicam as duas espécies de aves que apresentaram indivíduo infectado por *Haemoproteus* spp.

A prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os sexos (machos 63,8% e fêmeas 63,4%) e as idades (jovens 53,3% e adultos 62,0%). Em relação à prevalência de infecção de *Plasmodium* spp. em cada sexo por estação do ano (seca e chuvosa) também não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1). Entretanto, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na infecção por *Plasmodium* spp. quando a prevalência registrada em indivíduos capturados em região aberta (73,0%) foi comparada com a prevalência registrada em indivíduos capturados em região florestal (55,8%) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva e bivariada das características ambientais e características das aves infectadas por *Plasmodium* spp., diagnosticadas por meio da leitura de esfregaços sanguíneos sob microscopia óptica.

| Características das aves e ambientais | Análise descritiva | | | Análise bivariada | |
|---------------------------------------|--------------------|------|-----------------|-------------------|--------|
| | N | (%) | IC de 95% | χ^2 | P |
| Sexo | | | | | |
| Macho | 177 | 63,8 | (56,71 – 70,88) | 0,146 | 0,702 |
| Fêmea | 155 | 63,4 | (55,81 – 70,98) | | |
| Idade | | | | | |
| Jovem | 60 | 53,3 | (40,67 – 65,92) | 1,318 | 0,250 |
| Adulto | 372 | 62,0 | (57,06 – 66,93) | | |
| Localidade | | | | | |
| Aberta | 115 | 73,0 | (64,88 – 81,11) | 9,819 | 0,001* |
| Florestal | 326 | 55,8 | (50,40 – 61,19) | | |
| Estação | | | | | |
| Machos | | | | | |
| Chuvosa | 74 | 63,5 | (52,53 – 74,46) | 1,239 | 1,000 |
| Seca | 103 | 64,0 | (54,73 – 73,26) | | |
| Fêmeas | | | | | |
| Chuvosa | 53 | 67,9 | (55,33 – 80,46) | 0,010 | 0,919 |
| Seca | 102 | 65,6 | (56,38 – 74,81) | | |

N: número total de aves examinadas; (%) prevalência de infecção; χ^2 : Teste Qui-quadrado; P: p-valor; IC: Intervalo de Confiança. Aberta: CAE (Sítio Vista Alegre), CHA (Sítio Paraíso da Barra), PASS (Granja Passarada); Florestal: JB (Jardim Botânico-UFJF) e SBMV (Fazenda Volta Grande).

Com relação à parasitemia de hemosporídeos (*Plasmodium/Haemoproteus*), a maioria das espécies de aves apresentou parasitemia muito baixa (entre 0,01% e 0,09%). As maiores parasitemias de *Plasmodium* spp. foram registradas em um único indivíduo das espécies *Sicalis flaveola* (0,17%), *Tachyphonus coronatus* (0,3%), *Saltator similis* (0,4%) e *Trichothraupis melanops* (0,54%) e a maior parasitemia de *Haemoproteus* spp. foi encontrada em um indivíduo de *Tangara sayaca* (0,2%). As parasitemias de *Plasmodium* spp. em machos e fêmeas durante as estações seca e chuvosa estão apresentadas na Tabela 2. Os resultados mostram que não houve diferenças estatísticas para as parasitemias dos grupos analisados.

Tabela 2. Parasitemia média total de *Plasmodium* spp. em aves machos e fêmeas positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo, coletadas na estação seca e chuvosa. A análise de variância foi utilizada na comparação dos valores médios de parasitemia, comparando-se os grupos de aves positivas por sexo em cada estação do ano de coleta.

| Sexo das aves e estação do ano | N | Parasitemia média total (%) | P |
|---------------------------------------|----------|------------------------------------|----------|
| Fêmea | | | |
| Estação | | | |
| chuvosa | 36 | 0,063 | 0,8017 |
| seca | 67 | 0,042 | |
| Macho | | | |
| Estação | | | |
| chuvosa | 47 | 0,036 | 0,5097 |
| seca | 66 | 0,053 | |
| Estação chuvosa | | | |
| Sexo | | | |
| Fêmea | 36 | 0,063 | 0,1527 |
| Macho | 47 | 0,036 | |
| Estação seca | | | |
| Sexo | | | |
| Fêmea | 67 | 0,042 | 0,2419 |
| Macho | 66 | 0,053 | |

N: número total de aves examinadas; P: p-valor pelo teste Kruscall-Wallis a 5% de significância ($p < 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

A alta prevalência de hemosporídeos (60,4%) registrada no presente estudo diverge dos baixos valores de prevalência encontrados em outros estudos com passeriformes da Mata Atlântica e de outros biomas brasileiros, assim como estudos realizados na região neotropical (WHITE et al., 1978; SEBAIO et al., 2010; 2012; FECCHIO et al., 2007; 2011). Em trabalho realizado com aves da Mata Atlântica de São Paulo, na década de 1980, foi registrado 9,8% de infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., uma das prevalências mais baixas encontradas no Brasil (WOODWORTH-LYNAS et al., 1989). Ribeiro et al. (2005) e SEBAIO et al. (2012) registraram prevalências de 16% e 12% de infecção em aves da Mata Atlântica de Minas Gerais, os dados analisados em ambos os trabalhos foram de amostras coletadas em 2000 e 2001. Outros estudos que relataram baixa prevalência de hemosporídeos aviários foram os realizados por Lainson et al. (1970) na Amazônia brasileira e por Fecchio et al. (2011) no Cerrado, os quais registraram taxas de 10% e 10,7%, respectivamente. Recentemente, TOSTES et al. (2018) registraram prevalência de 64,4% de infecção por *Plasmodium* spp. em aves da família Turdidae, sendo o único trabalho com taxa de prevalência comparável a taxa registrada no presente estudo. As aves estudadas por Tostes et al. (2018) foram capturadas nos mesmos locais e época que as aves deste trabalho. É importante destacar que a maioria dos estudos, que apresentaram baixa taxa de prevalência, foi realizada há mais de 10 anos. Isso indica que as infecções não seguem um padrão e podem estar relacionadas a fatores de exposição das aves aos vetores e parasitos, uma vez que tanto o vetor quanto as populações de parasitos podem flutuar consideravelmente entre os anos e de acordo com as condições ambientais e características do hábitat (HELLGREN et al., 2013).

A prevalência de *Plasmodium* spp. expressivamente maior que a prevalência de *Haemoproteus* spp. encontrada neste estudo, mostra similaridade com os resultados obtidos em estudos realizados na Mata Atlântica de Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2001; SEBAIO et al., 2012). No entanto, Fecchio et al. (2011) encontraram prevalência de 7,1% para infecções por *Haemoproteus* spp. e 3,6% de infecção por *Plasmodium* spp. em aves do Cerrado. Uma vez que as taxas de infecções podem ser explicadas pela exposição dos hospedeiros aos vetores, pode ser que a distribuição e abundância de dípteros das famílias Hippoboscidae e Ceratopogonidae seja menor na Mata Atlântica do que no Cerrado. De acordo com Sol et al. (2000) evidências experimentais suportam a visão de que a abundância dos vetores é o principal fator a influenciar a variação espacial na prevalência de hemoparasitos. Além disso, *Plasmodium* spp. foram registradas nas 21 espécies de aves sugerindo que o gênero possui baixa especificidade pelo hospedeiro, como também foi encontrado por Bennett et al. (1982) e Sebaio et al. (2012). Embora o gênero *Haemoproteus* tenha o maior número de espécies descritas, muitos estudos mostraram que estes parasitos são restritos a algumas espécies de aves mostrando maior especificidade pelo hospedeiro (ATKINSON et al., 1986; VALKIŪNAS, 2005).

A prevalência de *Plasmodium* spp. hemosporídeos não variou entre os indivíduos jovens e adultos. A interpretação desse parâmetro deve ser vista com cuidado, uma vez que o tamanho da amostra para indivíduos jovens é muito pequeno, o que pode mostrar incerteza nas probabilidades estatísticas. Apesar disso, os resultados do presente trabalho são semelhantes aos estudos realizados em outras comunidades aviárias de regiões temperada e tropical (RICKLEFS et al., 2005; LATTA; RICKLEFS, 2010) e a um estudo realizado com passeriformes também da Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2005). Em muitas comunidades aviárias, no entanto, foi observado aumento da prevalência de parasitos sanguíneos em relação à idade do hospedeiro (WEATHERHEAD; BENNETT 1991; KNOWLES et al., 2011; WOOD et al., 2013; FECCHIO et al., 2015, DIMITROV et al., 2018) e em outros sistemas aviários foi registrada a redução da prevalência com o aumento da idade das aves

(HUDSON; DOBSON, 1997; SOL et al., 2003; VAN OERS et al., 2010). De acordo com Valkiūnas (2005) a infecção específica da idade com hemosporídeos depende de numerosos fatores que interagem de uma maneira complexa, incluindo as peculiaridades da biologia populacional de hospedeiros vertebrados e vetores, bem como condições ambientais abióticas.

No presente estudo não foi encontrada diferença estatística para a prevalência registrada entre machos e fêmeas. Esse resultado está de acordo com outros estudos realizados na Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2005) e no Cerrado (FECCHIO et al., 2015), os quais não encontraram relação entre a prevalência de hemosporídeos e o sexo dos hospedeiros passeriformes. Diferenças na prevalência ou intensidade de infecção entre machos e fêmeas são frequentemente observadas na natureza (POULIN, 1996; ZUK; MCKEAN, 1996). Essas diferenças podem resultar de fatores ecológicos e fisiológicos que agem diferentemente em machos e fêmeas. Os fatores ecológicos podem incluir a exposição diferencial aos parasitos devido ao comportamento específico do sexo, incluindo a incubação e a morfologia como o tamanho e peso. Os fatores fisiológicos incluem os efeitos do estresse e dos hormônios na função imune dos hospedeiros (ZUK; MCKEAN, 1996). A prevalência de hemosporídeos maior nas fêmeas geralmente é associada ao aumento do investimento e gasto energético com a reprodução e a maior exposição aos vetores devido ao tempo de permanência das fêmeas nos ninhos. Entretanto, esse é outro fator que deve ser analisado individualmente para cada espécie de ave, uma vez que dependendo do tipo de acasalamento, os machos participam ativamente do cuidado com a prole.

Entre as estações seca e chuvosa também não houve diferença significativa para a prevalência de *Plasmodium* spp. Entretanto, o *n* amostral nos meses de dezembro e novembro (estação chuvosa) foi muito baixo, isso pode ter influenciado no resultado. Outros estudos realizados no Brasil registraram valores maiores de prevalência na estação chuvosa (BENNETT; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005; SEBAIO et al., 2012; LEITE et al., 2013). No entanto, a ausência de sazonalidade sobre a prevalência é frequentemente observada nos trópicos e subtropicais (GABALDON; ULLOA, 1980; FECCHIO et al., 2007). Segundo Valkiūnas (2005) estas regiões têm temperatura amena e clima úmido, onde os vetores são ativos durante o ano todo e as aves são residentes permanentes, o que resultaria numa taxa de infecção constante.

De todas as características analisadas para prevalência de *Plasmodium* spp. observou-se diferença significativa apenas entre os locais de captura das aves, em que aves de ambientes com fotofisionomia caracterizada como área “aberta” (CAE, CHA e PASS) tiveram maior prevalência do que em aves capturadas nos ambientes classificados como “fechado” (JB e SBVM). Áreas abertas são ambientes em bordas de fragmentos da Mata Atlântica e as aves são pouco dependentes de florestas, o que não é observado nos locais fechados, os quais apresentam árvores de médio e grande porte, formando floresta fechada e densa. Resultados semelhantes foram encontrados por Svoboda et al. (2014), estes autores registraram infecção por hemosporídeos quatro vezes maior em aves independentes de florestas do que em outras aves. Em contrapartida, alguns estudos têm registrado elevada prevalência em florestas com maior cobertura de árvores (BONNEAUD et al., 2009; LOISEAU et al., 2010). Os parasitos hemosporídeos são transmitidos por dípteros de diferentes espécies e o ciclo de vida desses vetores pode ser influenciado de acordo com fatores locais e condições microclimáticas, o que pode estar atuando na dinâmica ecológica desses sistemas parasitos-hospedeiros (KNOWLES et al., 2014).

A baixa intensidade parasitária encontrada na maioria das aves analisadas corrobora o que é comumente observado em estudos com aves de vida livre. Geralmente, as aves naturalmente infectadas por hemosporídeos encontram-se na fase crônica da infecção que é caracterizada pela presença de poucos parasitos intraeritrocíticos e pela baixa patogenicidade. Isso pode ser uma consequência dos métodos de amostragem como a utilização das redes de

neblina, uma vez que estas podem selecionar indivíduos saudáveis que se movem ativamente devido à baixa parasitemia (VALKIŪNAS, 2005; DIMITROV et al., 2014).

O presente estudo mostra que os hemosporídeos estão intensamente disseminados nas aves da Mata Atlântica, e que tanto fatores ecológicos quanto fisiológicos podem influenciar na dinâmica destes parasitos no bioma. A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais importantes do mundo, pois, abriga elevada diversidade de espécies, principalmente de aves. Muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção e estudos como este, sobre os fatores que podem levar à perda da biodiversidade, são importantes para que sejam investidos esforços na conservação das espécies.

3.5 CONCLUSÕES

1. A prevalência de *Plasmodium* spp. em Thraupidae da Mata Atlântica da Zona da Mata de Minas Gerais é alta ao se comparar com estudos realizados em outras localidades do mesmo bioma, em outras regiões brasileiras e na região neotropical.
2. Assim como a maioria dos estudos sobre hemosporídeos no Brasil infecções por *Plasmodium* spp. é mais frequente do que infecções por *Haemoproteus* spp.
3. Os valores de prevalência encontrados mostram que os fatores ambientais e fisiológicos dos hospedeiros influenciam na taxa parasitária.
4. A parasitemia em aves silvestres, no geral, é muito baixa. Esse padrão pode estar relacionado ao método de amostragem.

CAPÍTULO II

4 ALTA DIVERSIDADE DE HEMOSPORÍDEOS EM *Tachyphonus coronatus*, AVE ENDÊMICA DA AMÉRICA DO SUL, BASEADA NA DELIMITAÇÃO COMPUTACIONAL DE ESPÉCIES

RESUMO

Hemoproteus spp. e *Plasmodium* spp. são parasitos do sangue encontrados em aves em todo o mundo. Delimitar as espécies deste grupo é complexo, especialmente em aves silvestres que apresentam baixa parasitemia quando capturadas, impossibilitando a identificação morfológica. Assim, o uso de ferramentas alternativas para identificar espécies pode ser útil para entender a distribuição de parasitos que circulam em populações de aves. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência, a intensidade parasitária, a agregação e a sazonalidade das infecções em aves da Mata Atlântica, bem como avaliar a riqueza, distribuição e especificidade dos parasitos por um método computacional de delimitação de espécies. Amostras de sangue foram coletadas de 117 aves da espécie *Tachyphonus coronatus*. Foram realizadas análises microscópicas, PCR, sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b, análise filogenética e delimitação computacional das espécies dos hemosporídeos registrados. A prevalência de hemosporídeos (*Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.) foi de 56,4% e a parasitemia média foi de 3,9%. Não houve influência da sazonalidade nos resultados obtidos. Houve diferença significativa na intensidade parasitária sobre o sexo do hospedeiro, em que as fêmeas foram mais parasitadas do que os machos. Vinte e seis linhagens de *Plasmodium* e duas de *Haemoproteus* foram recuperadas. O método computacional delimitou seis espécies diferentes entre as linhagens de *Plasmodium* e uma espécie de *Haemoproteus*. As espécies sugeridas são amplamente distribuídas e já foram encontradas em 23 ordens de aves que, juntas, habitam todos os continentes. O método computacional de delimitação mostrou-se eficaz e a aplicação desta ferramenta pode ser útil na caracterização de linhagens de bancos de dados, bem como auxiliar na descrição das espécies de hemosporídeos.

Palavras-chave: Conservação, diversidade molecular, hemosporídeos aviários, gene *cytb*, *Tachyphonus coronatus*.

ABSTRACT

Haemoproteus spp. and *Plasmodium* spp. are blood parasites found in birds worldwide. Delimiting the species within this group is complex, especially in wild birds that present low parasitemia when captured, making morphological identification impossible. Thus, the use of alternative tools to identify species may be useful to understand the distribution of parasites that circulate in bird populations. The objective of this study was to determine the prevalence, parasite intensity, aggregation and seasonality of infections in birds of the Atlantic Forest, Brazil, as well as evaluate the richness, distribution and specificity of the parasites by a computational method of delimiting species. Blood samples were collected from 117 *Tachyphonus coronatus*. Microscopic analysis, PCR, sequencing of the mitochondrial *b* gene, phylogenetic analysis and computational delimitation of species were performed. The prevalence of *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. was 56.4%, the mean parasitemia was 3.9%, there wasn't influence of seasonality on the obtained results. There was a significant difference in the parasite intensity on the host gender, in which the females were more parasitized than the males. Twenty-six *Plasmodium* and two *Haemoproteus* lineages were recovered. The computational method delimited six different species among *Plasmodium* lineages and one *Haemoproteus* species. The suggested species are widely distributed and has already been found in 23 orders of birds that, all together, inhabit every continent. The computational method of delimitation proved to be effective. The application of this tool can be useful in the characterization of lineages of databases as well as aiding in the description of the Haemosporidian species.

Keywords: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *cytb* gene, molecular diversity, *Tachyphonus coronatus*, conservation.

4.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários da ordem Haemosporida são parasitos encontrados em aves por todo mundo. As espécies dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são as mais bem estudadas (VALKIŪNAS, 2005). Esses parasitos possuem um ciclo complexo com fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado e a fase sexuada em dípteros hematófagos (Insecta: Diptera) (GARNHAM, 1966). Caracteres morfológicos, como presença de pigmentos, formato dos gametócitos, deslocamento do núcleo da célula do hospedeiro, a posição dos parasitos nas células, o tipo de esquizogonia exo-eritrocítica e o hospedeiro vertebrado, foram tradicionalmente utilizados para descrever espécies neste grupo. Este método levou a descrição de 55 espécies de *Plasmodium* e mais de 140 de *Haemoproteus* (DIMITROV et al., 2014; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018).

Nos últimos anos, o número de sequências do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) de hemosporídeos aviários que está sendo acumulada em bancos de dados, tem levantado discussão acerca do número real de espécies existentes. No banco de dados MalAvi, criado para parasitos hemosporídeos de aves, aproximadamente 2000 linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus* baseadas no gene *cytb* (MalAvi database, BENSCH et al., 2009) estão depositadas, das quais a maioria não está atribuída a espécies caracterizadas morfológicamente.

Um consenso sobre como delimitar as espécies de hemosporídeos com base em sequências genéticas ainda não existe (PERKINS, 2014), mas os pesquisadores sugerem que a interação dos conceitos de espécie deve ser utilizada. Perkins (2000) agrupou os conceitos de espécies existentes em três classes principais: conceitos de similaridade morfológica de espécies, conceitos de espécies biológicas e conceitos filogenéticos. Este autor afirma que o cenário ideal é a integração dessas três classes para identificação em nível específico. Em Haemosporida, embora o conceito de similaridade morfológica tenha sido utilizado por muitos anos (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005), a identificação das espécies tem sido complicada pela distorção dos caracteres morfológicos em esfregaços sanguíneos, pela ocorrência de espécies crípticas e pela baixa intensidade de infecção de muitas linhagens de hemosporídeos de aves silvestres. O conceito de espécies biológicas é difícil de utilizar devido ao ciclo complexo desses parasitos e a falta de informações sobre o isolamento reprodutivo entre espécies definidas (PERKINS, 2000; OUTLAW; RICKLEFS, 2014). No entanto, o conceito filogenético tem sido amplamente utilizado, principalmente para identificar espécies crípticas em estudos com aves silvestres, em que a parasitemia é geralmente baixa e a recaptura do hospedeiro vertebrado não é possível (VALKIŪNAS et al., 2010b; 2017; PALINAUSKAS et al., 2013; 2015). O conceito filogenético de espécies define as espécies como um agrupamento de organismos com padrões de ancestralidade e descendência, os quais diferem de outros agrupamentos (ELDREDGE; CRACRAFT, 1980). Este conceito pode ser considerado uma alternativa objetiva e rápida para descrever espécies e compreender a diversidade, distribuição e evolução de hemosporídeos aviários (OUTLAW; RICKLEFS, 2014).

A distribuição de parasitos da ordem Haemosporida depende da diversidade de seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como de fatores comportamentais, biológicos e ecológicos do ambiente em que seus hospedeiros estão inseridos. Desse modo, há espécies que apresentam comportamento generalista e são encontradas parasitando diversas espécies de hospedeiros e outras que são espécies especialistas (VALKIŪNAS, 2005). A Mata Atlântica brasileira apresenta elevada biodiversidade, com aproximadamente 891 espécies de aves (LIMA, 2014) e uma grande variedade de dípteros hematófagos (BONA; NAVARRO-SILVA, 2008), os quais podem abrigar uma grande diversidade de hemosporídeos, favorecendo a dispersão de espécies destes parasitos entre as aves do bioma. Embora existam

alguns estudos sobre hemosporídeos em aves da Mata Atlântica, apenas Lacorte et al. (2013) analisaram a diversidade de linhagens de hemosporídeos, enquanto os demais focaram no diagnóstico microscópico ou molecular (RIBEIRO et al., 2005; SEBAIO et al., 2010). Deste modo, estabelecer as espécies de hemosporídeos que circulam nas aves desse ecossistema é importante para entender sua distribuição. Este é o primeiro passo para que as estratégias de conservação possam ser implementadas, uma vez que estes parasitos podem causar sérios danos na população hospedeira (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; VANSTREELS et al., 2015; ILGŪNAS et al., 2016).

A prevalência, a intensidade parasitária, a agregação e a sazonalidade das infecções foram avaliadas com o objetivo de conhecer a dinâmica de hemosporídeos em uma população de tiê-preto, *Tachyphonus coronatus* Vieillot, 1822 (Passeriformes: Thraupidae) na Mata Atlântica de Minas Gerais. Também foram utilizados métodos computacionais de delimitação de espécies a partir de informações do gene *cytb* dos parasitos para avaliar a riqueza, distribuição e especificidade das espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus* encontrados nessas aves.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Descrição da área estudada e coleta de sangue

As aves foram capturadas no município de Juiz de Fora, na Mata Atlântica de Minas Gerais no sudeste do Brasil (21° 45 '51 "S, 43 21 '01" W), entre os anos de 2013 e 2015 (36 meses). O clima de região é classificado como CWA segundo Köppen (1970), com estação fria e seca entre os meses de maio a setembro e estação quente e úmida entre os meses de outubro a abril. Redes de neblina foram utilizadas para capturar as aves, as quais foram marcadas com anilhas para evitar a reamostragem e em seguida, pesadas. A identificação das espécies foi realizada de acordo com Ridgely et al. (2009) e Sigrist (2014) com base em análises morfométricas e características fenotípicas, como tamanho, cor de plumagem, bico e penas. Amostras de sangue de 117 indivíduos da espécie *Tachyphonus coronatus* (tiê-preto) foram coletadas por punção da veia braquial e utilizadas para a preparação de esfregaços de sangue para análises microscópicas. Aproximadamente 30µl foram armazenados a -20°C para análise molecular. Após os procedimentos de amostragem, as aves foram liberadas imediatamente. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Juiz de Fora (protocolo nº 042/2012) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 29268-3 e 29268-4).

4.2.2 Análises microscópicas

Esfregaços de sangue foram preparados para cada ave coletada para cálculo de prevalência e intensidade de infecção. Os esfregaços foram fixados em metanol absoluto por 3 minutos, no local de coleta e corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) no laboratório, de acordo com Valkiūnas et al. (2008b). Um microscópio de luz Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan), equipado com uma câmera digital Olympus Evolt E-330, foi usado para examinar as lâminas em uma ampliação de 600 X por 20 min e 100 campos microscópicos foram observados em ampliação de 1000X para estimar a prevalência de infecção (BUSH et al., 1997). A parasitemia (intensidade da infecção) foi calculada seguindo o método de Godfrey et al. (1987).

4.2.3 Análises dos dados

Os descritores ecológicos (prevalência, agregação e intensidade média) seguem definição de Bush et al. (1997) e foram calculados usando o software Qpweb 1.0.8 (REICZIGEL et al., 2014). A prevalência de infecção de hemossporídeos nas estações seca e chuvosa foi comparada utilizando o teste Qui-quadrado. A comparação entre os valores de intensidade parasitária nas estações seca e chuvosa foi realizada pelo teste Mann-Whitney, no programa BioEstat 5.3. A agregação dos parasitos na população hospedeira foi estimada usando o índice de discrepância (ID). Esse índice varia de zero (quando todos os hospedeiros possuem o mesmo número de parasitos) a um (quando todos os parasitos estão em um hospedeiro) como proposto por Poulin (1993).

4.2.4 Extração do ácido nucleico (DNA)

O DNA total foi extraído de 20 µl de amostra de sangue de cada ave usando um Kit de Purificação de DNA Wizard® Genomic (Promega®, São Paulo, Brasil) de acordo com as

recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA total foi quantificado em um espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e padronizado para uma concentração de 100ng/μL. As amostras foram armazenadas em triplicata a -20°C até a análise molecular.

4.2.5 Detecção molecular

Os testes moleculares foram realizados a partir da amplificação de 618 pares de bases (pb) do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) dos parasitos hemossporídeos pela *nested* PCR. Na primeira reação utilizaram-se os “primers” HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') para amplificar o gene *cytb* de *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. (HELLGREN et al., 2004). A reação foi realizada em um volume final de 25μL, utilizando 1X Go Taq Green Master Mix (Promega, MA, EUA), 2,5μL de água ultra-pura, 2,5μL de cada “primer” [10 μM] e 5μL (20-100ng) de DNA genômico. Na segunda reação os “primers” HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplifica o gene *cytb* (aproximadamente 525 pb) de *Plasmodium*/*Haemoproteus* foram usados (BENSCH et al., 2000). A reação foi realizada em um volume final de 25μL, contendo: 1X Go Taq Green Master Mix, 1μL de cada “primer” [10μM] e 2μL da primeira reação. As condições de termociclagem de ambas as reações foram: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos e extensão final a 72°C durante 10 minutos.

No caso de co-infecções observadas no exame microscópico, foi realizada outra *nested* PCR utilizando os “primers” 3760F (5'-ATGGAGTGGGTGTTTTAGAT-3') e 4292Rw (5'-TGGAATAACATGTARAGGAGT-3') na primeira reação e na segunda reação utilizou-se os “primers” HML (5'-GCTACTGGTGCTACATTTGT-3') e HMR (5'-CCTAAAGGATTAGAGCTACC-3') que amplifica 600 pb e 367 pb do gene *cytb*, respectivamente (MERINO et al., 2008). A primeira reação foi realizada em um volume final de 25μL, contendo: 1X Go Taq Green Master Mix (Promega, MA, EUA), 2,5μL e 2,2μL dos “primers” 3760F e 4292Rw, respectivamente, 2,8μL de água ultra-pura e 5μL (20-100 ng) de DNA total. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, modificando apenas os “primers” e o DNA molde. Nesta reação, 1μL [10μM] dos “primers” HMR e HML e 1μL da primeira reação foram utilizados. As condições de termociclagem podem ser encontradas em MERINO et al. (2008). Água ultra-pura foi usada como controle negativo. O DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* foi extraído de cultura celular e utilizado como controle positivo. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Blue Green Loading Dye I (Biotecnologia LGC, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob luz ultravioleta.

4.2.6 Sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados usando o Kit QIAquick® Purification (Qiagen®, São Paulo, Brasil) e submetidos ao sequenciamento bidirecional com os iniciadores HaemF/HaemR2, HML/HMR (BENSCH et al., 2000; MERINO et al., 2008), no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante.

4.2.7 Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando um conjunto de dados contendo 28 sequências do gene *cytb* de hemosporídeos obtidas no presente trabalho e um conjunto de sequências de morfoespécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus* disponíveis no banco de sequências MalAvi (n= 181), em abril de 2018 (BENSCH et al., 2009). As espécies *Leucocytozoon buteonis*, *Leucocytozoon fringillinarum*, *Leucocytozoon quynzae*, foram escolhidas como grupo externo. As sequências foram alinhadas no programa MAFFT (KATO et al., 2017) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas com o *Gblocks* (TALAVERA; CASTRESANA, 2007), obteve-se uma matriz com 479 pb. A inferência da filogenia de Haemosporida foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança (ML) implementada no programa RaxML (STAMATAKIS, 2014), utilizando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição no JmodelTest implementado no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Os valores suporte dos clados foram avaliados com o critério de auto-convergência de *bootstrap* do RaxML (STAMATAKIS, 2014) com 500 pseudo-replicatas.

4.2.8 Delimitação de espécies

O status taxonômico das linhagens obtidas a partir de *T. coronatus* foi avaliado pelo método de delimitação de espécie Multi-rate Poisson Tree Process (MPTP), uma versão do algoritmo PTP (KAPLI et al., 2017). O modelo proposto pelo algoritmo PTP é baseado no critério de máxima verossimilhança, fundamentado na teoria da coalescência e visa encontrar diferenças significativas entre as relações reconstruídas entre e dentro das espécies, as quais são refletidas pelo comprimento de ramos na topologia (ZHANG et al., 2013). Como o comprimento de ramo representa o número médio esperado de substituições por sítio, o PTP assume que o número de substituições entre as espécies é maior que o número de substituições dentro das espécies (ZHANG et al., 2013). O MPTP melhora a estimativa em filogenias que possuem diferentes taxas inter e intraespecíficas, permitindo explicar as diferentes taxas de eventos de ramificação dentro de cada espécie delimitada (KAPLI et al., 2017). No presente trabalho, um amplo conjunto de dados utilizado para delimitar as espécies de hemosporídeos foi montado a fim de evitar viés amostral e, portanto, as análises para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. foram realizadas separadamente. Todas as sequências acima de 430 pb do gene *cytb* depositadas no MalAvi, foram utilizadas juntamente com as novas sequências produzidas no presente estudo. O conjunto de dados de *Plasmodium* spp. consistiu em 906 sequências (26 do presente estudo e 880 disponíveis na base de dados MalAvi), enquanto o conjunto de dados de *Haemoproteus* spp. apresentou 984 sequências (02 do presente estudo e 982 na base de dados MalAvi). As espécies *L. buteonis*, *L. fringillinarum*, *L. quynzae*, foram escolhidas como grupo externo de ambos os conjuntos de dados. As sequências foram alinhadas no programa MAFFT (KATO et al., 2017) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após a remoção de posições mal alinhadas com *Gblocks* (TALAVERA; CASTRESANA, 2007), uma matriz com 477 pb foi obtida para *Plasmodium* e 479 pb para *Haemoproteus*. A inferência da filogenia de Haemosporida foi conduzida sob análise de Máxima Verossimilhança (ML) implementada no RaxML (STAMATAKIS, 2014), utilizando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição por meio do algoritmo JmodelTest implementado no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). A estimativa de delimitação específica foi conduzida no servidor online do programa MPTP (disponível em: <http://mptpt.h-its.org>), utilizando a filogenia obtida no RaxML como *input*, remoção do grupo externo e opções padrão do programa.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Prevalência, intensidade parasitária, sazonalidade e agregação

Foram coletadas amostras de 117 espécimes de *Tachyphonus coronatus* (tiê-preto) entre os anos de 2013 e 2015 na Mata Atlântica de Minas Gerais. Sessenta e duas (53%) amostras foram coletadas durante a estação seca e cinquenta e cinco (47%) durante a estação chuvosa. No geral, a prevalência *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em *T. coronatus* foi de 56,4%. A prevalência na estação seca foi 58,06% (n = 36) e na estação chuvosa foi 54,55% (n = 30), não apresentando diferença significativa (p>0,05). A intensidade média parasitária total foi 3,86%, a parasitemia mínima foi 0,01 e a máxima 0,30%. A maioria das aves infectadas (60%) apresentou baixa intensidade parasitária (0,01-0,05%) e somente 13% apresentaram intensidade parasitária maior que 0,1%. A intensidade parasitária média na estação seca foi 0,0622% ± 0,05 e na estação chuvosa foi 0,0540% ± 0,05, não havendo diferença significativa (p>0,05). O índice de agregação de hemossporídeos durante as estações foi ID = 0,703 na chuvosa e ID = 0,658 na seca, não apresentando diferença na distribuição dos parasitos. Em relação ao sexo das aves, 59 indivíduos eram machos, 42 fêmeas e 16 não tiveram o sexo determinado. Os parasitos foram encontrados em 55,93% dos machos e 57,14% das fêmeas, esses valores não apresentaram diferença significativa (p>0,05). A intensidade média de parasitos em machos e fêmeas foi 0,047% ± 0,04 e 0,0771% ± 0,07 respectivamente, mostrando diferença significativa (p = 0,04).

4.3.2 Reconstrução filogenética

Das amostras positivas no exame microscópico (n = 66), 28 sequências do gene *cytb* de parasitos hemossporídeos de 27 espécimes de *T. coronatus* foram obtidas, duas delas foram obtidas de um indivíduo com co-infecção. Não foi possível sequenciamento genético das demais amostras positivas devido à escassez de material biológico para extração de DNA e resultados insatisfatórios na PCR.

A reconstrução filogenética, a partir do conjunto de dados com sequências de morfoespécies disponíveis no MalAvi, mostrou que 26 linhagens do presente trabalho agruparam com as linhagens de *Plasmodium* spp. e duas com linhagens de *Haemoproteus* spp. (Figura 1). O gênero *Haemoproteus* não foi recuperado como monofilético, uma vez que o clado composto por *Haemoproteus antigonis* foi o primeiro a divergir entre os outros Haemosporida. As demais espécies de *Haemoproteus* foram recuperadas como grupo irmão de representantes do gênero *Plasmodium* que parasitam aves. As linhagens de parasitos do tiê-preto formaram sete agrupamentos com diferentes espécies de *Plasmodium* (Figura 1). O primeiro agrupamento (clado 1) teve como grupo irmão a espécie *Plasmodium elongatum*, o segundo (clado 2) apresentou *Plasmodium matutinum* e *Plasmodium lutzi* como grupos irmãos e o terceiro (clado 3) teve *Plasmodium unalis* como grupo irmão. O quarto clado (clado 4) não se agrupou com sequências de morfoespécies conhecidas, enquanto o quinto clado (clado 5) se agrupou com *Plasmodium nucleophilum*. O sexto agrupamento (clado 6) surgiu como grupo irmão de *Plasmodium cathemerium* e o sétimo (clado 7) como grupo irmão de *Plasmodium gallinaceum*. As duas linhagens que se agruparam ao gênero *Haemoproteus* (clado 8) obteve *Haemoproteus ilanparpernai* como grupo irmão (Figura 1).

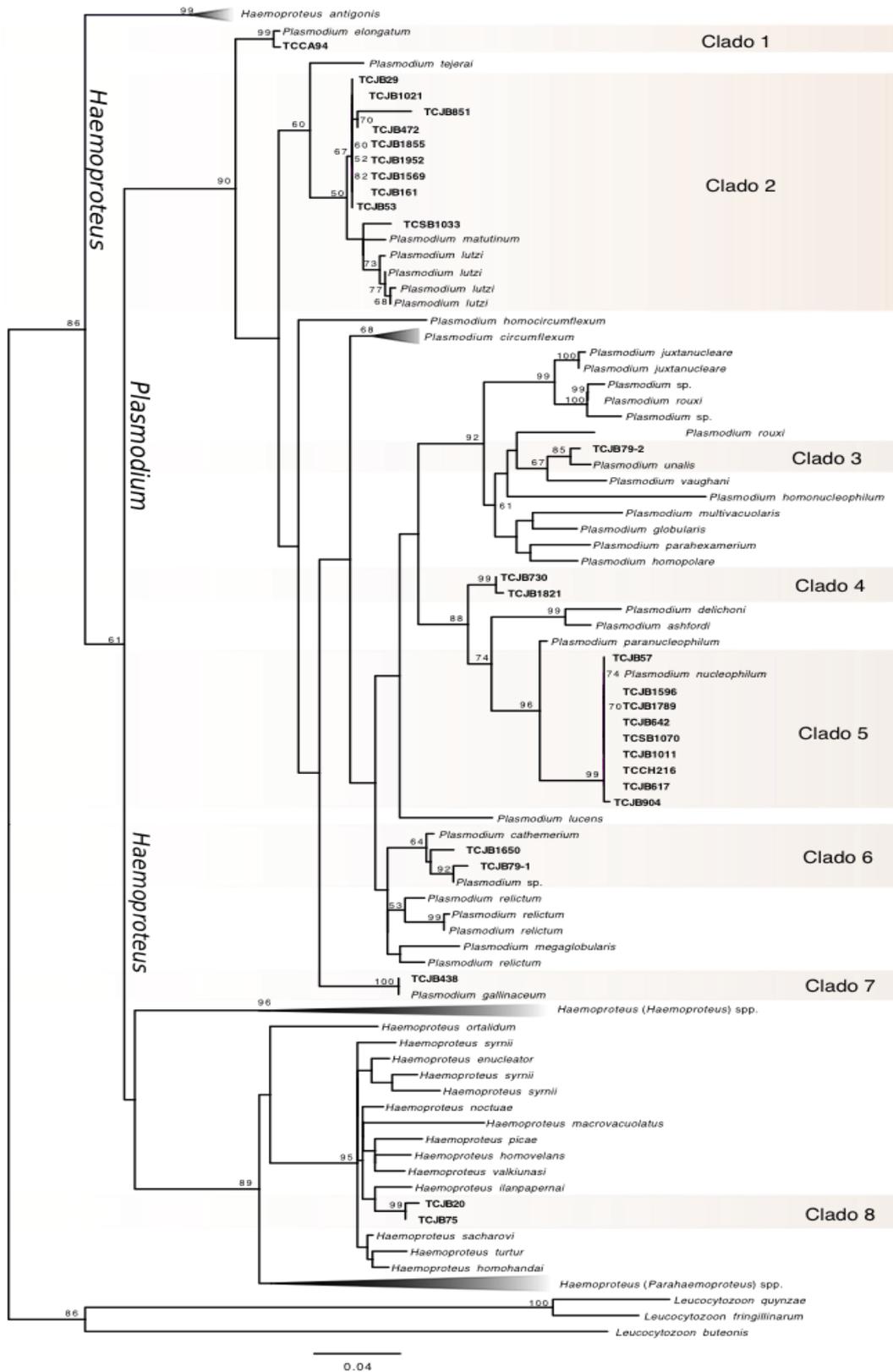


Figura 1. Relações evolutivas entre linhagens do gene mitocondrial citocromo b das morfoespécies de hemosporídeos estimadas pela análise de Máxima Verossimilhança (ML). *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Nós com valores suportes > 50% são indicados próximos aos clados. As seqüências do presente estudo estão em negrito. Barra representa 4 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

4.3.3 Delimitação das espécies

A inferência de unidades evolutivas significativas por meio do MPTP delimitou seis diferentes espécies entre as linhagens de *Plasmodium* (Figura 2), o que ressalta alta diversidade de hemosporídeos em tiês-pretos coletados em apenas uma região da Mata Atlântica. Na espécie 1, foram agrupados uma linhagem encontrada parasitando o tiê-preto (TCCA94), uma linhagem de *Plasmodium elongatum* e outras linhagens que não estão associadas à morfoespécies determinadas. Na espécie 2 se agruparam onze linhagens encontradas no tiê-preto (TCJB57, TCCH216, TCJB617, TCJB642, TCJB730, TCJB904, TCJB1011, TCSB1070, TCJB1596, TCJB1789, TCJB1821), *Plasmodium nucleophilum*, *Plasmodium paranucleophilum*, *Plasmodium ashfordi*, *Plasmodium delichoni* e linhagens que não estão associadas à morfoespécies determinadas. Na espécie 3 agrupou uma linhagem encontrada no tiê-preto (TCJB79-2), *Plasmodium unalis*, *Plasmodium vaughani* e outras linhagens que não estão associadas a morfoespécies determinadas. Na espécie 4 se agruparam duas linhagens encontradas no tiê-preto (TCJB79-1, TCJB1650), *Plasmodium cathemerium* e linhagens sem identificação em nível específico. Na espécie 5 se agrupou uma linhagem encontrada no tiê-preto (TCJB438), próxima a *Plasmodium gallinaceum* e linhagens não identificadas morfologicamente. Na espécie 6 se agruparam dez linhagens encontradas no tiê-preto (TCJB29, TCJB53, TCJB161, TCJB472, TCJB851, TCJB1021, TCSB1033, TCJB1569, TCJB1855, TCJB1952), *Plasmodium lutzi*, *Plasmodium matutinum*, *Plasmodium tejerai* e linhagens sem identificação em nível específico (Figura 2). Entre as linhagens de *Haemoproteus* o MPTP delimitou uma espécie (espécie 7), a qual foi agrupada duas linhagens do tiê-preto (TCJB20, TCJB75), linhagens de *Haemoproteus syrniai* e linhagens que não estão associadas a morfoespécies determinadas (Figura 3).

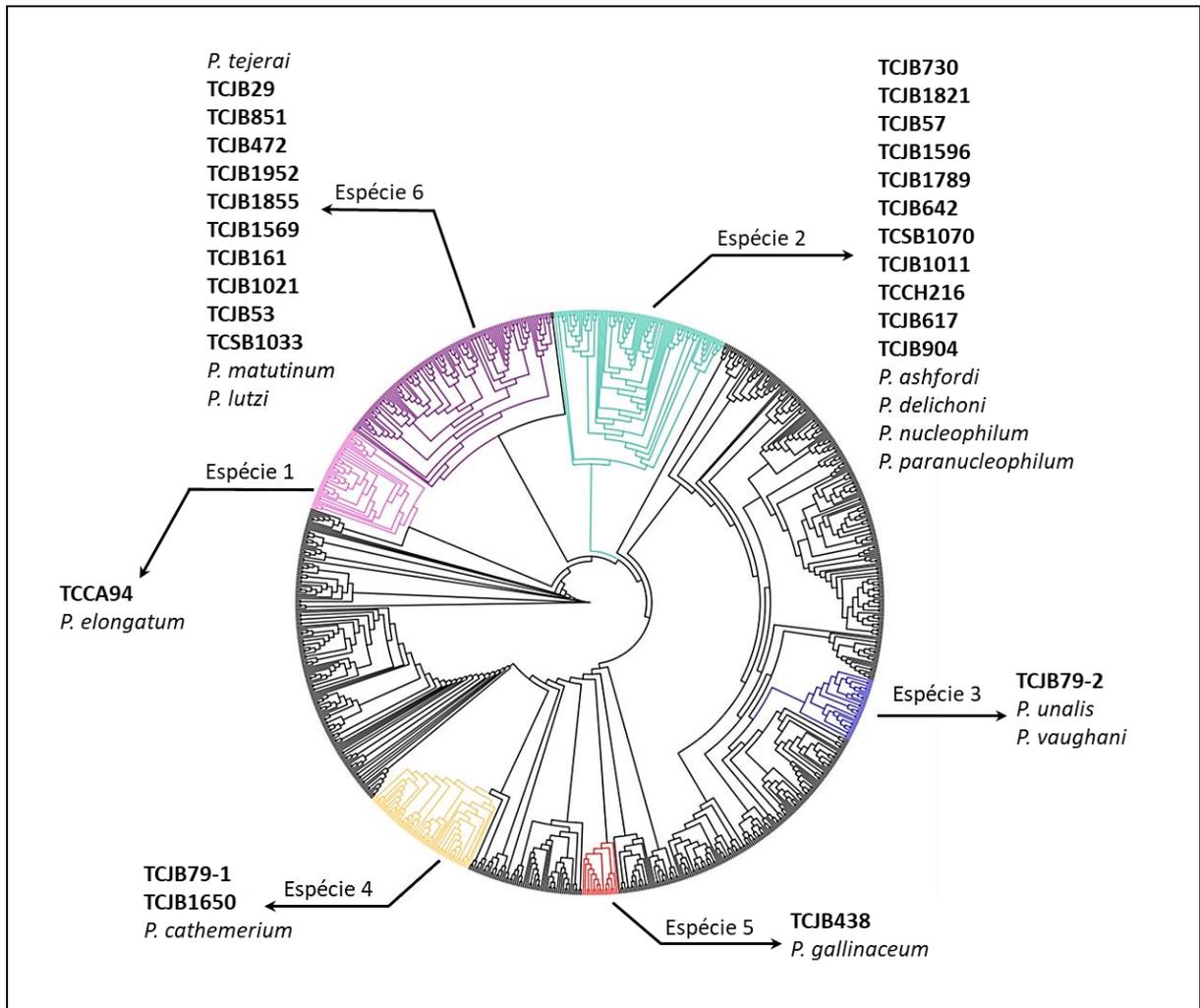


Figura 2. Espécies de *Plasmodium* encontradas em *Tachyphonus coronatus* e delimitadas pelo método MPTP. Foram evidenciadas somente as linhagens do presente trabalho (em negrito) e as morfoespécies que se agruparam a elas.

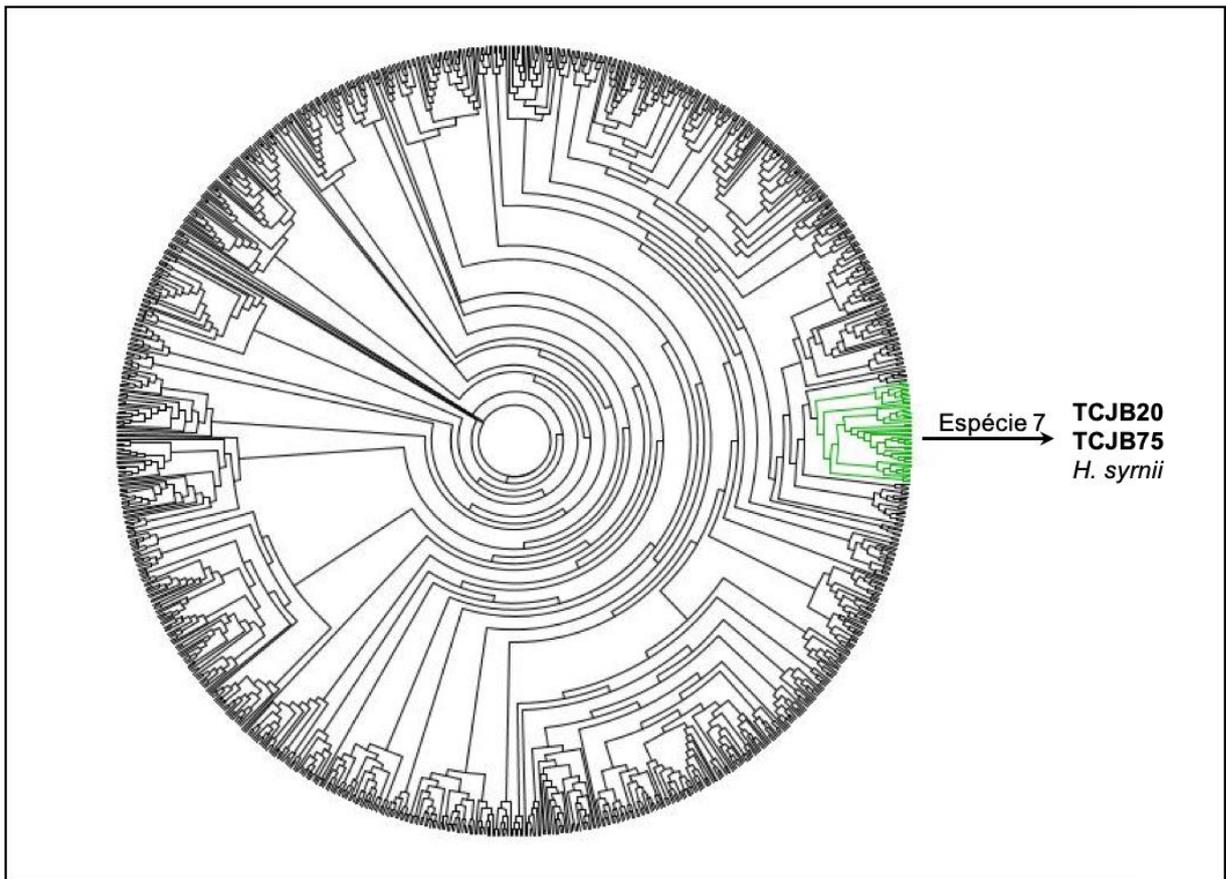


Figura 3. Espécie de *Haemoproteus* encontrada em *Tachyphonus coronatus* e delimitada pelo método MPTP. Foi evidenciado somente o clado que contém as linhagens do presente trabalho (em negrito) e as morfoespécies que se agruparam a elas.

4.3.4 Distribuição das espécies em hospedeiros aviários no mundo

As sete espécies delimitadas (*Plasmodium*/*Haemoproteus*) foram registradas em 23 ordens de aves (Figura 4) que estão distribuídas em todos os continentes, exceto na Antártica (Figura 5). A ordem Passeriformes tem o maior número de registro de parasitos e foi a única que apresentou todas as espécies delimitadas neste trabalho. A América do Sul foi o continente com o maior número de registro das seis espécies de *Plasmodium*, cujas espécies foram registradas principalmente nas regiões Norte e Sudeste do Brasil (Figura 5). A América do Norte foi a região com a maior ocorrência da espécie 7 (*Haemoproteus*), a qual já foi registrada na região Norte do Brasil. As sete espécies aqui delimitadas foram registradas tanto em aves cativas quanto em aves silvestres.

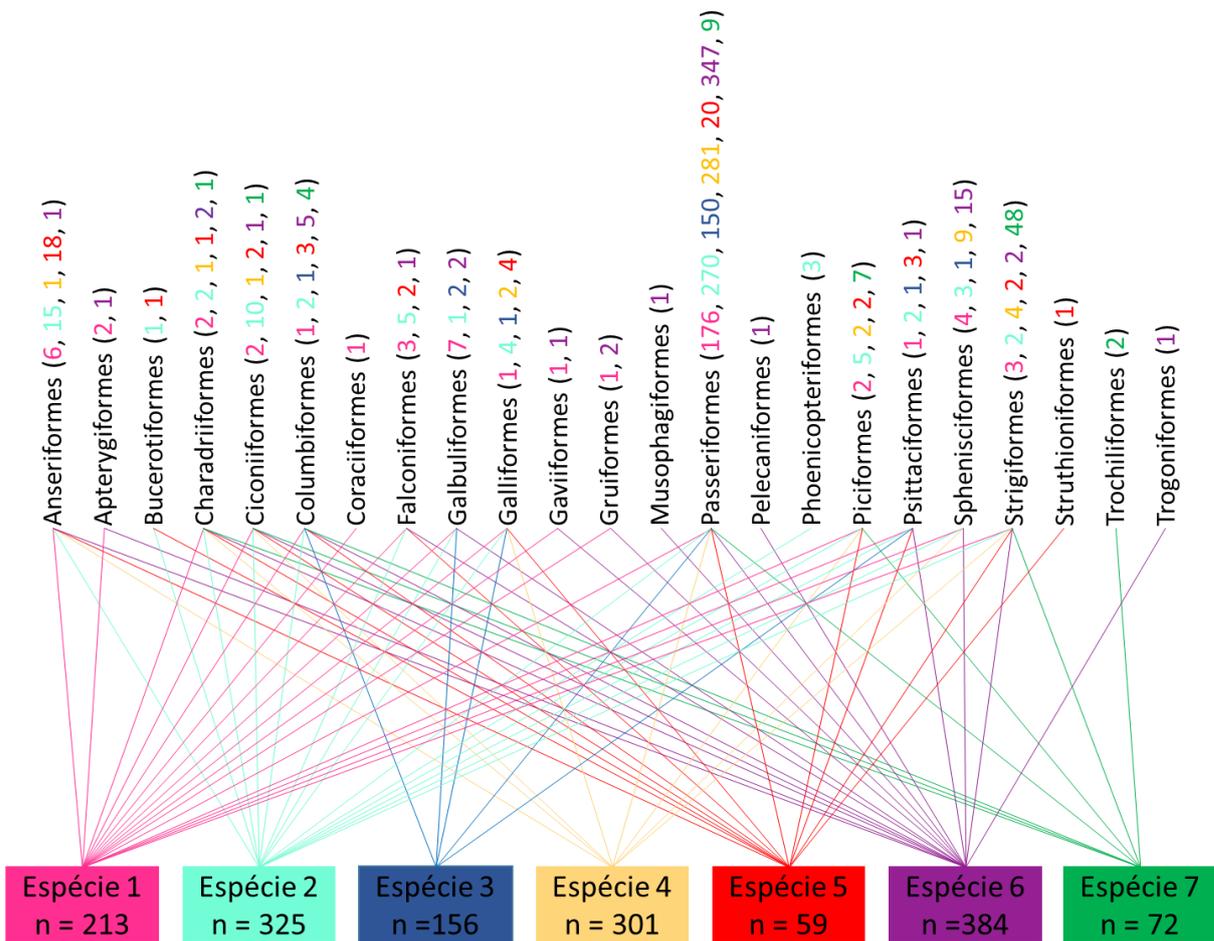


Figura 4. Gráfico representando as ordens de aves parasitadas pelas espécies delimitadas no presente trabalho pelo MPTP. Cada cor representa uma espécie de hemopsporídeo, “n” representa o número de vezes que aquela espécie foi registrada no geral. Os números entre parênteses mostram quantas vezes cada espécie foi registrada nas ordens das aves.

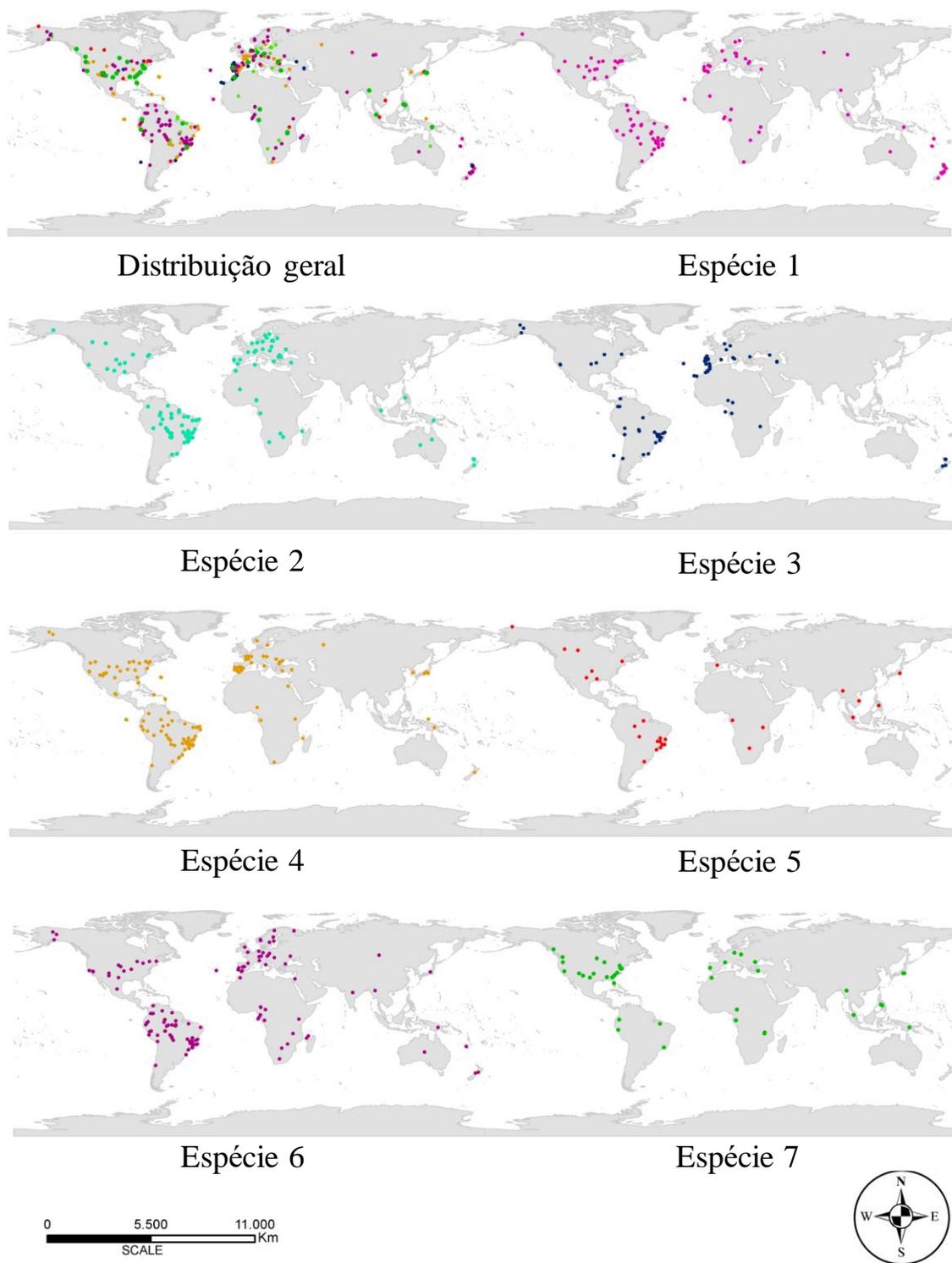


Figura 5. Mapa da distribuição geográfica das espécies de parasitos delimitadas no presente estudo pelo MPTP.

4.4 DISCUSSÃO

Hemosporídeos foram previamente registrados em *Tachyphonus coronatus* de uma região de São Paulo e na Mata Atlântica de Minas Gerais apenas em estudos para diagnóstico (BENNET; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005). Deste modo informações sobre a diversidade de espécies, relações ecológicas e filogenéticas foram pela primeira vez investigadas pelo presente estudo.

A prevalência encontrada é considerada alta quando comparada a outros estudos com aves silvestres da região neotropical (FECCHIO et al., 2011; SEBAIO et al., 2012; MIJARES et al., 2012; FECCHIO et al., 2017a), o que pode estar relacionado ao hábito, a genética dos hospedeiros, à exposição aos vetores, à distribuição, competência e à capacidade vetorial dos vetores (BENSCH et al., 2007; GLAIZOT et al., 2012). O tiê-preto é uma ave de hábito generalista encontrado em várias regiões do Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai (SICK, 1997; SIGRIST 2014). É comumente encontrado na Mata Atlântica, onde a diversidade de aves e dípteros é elevada (LIMA, 2014; GUEDES, 2012) e isso contribui para o amplo e diversificado contato com outras espécies de hospedeiros aviários e vetores de hemosporídeos.

Ausência de sazonalidade sobre a prevalência geralmente é observada nos trópicos e subtropicais. Estas regiões têm temperatura amena e clima úmido, onde os vetores são ativos ao longo do ano e as aves são residentes permanentes (VALKIŪNAS, 2005). A transmissão de hemosporídeos durante todo o ano também foi observada na Venezuela (GABALDON; ULLOA, 1980) e no Cerrado brasileiro (FECCHIO et al., 2007). No entanto, outros estudos realizados no Brasil registraram valores maiores de prevalência na estação chuvosa (BENNETT; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005; SEBAIO et al., 2012; LEITE et al., 2013). Com base nestes estudos, podemos sugerir que além de fatores imunológicos, genéticos e relações co-evolutivas parasito-hospedeiro condições ambientais também estão envolvidas na transmissão dos parasitos (FALLON et al., 2004; FECCHIO et al., 2015).

O índice de agregação revela homogeneidade na distribuição de hemosporídeos ao longo das estações. Hernandez-Lara et al. (2017) também não encontraram distribuição sazonal do índice de agregação de espécies de hemosporídeos em aves do México. Embora não seja um fator ecológico comumente utilizado em estudos com hemosporídeos de aves, é um parâmetro a ser considerado para melhor entendimento da dinâmica parasito-hospedeiro nos sistemas estudados. Como no presente estudo, vários outros mostraram que as fêmeas tendem a ter maior intensidade parasitária que os machos (BENTZ et al., 2006; HASSELQUIST et al., 2007; ASGHAR et al., 2011). De acordo com Asghar et al. (2011), o alto nível de estresse fisiológico adquirido durante a fase de reprodução pode elevar a intensidade de infecção crônica nas fêmeas. Além disso, a menor intensidade de infecção nos machos pode ser um indicador de resistência genética aos parasitos. Em populações de aves isto é um sinal importante para seleção sexual, uma vez que a alta qualidade genética aumenta a viabilidade da prole (HAMILTON; POULIN, 1997).

A reconstrução filogenética com as 26 linhagens de *Plasmodium* e duas de *Haemoproteus* identificadas no tiê-preto sugere que a diversidade de parasitos hemosporídeos nesta população de aves é alta. O agrupamento da maioria das linhagens aos clados contendo as espécies *P. matutinum* e *P. lutzii* (clado 2) e *P. nucleophilum* (clado 6), indica que estas linhagens estão bem difundidas na região. Além disso, *P. lutzii* e *P. nucleophilum* foram registrados parasitando outras espécies de aves na Mata Atlântica, inclusive na mesma região que os tiês-pretos foram capturados (LACORTE et al., 2013; CHAGAS et al., 2013, 2017; TOSTES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019), sugerindo baixa especificidade quanto ao hospedeiro. O agrupamento das outras linhagens às espécies *P. elongatum*, *P. unalis*, *P.*

cathemerium e *P. gallinaceum* sugere que estas espécies também estão presentes na região estudada. Estudos recentes registraram *P. unalis* em espécies de *Turdus* spp. no mesmo local em que os tiês foram capturados (TOSTES et al., 2018) e *P. elongatum* em espécies das famílias Anatidae e Phasianidae do Zoológico de São Paulo que está localizado dentro de um parque estadual, em um remanescente de Mata Atlântica (CHAGAS et al., 2017). Além disso, Lacorte et al. (2013) apresentaram evidências de linhagens de *P. elongatum* em espécies de *Turdus* na Mata Atlântica. *Plasmodium cathemerium* foi registrado em pinguins de centros de reabilitação da Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina (VANSTREELS et al., 2015) no entanto, não há registros de *P. cathemerium* em aves silvestres endêmicas do Brasil.

A transmissão natural de *P. gallinaceum* foi registrada apenas no continente asiático (VALKIŪNAS, 2005), no entanto, linhagens intimamente relacionadas a esse parasito foram detectadas em aves silvestres e aves cativas no Sudeste do Brasil (LACORTE et al., 2013; MOTTA et al., 2013), e também em *Culex* spp. coletados no Parque Estadual da Mata Seca em Minas Gerais (FERREIRA et al., 2016). Duas linhagens do tiê-preto agruparam-se a *Haemoproteus ilanpapernai*. Esse parasito foi descrito em uma espécie de ave no Sudeste da Ásia (KARADJIAN et al., 2014), no entanto, foi previamente identificado como *H. syrni* (KARADJIAN et al., 2013). Embora, a descrição de *H. ilanpapernai* tenha sido feita a partir de caracteres moleculares e morfológicos, estes não foram bem detalhados (apenas tamanho e comprimento dos gametócitos jovens e dos eritrócitos) o que deixa dúvidas quanto sua posição taxonômica.

Um novo clado contendo a espécie *Haemoproteus antigonis* apareceu em nossas análises, mostrando a parafilia do gênero *Haemoproteus*. O clado foi recentemente proposto por Bertram et al., (2017), no entanto, os dados são considerados de baixa qualidade, pois foram obtidos a partir do consenso de diversas sequências parciais de *cytb* e *cox1* de infecções mistas (PACHECO et al., 2017). Além disso, *Haemoproteus sacharovi* e *Haemoproteus turtur*, tradicionalmente classificados no subgênero *Haemoproteus*, ramificaram-se no clado com espécies do subgênero *Parahaemoproteus*, cujas espécies apareceram em clados de *Parahaemoproteus* em diversas filogenias de hemosporídeos aviários (MARTINSEN et al., 2008; SANTIAGO-ALARCON et al., 2010; VALKIŪNAS et al., 2010a; KRIZANAUSKIENĖ et al., 2013). O gênero *Plasmodium* surgiu como grupo monofilético, mas a posição filogenética dos subgêneros discordou da classificação tradicional. As espécies *P. tejerai*, *P. matutinum* e *P. lutzi* do subgênero *Haemamoeba* agruparam-se distantes dos outros representantes deste grupo. Resultado semelhante foi mostrado na descrição molecular do *P. matutinum* que apresentou estreita relação filogenética com *Plasmodium tejerai* posicionando-se distantemente de outras espécies de *Haemamoeba* (VALKIŪNAS et al., 2017). Incongruências também foram observadas em *P. megaglobularis* que é classificado morfológicamente como representante do subgênero *Novyella*, no entanto, sua sequência se agrupou aos representantes do subgênero *Haemamoeba*. Essa discordância também foi encontrada na descrição original da espécie (VALKIŪNAS et al., 2008c), contradizendo a divisão dos subgêneros de *Plasmodium* que foi baseada na taxonomia tradicional com base em caracteres morfológicos. Dessa forma, análises filogenéticas do gene *cytb* na identificação molecular da posição genérica e subgenérica de hemosporídeos devem ser aplicadas com cautela.

Os pesquisadores recomendam que a análise simultânea de sequências de DNA e caracteres morfológicos deve ser realizada para identificar e classificar hemosporídeos aviários (BRAGA et al., 2011; CLARK et al., 2014; OUTLAW; RICKLEFS, 2014, VALKIŪNAS et al., 2018). No entanto, na vida silvestre, a identificação das espécies desses parasitos é uma tarefa difícil. Isto é principalmente devido a infecções leves serem muito comuns, e podem ser consequência de métodos de amostragem de aves (por exemplo: rede de neblina), em que na maioria das vezes selecionam indivíduos saudáveis que se movem

ativamente devido à baixa parasitemia (VALKIŪNAS, 2005; DIMITROV et al., 2014). Além de abordagens morfológicas e moleculares, questões importantes relacionadas a “limites de espécies” como a necessidade de treinamento de parasitologistas, a melhoria na maneira de especificar linhagens em bancos de dados moleculares e o desenvolvimento de critérios para definir espécies são discutidas pelos especialistas (PERKINS et al., 2011; LITTLEWOOD, 2012; OUTLAW; RICKLEFS, 2014).

Critérios para delimitar espécies em hemosporídeos aviários foram sugeridos, incluindo a concordância entre os dados de sequência multi-locus (FALK et al., 2011) e níveis absolutos de divergência de sequência (BENSCH et al., 2004; VALKIŪNAS et al., 2009a). No entanto, o maior desafio enfrentado para pesquisadores interessados na sistemática de Haemosporida é o desenvolvimento de marcadores genéticos (PERKINS, 2014). A falta de novos marcadores impossibilita trabalhar com a filogenia multigenes. Valores absolutos de divergência genética foram propostos (HELLGREN et al., 2007; VALKIŪNAS, 2009a;b; OUTLAW; RICKLEFS, 2014), mas devido à compreensão limitada das taxas de evolução dos genes do mtDNA, pouco se sabe sobre como interpretar a divergência observada entre as linhagens (PACHECO et al., 2017).

Enquanto novos marcadores genéticos específicos não são desenvolvidos, uma alta taxa de linhagens do *cytb* de hemosporídeos está sendo adicionada nos bancos de dados GenBank e MalAvi (BENSCH et al., 2009; PERKINS, 2014) tornando esse gene a ferramenta mais útil para definir espécies e/ou OTUs para este grupo de parasitos (OUTLAW; RICKLEFS, 2014). Dessa forma, a utilização de métodos de delimitação de espécies computacionais pode ser uma boa alternativa para trabalhar com essa grande quantidade de sequências depositadas em bancos de dados, em que a maioria foi identificada apenas em nível genérico.

O método MPTP foi efetivo e congruente com a taxonomia tradicional ao delimitar as espécies *P. elongatum* (espécie 1), *P. cathemerium* (espécie 4), *P. gallinaceum* (espécie 5) and *H. syrnii* (espécie 7), as quais apresentaram somente uma morfoespécie entre suas linhagens. Embora a baixa parasitemia tenha impossibilitado a identificação morfológica, os poucos estágios sanguíneos encontrados no tiê indicam concordância com estas morfoespécies. Ao agrupar diferentes morfoespécies em uma única espécie (espécies 2, 3 e 6), o MPTP mostrou ser um delimitador *lumper* (aquele que define as espécies de forma ampla, submergindo mais de uma espécie definida taxonomicamente sob um único nome). No entanto, na espécie 2 agrupou *P. nucleophilum*, *P. paranucleophilum*, *P. delichoni* e *P. ashfordi*, que pertencem ao subgênero *Novyella* e apresentam como característica em comum, estágios sanguíneos nucleofílicos, com exceção de *P. ashfordi*. *P. paranucleophilum* apresenta baixa divergência genética, 2,48% em média, em relação a *P. ashfordi* e *P. nucleophilum*, além de fortes semelhanças morfológicas. Portanto, na descrição de *P. nucleophilum*, os autores sugeriram que as linhagens são espécies independentes (TOSTES et al., 2017). Na descrição original, *P. delichoni* apareceu no mesmo clado com *P. nucleophilum* indicando relações filogenéticas próximas e distância genética de 5,7% e no mesmo clado que *P. ashfordi* com distância genética de 2,8%, mas apresentam merontes e gametócitos não nucleofílicos (VALKIŪNAS et al., 2016).

Na espécie 3, o método MPTP agrupou *P. unalis* e *P. vaughani*, ambas pertencem ao subgênero *Novyella* e são bem semelhantes morfológicamente possuindo distância genética de 3,2% (MANTILLA et al., 2013b). Como há controvérsias entre os caracteres morfológicos e as filogenias, os autores sugerem que análise multigênica é necessária para melhor compreensão das relações evolutivas entre as espécies de *Novyella* e outras *Plasmodium* spp., mas reconhecem que tal análise é atualmente limitada devido à informação insuficiente sobre sequências de DNA de outros genes em *Plasmodium* spp. (VALKIŪNAS et al., 2016; MANTILLA et al., 2013b). Na espécie 6 agrupou *Plasmodium lutzi*, *Plasmodium matutinum*,

Plasmodium tejerai, as quais pertencem ao subgênero *Haemamoeba*. *Plasmodium matutinum* e *P. tejerai* possuem vacúolos bem distinguíveis nos merontes eritrocitários e são proximamente relacionados com divergência genética de 4,1%, sugerindo que a característica de vacuolização de merontes pode ser filogeneticamente informativa (VALKIŪNAS et al., 2017). Esses autores sugerem que investigação de outras espécies de *Plasmodium* contendo vacúolos grandes em merontes eritrocitários é necessária para testar esta observação. *Plasmodium lutzi* apresenta vacúolos em macrogametócitos, mas não há reconstrução filogenética incluindo *P. matutinum* e *P. tejerai* para inferir a divergência genética (MANTILLA et al., 2013a; OLIVEIRA et al., 2019). Embora o método MPTP tenha sido *lumper* em relação à taxonomia atual, ele nos permitiu identificar pelo menos sete espécies de hemosporídeos no tiê-preto. De acordo com Carstens et al. (2013), uma posição conservadora deve ser tomada ao inferir espécies em estudos de delimitação, porque na maioria dos cenários é melhor não delimitar espécies do que falsamente criar entidades que estabeleçam limites excessivos à biodiversidade. Além disso, o método MPTP mostrou resultados confiáveis, com número de espécies delimitado próximo ao número total de espécies taxonômicas em estudos de diversidade e conservação (KAPLI et al., 2017; BLAIR; BRYSON, 2017; CORREA et al., 2017).

Nesse contexto, a distribuição destas possíveis espécies nos hospedeiros aviários pelo mundo foi estimada. A ampla distribuição de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. pelas mais variadas espécies de aves mostra a baixa especificidade nesse grupo de parasitos que foram considerados por muito tempo altamente específicos (VALKIŪNAS, 2005). Estes hemosporídeos podem causar sérios danos aos hospedeiros aviários (ATKINSON et al., 2009). Além de patologias sanguíneas, vários órgãos podem ser danificados por merontes exoeritrocíticos, que crescem em células endoteliais reticulares e podem estar presentes em todos os órgãos em hospedeiros suscetíveis (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Estudos fornecem evidências de que os danos causados aos órgãos por linhagens comuns de hemosporídeos causam doença e até mesmo mortalidade em aves (DINHOPL et al., 2015; ILGŪNAS et al., 2016; PALINAUSKAS et al., 2016). Dessa forma, a grande alocação de espécies no tiê-preto chama a atenção, uma vez que esta ave pode atuar como reservatório e facilitar a transmissão para outras espécies de aves, que podem ser sensíveis ao parasito.

A delimitação de espécies por métodos que utilizam algoritmos computacionais pode ser uma excelente ferramenta para a taxonomia integrativa de hemosporídeos aviários, e pode ser valiosa para estudos de diversidade, distribuição e ajudar na identificação de espécies crípticas. O grande número de sequências do gene *cytb* desses parasitos, depositadas nos bancos de dados, forma um verdadeiro código de barras de DNA para o grupo. Devido a controvérsias na classificação dos hemosporídeos e ao fato de maioria das sequências não estarem atribuídas a espécies morfológicas, esses métodos podem ajudar na inferência de unidades taxonômicas significativas, pois são facilmente aplicados a uma grande variedade de organismos (KAPLI et al., 2017). Além disso, pode representar a única abordagem viável para estimativas de biodiversidade, a qual parece ser impossível de inferir em estudos macroecológicos da vida selvagem. Estudos sugerem que os métodos de código de barras de *locus* único fornecem agrupamentos significativos, próximos a espécies reconhecidas taxonomicamente, o que os torna úteis para estudos aproximados de estimativa de espécies ou quando uma pesquisa sistemática mais minuciosa é praticamente impossível (MONAGHAN et al., 2009; ESSELSTYN et al., 2012; RATNASINGHAM; HEBERT, 2013; TANG et al., 2014; KAPLI et al., 2017).

Neste trabalho, estimamos a diversidade de hemosporídeos em uma ave endêmica da América do Sul e a distribuição das supostas espécies encontradas nessa ave e em outras aves pelo mundo. Mesmo que o método utilizado tenha sido *lumper*, a diversidade encontrada é alta, o que não deve ser negligenciado visto que o tiê-preto foi um caso específico que pode

estar acontecendo em toda Mata Atlântica. Dessa forma, estudos que comparem métodos de delimitação computacional podem ajudar no aperfeiçoamento dos resultados e trazer novas perspectivas para a taxonomia integrativa de parasitos hemospórideos, que é de grande importância para a implementação de programas de conservação.

4.5 CONCLUSÕES

1. A prevalência e a diversidade de hemossporídeos é alta na população de *Tachyphonus coronatus* da Mata Atlântica de Minas Gerais.
2. A prevalência manteve-se alta na estação seca e na estação chuvosa, mostrando que a sazonalidade não influenciou na taxa de infecção por hemossporídeos na população de *T. coronatus*.
3. A intensidade parasitária foi influenciada pelo sexo dos hospedeiros, sendo maior nas fêmeas de *T. coronatus*.
4. Linhagens de *Plasmodium lutzi* e *P. nucleophilum* são bem difundidas nas aves da região mostrando baixa especificidade pelo hospedeiro.
5. O método de delimitação computacional (MPTP) sugere que 6 espécies de *Plasmodium* e uma espécie de *Haemoproteus* estão presente na população de *T. coronatus*.
6. A delimitação de espécies por métodos que utilizam algoritmos computacionais pode ser uma excelente ferramenta para a taxonomia integrativa de hemossporídeos aviários, e pode ser valiosa para estudos de diversidade, distribuição e ajudar na identificação de espécies crípticas.

CAPÍTULO III

5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Haemoproteus* sp. EM PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS

RESUMO

Haemoproteus spp. são protozoários (Haemosporida: Apicomplexa) amplamente encontrados nas aves pelo mundo. A identificação destes parasitos é realizada principalmente com base nos caracteres morfológicos dos gametócitos visualizados nos esfregaços sanguíneos dos hospedeiros vertebrados e com base nos caracteres moleculares do gene mitocondrial citocromo b. No entanto, a ausência de merogonia eritrocítica, a alta variação genética intraespecífica e a especiação críptica apresentada por parasitos deste grupo torna essencial o uso da maior quantidade de caracteres para a identificação das espécies. Dessa forma, análises microscópicas e moleculares foram utilizadas para verificar a ocorrência e identificar espécies de *Haemoproteus* em aves da Mata Atlântica de Minas Gerais. Entre as 37 aves analisadas da espécie *Tangara sayaca*, somente um espécime estava parasitado por *Haemoproteus* sp. e dentre as 15 aves da espécie *Zonotrichia capensis*, dois espécimes estavam parasitados por *Haemoproteus* sp. Os caracteres dos gametócitos encontrados nas duas espécies aviárias apresentaram similaridades morfológicas com os gametócitos de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *coatneyi*. Foram obtidas três sequências de *Haemoproteus* sp., duas a partir de *Z. capensis* e uma de *T. sayaca*. Essas sequências se agruparam com linhagens de *H. coatneyi*. Portanto, as duas obtidas de *Z. capensis* estão intimamente relacionadas com linhagens da morfoespécie *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *erythrogravidus*, as quais surgiram como um grupo interno no clado de *H. coatneyi*. A divergência genética entre as linhagens de ambas morfoespécies é extremamente baixa para afirmar que elas são diferentes filogeneticamente. Dessa forma, os dados morfológicos, moleculares e os dados históricos da distribuição e especificidade sugerem que as espécies de *Haemoproteus* encontradas nas aves do presente estudo são *H. coatneyi*. No entanto, informações do gene nuclear ou do gene do apicoplasto, assim como, dados experimentais podem ser avaliados futuramente para melhor elucidar a taxonomia de *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus*.

Palavras-chave: Aves, hemosporídeos, morfologia, gene *cytb*, divergência genética, filogenia.

ABSTRACT

Haemoproteus spp. are protozoa (Haemosporida: Apicomplexa) widely found in birds around the world. The identification of these parasites is performed mainly based on the morphological characters of the gametocytes visualized in the blood smears of the vertebrate hosts and based on the molecular characteristics of the mitochondrial cytochrome b gene. However, the absence of erythrocytic merogony, the high intraspecific genetic variation and the cryptic speciation presented by parasites of this group makes it essential to use the largest number of characters to identify the species. Thus, microscopic and molecular analyzes were used to verify the occurrence and to identify *Haemoproteus* species in birds of the Atlantic Forest of Minas Gerais. Among the 37 analyzed birds of the species *Tangara sayaca*, only one individual was parasitized by *Haemoproteus* sp. and among the 15 birds of the species *Zonotrichia capensis*, two specimens were parasitized by *Haemoproteus* sp. The gametocyte characters found in the two avian species presented morphological similarities with the *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *coatneyi* gametocytes. Three *Haemoproteus* sp. sequences were obtained, two from *Z. capensis* and one from *T. sayaca*. These sequences grouped with *H. coatneyi* lineages. Therefore, the two lineages obtained from *Z. capensis* are closely related to lineages of morphospecies *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *erythrogravidus*, which emerged as an internal group in the *H. coatneyi* clade. The genetic divergence between the lineages of both morphospecies is extremely low to state that they are phylogenetically different. Thus, the morphological, molecular and historical data of the distribution and specificity leads us to the assumption that the *Haemoproteus* species found in the birds of the present study are *H. coatneyi*. However, information from either the nuclear gene or the apicoplast gene, as well as experimental data may be evaluated in the future to better elucidate the taxonomy of *H. coatneyi* and *H. erythrogravidus*.

Keywords: Avian, haemosporidian, morphology, *cytb* gene, genetic divergence, phylogeny.

5.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Haemoproteus* pertence à ordem Haemosporida e constitui mais de 140 espécies de protozoários que são encontrados em aves em todas as regiões geográficas do mundo (GARNHAM, 1966; DIMITROV et al., 2014). O ciclo biológico dos parasitos deste gênero é heteroxeno, no qual a fase assexuada ocorre em células teciduais e eritrócitos do hospedeiro vertebrado e a fase sexuada ocorre em dípteros hematófagos (GARNHAM, 1966).

Tradicionalmente, a história de vida, a morfologia e a classificação dos hemosporídeos aviários foram estudadas usando microscopia de luz. E o grupo dos hospedeiros vertebrados levou à divisão do gênero *Haemoproteus* em dois subgêneros, *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* (GARNHAM, 1966). Dessa forma, os parasitos encontrados em aves da ordem Columbiformes foram classificados como pertencentes do subgênero *Haemoproteus* e os parasitos das demais ordens de aves foram incluídos no subgênero *Parahaemoproteus* (VALKIŪNAS, 2005). Com a adoção de métodos moleculares, estudos filogenéticos apoiaram a hipótese de que tais subgêneros seriam divididos conforme as espécies dos vetores de *Haemoproteus* spp. (MARTINSEN et al., 2008) e atualmente, as espécies parasitárias transmitidas por moscas da família Hippoboscidae são colocadas no subgênero *Haemoproteus* e àquelas transmitidas por mosquitos da família Ceratopogonidae (mosquitos-pólvora) são classificadas no subgênero *Parahaemoproteus* (SANTIAGO-ALARCON et al., 2010).

Dessa forma, a principal forma de identificação das espécies de hemosporídeos passou a ser feita baseada na caracterização morfológica dos estágios sanguíneos, encontrados no hospedeiro vertebrado, e na caracterização molecular das espécies, concomitantemente (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018). No entanto, existem obstáculos que influenciam e dificultam a identificação correta destes hemoparasitos. No gênero *Haemoproteus*, a descrição morfológica fica restrita aos caracteres dos gametócitos, uma vez que as espécies deste grupo não fazem merogonia eritrocítica, ao contrário do grupo irmão *Plasmodium*, no qual a identificação das espécies pode se beneficiar com caracteres dos estágios eritrocíticos: trofozoítos, esquizontes e gametócitos (GARNHAM, 1966).

Muitas espécies de *Haemoproteus*, além de apresentarem poucos caracteres para diferenciação morfológica, são extremamente semelhantes e isso dificulta a identificação, principalmente em casos de espécies crípticas (DIMITROV et al., 2016). A boa qualidade dos esfregaços sanguíneos e a forma como ele é produzido são fatores cruciais para uma caracterização morfológica correta. Segundo Valkiūnas (2005), os esfregaços sanguíneos devem ser finos e as células sanguíneas devem formar uma camada uniforme para que se diminua a possibilidade de deformação dos parasitos e de suas células hospedeiras. Além disso, os esfregaços devem ser feitos diretamente do sangue do animal vivo, pois ao serem expostos ao ar, os gametócitos maduros de *Haemoproteus* podem mudar de forma rapidamente, e se isso não for levado em consideração, a identificação das espécies não será confiável (VALKIŪNAS, 2005). Outro problema para a descrição morfológica é a baixa intensidade parasitária, comum em aves silvestres que impossibilita a diferenciação das espécies (DIMITROV et al., 2016).

A implementação de métodos moleculares para detecção e identificação de hemosporídeos tornou-se referência e revelou uma diversidade genética considerável complementando a taxonomia tradicional (BENSCH et al., 2000, 2004; PERKINS; SCHALL, 2002; RICKLEFS; FALLON, 2002; BEADELL et al., 2004; HELLGREN et al., 2004; WALDENSTRON et al., 2004; MARTINSEN et al., 2008; CLARK et al., 2014). O gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) é o marcador molecular mais utilizado nas análises moleculares e é baseado nesse gene que uma quantidade enorme de linhagens de hemosporídeos tem sido descoberta, o que levou a criação de um banco de dados somente

para hemosporídeos aviários, o MalAvi *database* (BENSCH et al., 2009). Informações sobre a diversidade e distribuição das linhagens do *cytb* podem ser acessadas neste banco de dados e, na maioria dos estudos, o gene tem revelado resultados satisfatórios corroborando a morfologia das espécies e evidenciando espécies crípticas (BENSCH et al., 2009; VALKIŪNAS et al., 2010; OUTLAW; RICKLEFS, 2014; CLARK et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015).

De acordo com estudos que compararam a resolução de caracteres morfológicos, genes mitocondriais e nucleares em espécies de *Haemoproteus*, a diversidade observada no gene *cytb* mostrou ser representativa do nível de diferenciação em todo o genoma (BENSCH et al., 2004; HELLGREN et al., 2007). Assim, para que não houvesse subestimação ou superestimação da diversidade de espécies de hemosporídeos, foi proposto que linhagens com divergência genética no *cytb* acima de 5% seriam consideradas novas espécies, pois estas são tipicamente distintas morfológicamente (HELLGREN et al., 2007). No entanto, há exemplos bem estabelecidos de espécies descritas morfológicamente que diferem em apenas 1% ou menos (HELLGREN et al., 2007; LEVIN et al., 2012; OUTLAW; RICKLEFS, 2014). Em contrapartida, existem muitos exemplos de variação do gene *cytb* intraespecífico dentro das mesmas morfoespécies de hemosporídeos aviários (VALKIŪNAS et al., 2007; IEZHOVA et al., 2011; GONZALEZ et al., 2015).

A variação na distância de múltiplas linhagens genéticas de uma única espécie é comumente observada em *Haemoproteus* podendo indicar variação intraespecífica ou especiação críptica (CLARK et al., 2015). Dessa forma é extremamente importante combinar métodos moleculares e análises microscópicas para verificar a posição filogenética e evidenciar os detalhes na morfologia dos gametócitos destes hemoparasitos (NILSSON et al., 2016). O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência e a parasitemia de infecção de *Haemoproteus* spp. em aves silvestres de um fragmento de Mata Atlântica em Minas Gerais, bem como, fazer a caracterização morfológica e molecular dos parasitos encontrados. Além disso, uma ferramenta computacional de delimitação de espécies foi utilizada com objetivo de adicionar informações para auxiliar na descrição das espécies encontradas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo e coleta de sangue

As aves foram capturadas entre os anos de 2013 e 2015 em fragmentos de Mata Atlântica na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. Os locais de captura foram: Sítio Paraíso da Barra, Chácara, 21.68' S, 43.22' W, elevação de 796 m; Sítio Vista Alegre, Juiz de Fora, 21. 48' S, 43. 15' W, elevação de 494m; Granja Passarada, Juiz de Fora, 21. 48' S, 43. 19' W, elevação de 615m; Jardim Botânico/UFJF, Juiz de Fora, 21. 43' S, 43. 22 W, elevação de 715m e Fazenda Volta Grande/Santa Bárbara do Monte Verde, 21. 58' S, 43. 41' W, elevação de 798m. Foram utilizadas redes de neblinas para a captura e anilhas para marcação das aves. Todas as aves capturadas foram pesadas e medidas. A identificação das espécies de aves foi feita de acordo com Ridgely et al. (2009) e Sigrist (2014) com base em análises morfométricas e características fenotípicas, como tamanho, cor da plumagem, morfologia do bico e pernas. Esfregaços de sangue das espécies *Arremon semitorquatus*, *Zonotrichia capensis*, *Ammodramus humeralis* da família Passerellidae e *Tangara sayaca* da família Thraupidae, foram feitos diretamente do sangue extravasado pela punção da veia braquial. Aproximadamente 30µl de sangue (ou volume de sangue representando 1% do peso vivo do animal) foram colocados em microtubos sem anticoagulantes e acondicionados em gelo até serem armazenados em freezer a -20°C, no laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Juiz de Fora. Após os procedimentos de amostragem, as aves foram liberadas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Juiz de Fora (protocolo nº 042/2012) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 29268-3 e 29268-4).

5.2.2 Análises microscópicas, morfológicas e morfométricas

A preparação dos esfregaços sanguíneos e as análises microscópicas foram realizadas da mesma forma que foi apresentada nos tópicos 3.2.2 e 3.2.3 do Material e Métodos, CAPÍTULO I. O software de imagem Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, São Paulo, Brasil) foi usado para realizar a análise morfométrica dos gametócitos de acordo com Valkiūnas (2005).

5.2.3 Extração de DNA

O DNA total de 20 µl de amostra de sangue de cada ave foi extraído usando um Kit de Purificação Wizard® Genomic DNA (Promega®, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop ND-2000 ® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A concentração de DNA total foi padronizada para 100ng/uL e armazenadas a -20°C para posterior amplificação por PCR.

5.2.4 Detecção Molecular

A partir das extrações, fragmentos de 618 pb do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) dos parasitos hemosporídeos foram amplificados por meio de *nested* PCR. Na primeira reação foram utilizados os “primers” HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') para amplificar espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (HELLGREN et al., 2004). A reação

foi realizada em volume final de 25µL, contendo: 12,5µL de 1X de Go Taq® Green Master Mix (Promega, MA, EUA), 2,5µL de água ultra-pura, 2,5µL de cada “primer” na concentração de 10µM e 5µL de DNA genômico (20–100ng). Na segunda reação foram utilizados os “primers” HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 525pb do gene *cytb* de *Plasmodium/Haemoproteus* (BENSCH et al., 2000). A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo: 12,5µL de 1X de Go Taq® Green Master Mix, 1 µL de cada “primer” na concentração de 10µM e 2µL do produto da primeira reação. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, e extensão final em 72°C por 10 minutos por 35 ciclos para ambas as reações. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brasil) para visualização sob luz ultravioleta.

5.2.5 Sequenciamento

Os produtos amplificados na segunda reação de PCR foram purificados com o auxílio do Kit QIAquick® Purification (Qiagen®, São Paulo, Brasil), e submetidos ao sequenciamento bidirecional com os iniciadores HaemF/HaemR2 (BENSCH et al. 2000), no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante.

5.2.6 Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando um conjunto de dados contendo duas sequências do gene *cytb* de hemosporídeos obtidas de *Zonotrichia capensis* e uma sequência de *Tangara sayaca* obtidas neste trabalho, juntamente com 74 sequências atribuídas a morfoespécies de *Haemoproteus*, incluindo todas as linhagens de *Haemoproteus coatneyi* e *Haemoproteus erythrogravidus* disponíveis no banco de dados MalAvi (MalAvi, julho de 2018; BENSCH et al., 2009). As espécies *Leucocytozoon buteonis*, *L. fringillinarum* e *L. quynzae* foram utilizados como grupo externo. As sequências foram alinhadas no software MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013) utilizando a configuração padrão e, em seguida, o alinhamento foi inspecionado visualmente. Após a remoção de sítios pobremente alinhados com *Gblocks server* (CASTRESANA, 2000), obteve-se uma matriz com 479 pares de bases (pb). A inferência da filogenia de *Haemoproteus* foi conduzida sob probabilidade de Máxima Verossimilhança (ML) conforme implementado no programa RaxML versão 8.2.X (STAMATAKIS, 2014), usando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (TAVARÉ, 1986; YANG 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição no JmodelTest implementado no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). A sustentação do clado foi avaliada utilizando algoritmo de *rapid bootstrap* implementado no programa RaxML (STAMATAKIS et al., 2014), o qual estimou para este *dataset* 500 pseudo-réplicas. A inferência da filogenia de *Haemoproteus* spp. foi também realizada por meio da análise de Inferência Bayesiana (BI) utilizando o programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012). Duas corridas independentes de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) compostas cada uma, de uma cadeia fria e 3 quentes foram realizadas ao longo de 5 milhões de gerações aplicando-se ao final um “*burn-in*” de 25% (25% das primeiras árvores geradas foram descartadas da análise). As árvores resultantes foram sumarizadas para a inferência topológica e das probabilidades posteriores em cada agrupamento. As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.4.4. Para cálculo da divergência genética entre as sequências

obtidas no presente estudo e outras já depositadas em bancos de dados foi utilizado o programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

5.2.7 Delimitação de espécies

O status taxonômico das linhagens obtidas no presente estudo foi avaliado pelo método computacional de delimitação de espécie Multi-rate Poisson Tree Process (MPTP) (KAPLI et al., 2017). O conjunto de dados utilizados para inferir a filogenia de *Haemoproteus* spp. contém todas as sequências longas (>430bp) do gene *cytb* de linhagens desse gênero depositadas no MalAvi, juntamente com as novas sequências produzidas no presente estudo, totalizando 988 sequências (03 do presente estudo e 985 já disponíveis no MalAvi, acesso em julho de 2018). As espécies *L. buteonis*, *L. fringillinarum*, *L. quynzae*, foram escolhidas como grupo externo. As sequências foram alinhadas no programa MAFFT (KATOHI et al., 2017) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após a remoção de sítios pobremente alinhados no *Gblocks server* (TALAVERA; CASTRESANA, 2007), uma matriz com 479 pb foi obtida. A inferência da filogenia foi conduzida sob análise de Máxima Verossimilhança (ML) implementada no programa RaxML versão 8.2.X (STAMATAKIS, 2014), utilizando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição por meio do algoritmo JmodelTest implementado na plataforma MEGA7 (KUMAR et al., 2016). A estimativa de delimitação específica foi conduzida no servidor online do programa MPTP (disponível em, <http://mptpt.h-its.org>), utilizando como *input* a filogenia obtida no programa RaxML, com remoção do grupo externo e opções padrão do programa.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Prevalência e intensidade de infecção

Foram examinados esfregaços sanguíneos de 37 aves da espécie *Tangara sayaca*, da família Thraupidae e de 28 aves das espécies *Ammodramus humeralis* (01), *Arremon semitorquatus* (12) e *Zonotrichia capensis* (15) pertencentes à família Passerellidae. Os valores de prevalência e parasitemia para *Haemoproteus* spp. estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência e parasitemia de *Haemoproteus* spp. em aves das famílias Thraupidae e Passerellidae da Mata Atlântica de Minas Gerais.

| Família | Thraupidae | Passerellidae |
|---------------------------|------------|---------------|
| Número de aves examinadas | 37 | 28 |
| Número de aves infectadas | 01 | 03 |
| Prevalência (%) | 2,7 | 10,7 |
| Parasitemia (mín – máx) | 0,04 | 0,15 – 0,36 |

Mín = menor parasitemia encontrada naquela família de ave; máx = maior parasitemia encontrada naquela família de ave.

5.3.2 Caracterização morfológica e morfométrica de *Haemoproteus* spp. em *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis* (1) e (2)

O exame microscópico e a boa qualidade dos esfregaços sanguíneos possibilitaram a confirmação de infecção única de *Haemoproteus* sp. em uma ave da espécie *Tangara sayaca* (Figura 1) e em duas aves da espécie *Zonotrichia capensis* (Figura 2 e 3). Além disso, todos os macrogametócitos e microgametócitos encontrados em uma mesma lâmina apresentaram o mesmo tom de coloração e características semelhantes. Os esfregaços foram feitos em dias em que a umidade relativa do ar estava baixa, o que favoreceu a sua secagem rápida. Os principais caracteres para identificação dos gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em *T. sayaca* e em *Z. capensis* estão apresentados na Tabela 2 e as medidas morfométricas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2. Caracterização dos gametócitos jovens, macrogametócitos e microgametócitos de *Haemoproteus* spp. em *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis* (1) e (2) da Mata Atlântica de Minas Gerais.

| Características | <i>T. sayaca</i> | <i>Z. capensis</i> (1) | <i>Z. capensis</i> (2) |
|--|------------------|------------------------|------------------------|
| Gametócitos jovens | Figura 1 | Figura 2 | Figura 3 |
| <i>Formas jovens aderidas lateralmente ao núcleo do eritrócito, crescendo em direção aos polos</i> | a, b, c, d | a, b, c, d | – |

Continuação

| Características | <i>T. sayaca</i> | <i>Z. capensis</i> (1) | <i>Z. capensis</i> (2) |
|--|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Crescimento longitudinal e lateral preenchendo o lado do eritrócito infectado, formato halteridial</i> | a, b | b, c, d | – |
| <i>No citoplasma do parasito surge um espaço vazio e longitudinal, exatamente onde ele adere à lateral do eritrócito, dando ideia de “constricção”</i> | c, d | b, c, d | – |
| <i>Presença de pequenos vacúolos no citoplasma</i> | a,b, c | – | – |
| Macrogametócitos | | | |
| <i>Crescem longitudinalmente até as extremidades do eritrócito, aderidos ao núcleo e à membrana do eritrócito. Formato alongado e curvado (halteridial).</i> | f, g, h, i, j | e, h, i, j | b, c, g, h |
| <i>Podem deslocar o núcleo do eritrócito lateralmente e ocupar 80% do eritrócito</i> | f, g, i | i | g, h |
| <i>Apresentam um espaço vazio longitudinal na parte central dando ideia de constricção (formato de halter)</i> | – | f, g | e |
| <i>Causam protrusões semelhantes a balões no lado do eritrócito não invadido (formato gravídico)</i> | F | i | f |
| <i>Núcleo do parasito compacto, redondo ou oval e situa-se na porção central para subterminal do parasito</i> | g, h, i, j | e, f, h, i, j | c, d, e, g, h |
| <i>Grânulos de pigmento, redondos ou ovais, distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma, coloração marrom escuro</i> | e, f, g, h, | e, f, g, i | f |
| <i>Citoplasma com coloração azulada e granular nos gametócitos de um mesmo esfregaço, sem grânulos de volutina</i> | g, h, j, k | h, i, j | f, g, h |
| <i>Crescem longitudinalmente aderidos ao núcleo e a membrana do eritrócito. Formato alongado e curvado (halteridial).</i> | m, o, p | k, m, o, p | i, j, m, n, p |

Continuação

| Características | <i>T. sayaca</i> | <i>Z. capensis</i> (1) | <i>Z. capensis</i> (2) |
|--|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Deslocam o núcleo do eritrócito lateralmente e podem ocupar de 90% até 100% do eritrócito</i> | l, m, n, o | m, o, p | k, o, p |
| <i>Tendência em formar protruções semelhantes a balões no lado do eritrócito não invadido (formato gravidício)</i> | o, p | l, o | l, n, p |
| <i>Grânulos de pigmentos arredondados distribuídos aleatoriamente ou agrupados nas extremidades do parasito</i> | l, m, n, o | k, l, m, o | l, j, n, o |
| <i>Citoplasma granular e com coloração clara nos gametócitos de um mesmo esfregaço, sem grânulos de volutina</i> | m, n, o, p | k, l, m, p | i, k, n, o |
| <i>Presença de vacúolos no citoplasma</i> | – | n | m |
| <i>Não foi possível distinguir o núcleo dos parasitos</i> | l-p | k-p | i-p |

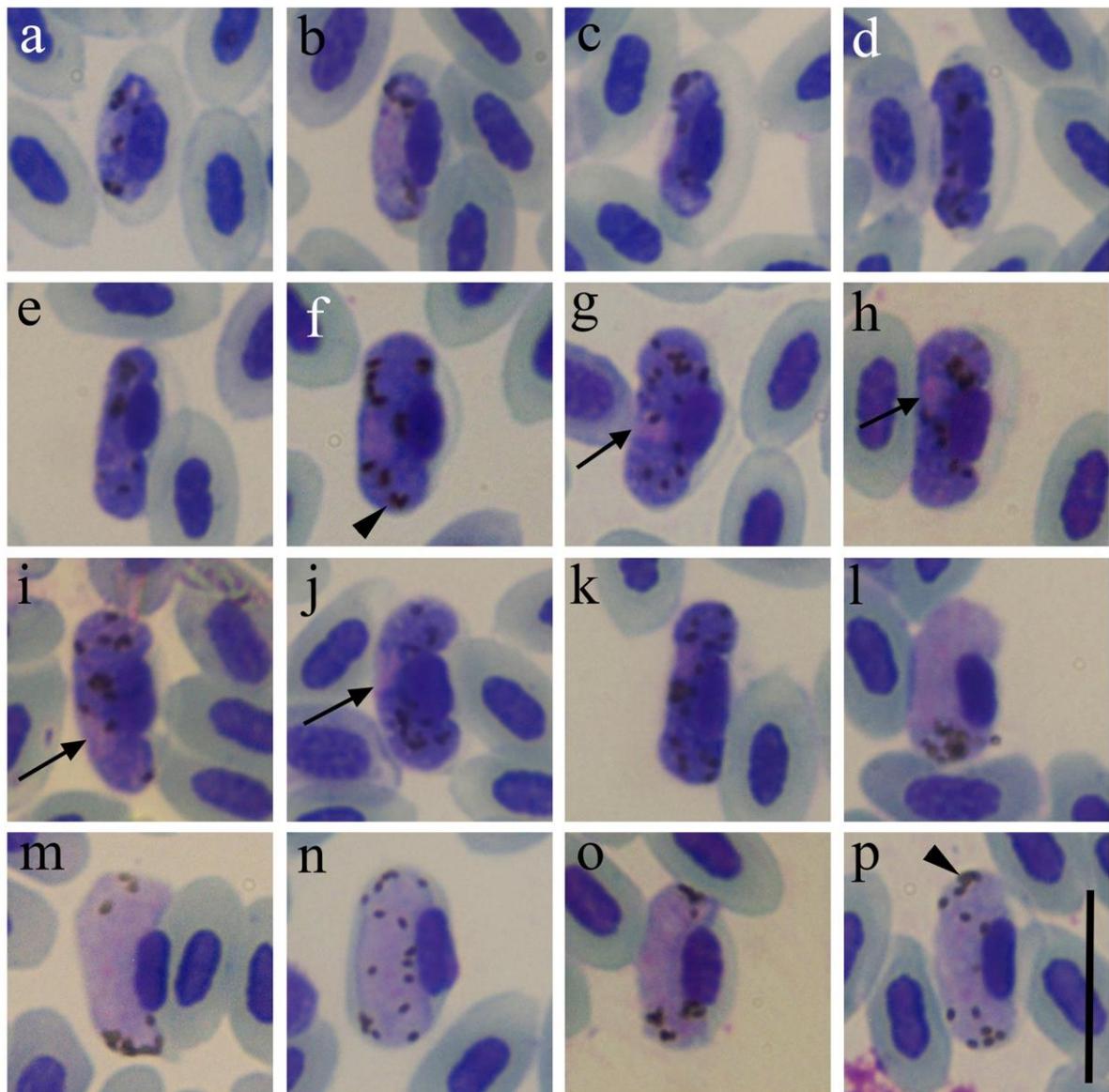


Figura 1. Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Tangara sayaca* de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens e em crescimento (a–d); macrogametócitos (e–k); microgametócitos (l–p). Setas indicam o núcleo dos parasitos; cabeças de setas indicam grânulos de pigmentos. Barra = 12 μ m.

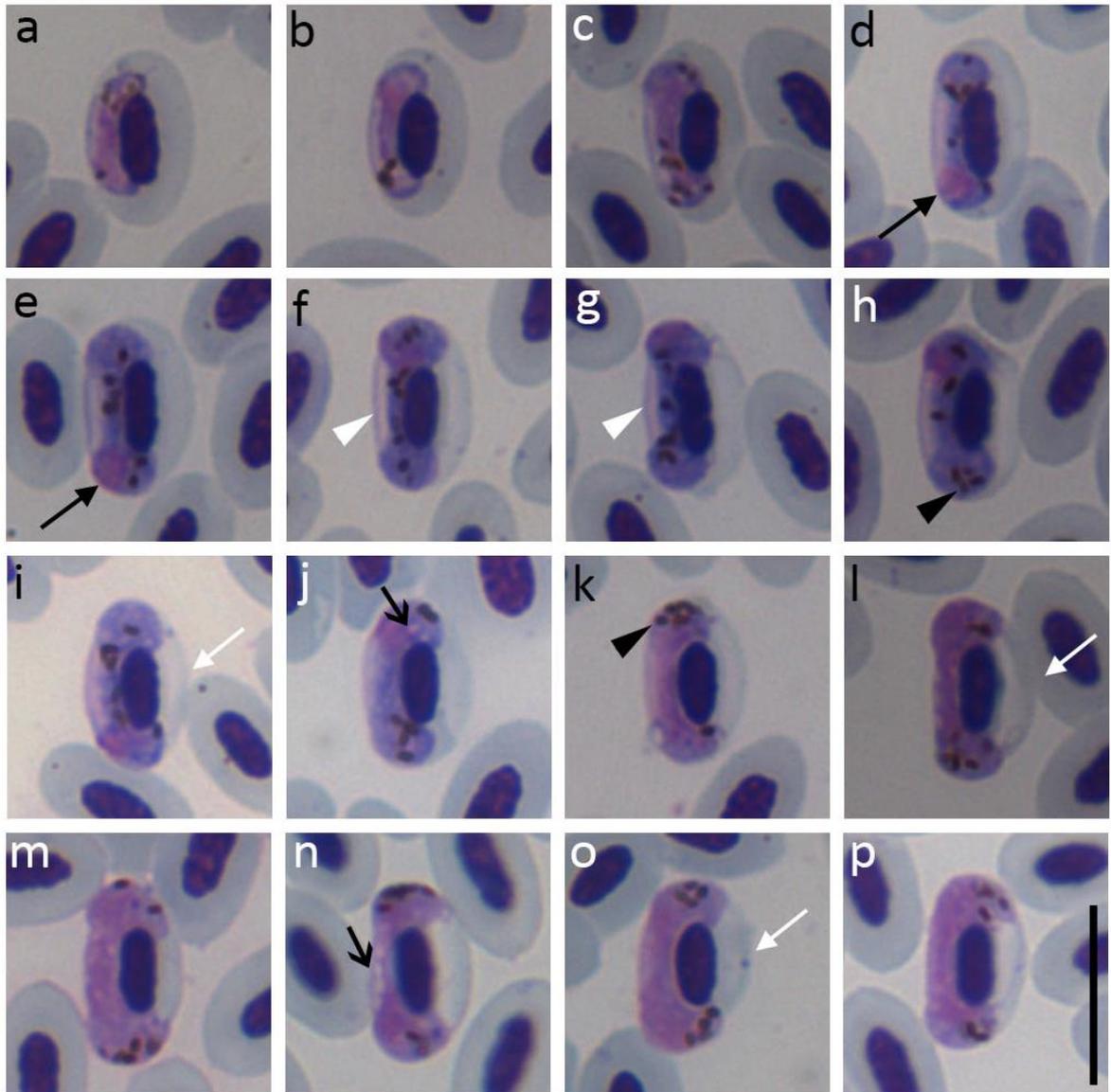


Figura 2. Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Zonotrichia capensis* (1) de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens (a–d); macrogametócitos (e–j); microgametócitos (k–p). Seta preta indica o núcleo do parasito; cabeças de setas pretas indicam grânulos de pigmentos. Setas pretas com cabeça aberta indicam vacúolos. Setas brancas indicam protrusões formadas nos eritrócitos infectados, cabeças de setas brancas indicam atenuação na parte central dos gametócitos. Barra = 11 μ m.

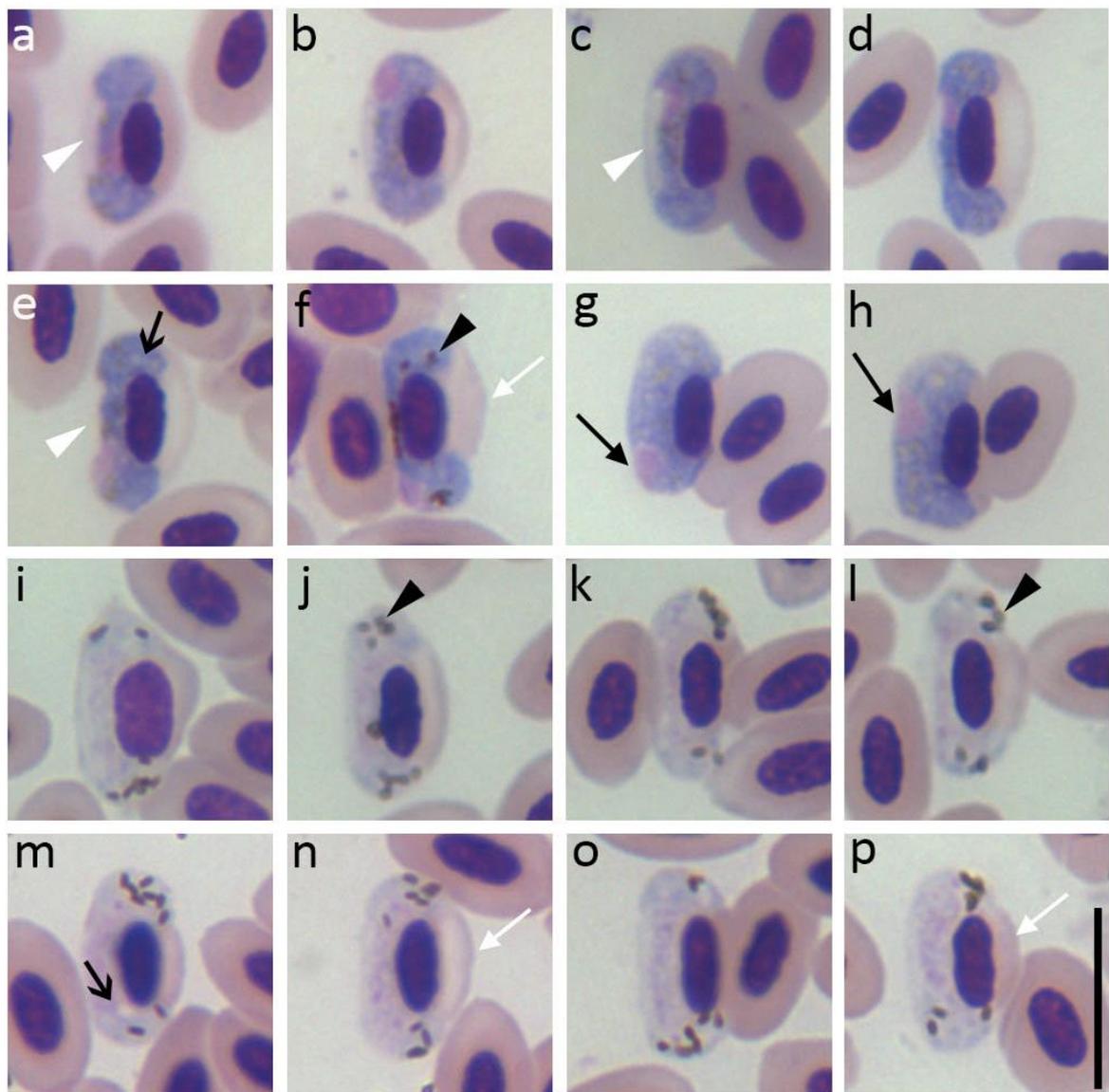


Figura 3. Gametócitos de *Haemoproteus* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Zonotrichia capensis* (2) de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil. Gametócitos jovens (a–d); macrogametócitos (e–j); microgametócitos (k–p). Seta preta indica o núcleo do parasito; cabeças de setas pretas indicam grânulos de pigmentos. Setas pretas com cabeça aberta indicam vacúolos. Setas brancas indicam protrusões formadas nos eritrócitos infectados, cabeças de setas brancas indicam atenuação na parte central dos gametócitos. Barra = 11 μ m.

Tabela 3. Morfometria comparativa dos eritrócitos dos hospedeiros e gametócitos de *Haemoproteus* sp. de *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis*.

| Características | <i>T. sayaca</i> | <i>Z. capensis</i> |
|--|-------------------------|-------------------------|
| | <i>Haemoproteus</i> sp. | <i>Haemoproteus</i> sp. |
| | Medidas | |
| Eritrócitos não infectados | <i>n</i> = 21 | <i>n</i> = 21 |
| Comprimento | 10.9–13 (11.9 ± 0.5) | 10.1–11.9 (11 ± 0.5) |
| Largura | 6–7.1 (6.3 ± 0.3) | 5.6–6.7 (6.2 ± 0.3) |
| Área | 53.6–71.6 (60.9 ± 3.8) | 46.7–60.6 (55.2 ± 3.7) |
| Núcleo dos eritrócitos não infectados | | |
| Comprimento | 5.3–6.4 (5.8 ± 0.3) | 5.1–6.1 (5.6 ± 0.3) |
| Largura | 2.3–3.1 (2.6 ± 0.2) | 2.4–3.1 (2.7 ± 0.2) |
| Área | 11.6–15.3 (13.4 ± 1) | 11.6–14.2 (13.1 ± 0.8) |
| Macrogametócitos | <i>n</i> = 21 | <i>n</i> = 21 |
| Eritrócitos infectados | | |
| Comprimento | 11.2–13.3 (12.4 ± 0.5) | 11–13 (11.8 ± 0.5) |
| Largura | 4.7–7.1 (5.9 ± 0.6) | 5–7.4 (6.4 ± 0.7) |
| Área | 54.1–74.1 (63.4 ± 6.1) | 52.7–72.1 (64.2 ± 5.2) |
| Núcleo dos eritrócitos infectados | | |
| Comprimento | 4.4–5.7 (5.1 ± 0.3) | 5.1–6.1 (5.6 ± 0.3) |
| Largura | 1.7–2.7 (2.3 ± 0.2) | 2.3–3.6 (2.7 ± 0.3) |
| Área | 9.1–12.8 (10.4 ± 1.1) | 10.5–17 (12.8 ± 1.3) |
| Gametócitos | <i>n</i> = 21 | <i>n</i> = 21 |
| Comprimento | 11.4–15 (13.1 ± 1.1) | 11.4–14.1 (12.9 ± 0.7) |
| Largura | 1.5–3.2 (2.1 ± 0.4) | 0.9–2.1 (1.4 ± 0.3) |
| Área | 30.8–50.6 (36.8 ± 5.9) | 26.3–37.8 (31.7 ± 3.8) |
| Núcleo dos gametócitos | | |
| Comprimento | 1.3–3.3 (2.2 ± 0.5) | 1.3–3 (2.2 ± 0.4) |
| Largura | 0.7–2.0 (1.2 ± 0.3) | 0.8–1.9 (1.4 ± 0.3) |
| Área | 1.4–4.9 (2.8 ± 0.9) | 1.5–4.1 (2.8 ± 0.8) |
| No. Grânulos de pigmentos | 9–17 (13 ± 2.7) | 8–14 (11 ± 1.6) |
| NDR ^b | 0.4–1 (0.8 ± 0.2) | 0.8–1.3 (1 ± 0.1) |
| Microgametócitos | <i>n</i> = 21 | <i>n</i> = 21 |
| Eritrócitos infectados | | |
| Comprimento | 11.7–13.4 (12.6 ± 0.5) | 11.1–12.9 (12 ± 0.5) |
| Largura | 5.1–7.7 (6.4 ± 0.8) | 6–7.7 (6.8 ± 0.4) |
| Área | 52.5–78.9 (67.4 ± 7.5) | 56.6–74 (65.8 ± 4.2) |
| Núcleo dos eritrócitos infectados | | |
| Comprimento | 5.1–6 (5.5 ± 0.3) | 5.2–6.1 (5.7 ± 0.3) |

Continuação

| Características | <i>T. sayaca</i> | <i>Z. capensis</i> |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>Haemoproteus</i> sp. | <i>Haemoproteus</i> sp. |
| | Medidas | |
| Largura | 2.1–3 (2.5 ± 0.2) | 2.5–3.7 (2.9 ± 0.3) |
| Área | 10.9–13.7 (12.3 ± 0.7) | 11.1–16.9 (13.7 ± 1.5) |
| Gametócitos | <i>n</i> = 21 | <i>n</i> = 21 |
| Comprimento | 12.3–14.9 (13.4 ± 0.8) | 12.9–15.4 (14.2 ± 0.9) |
| Largura | 1.7–4.3 (2.9 ± 0.8) | 2.5–3.7 (2.9 ± 0.3) |
| Área | 31.1–54 (43.9 ± 6.6) | 30–44.1 (36.5 ± 3.9) |
| Núcleo dos gametócitos | — | — |
| Comprimento | — | — |
| Largura | — | — |
| Área | — | — |
| No. Grânulos de pigmentos | 9–16 (12.2 ± 2.1) | 7–13 (9.7 ± 1.8) |
| NDR ^b | 0–0.9 (0.4 ± 0.2) | 0.7–1.2 (0.9 ± 0.1) |

^a Todas as medidas estão dadas em micrômetros, exceto para a característica “Número de grânulos de pigmentos”. ^bNDR (*Nucleus Displacement Ratio*) Taxa de deslocamento do núcleo, de acordo com Bennett e Campbell (1972). Valores mínimos e máximos são fornecidos seguidos pela média aritmética e desvio padrão em parênteses.

5.3.3 Linhagens do gene citocromo b (*cytb*) e reconstrução filogenética

Foram obtidas três linhagens de *Haemoproteus* spp., no presente estudo. A linhagem TSJB01 corresponde a morfoespécie descrita em *T. sayaca* (Tabela 2, Figura 1). As linhagens ZCSB01 e ZCSB02 correspondem as morfoespécies descritas em *Z. capensis* (1) e (2), respectivamente (Tabela 2, Figura 1). A análise dos cromatogramas confirmou a presença de infecção única diante da ausência de picos duplos em ambas as direções, *forward* e *reverse*. TSJB01 apresentou 100% de similaridade com a linhagem NEOFAS02, que foi registrada em *Neothraupis fasciata* no Cerrado do Brasil (MalAvi *database*, BENSCH et al., 2009; FECCHIO et al., 2017), esta linhagem não foi atribuída à morfoespécie. A linhagem ZCSB01 apresentou similaridade de 100% com ZOCAP01 linhagem previamente associada à morfoespécie *H. erythrogravidus* (MANTILLA et al., 2016) e a ZCSB02 apresentou 99% de similaridade com ZCSB01 e ZOCAP01, diferenciando apenas em um par de bases.

Na reconstrução filogenética obtida (Figura 4), as linhagens ZCSB01 e ZCSB02 aqui descritas, agruparam com as linhagens ZOCAP01 e ZOCAP14 de *H. erythrogravidus* previamente identificadas em outros estudos. A linhagem TSJB01 ramificou-se próximo a linhagens que são atribuídas à *Haemoproteus coatneyi*. O clado que agrupa as linhagens de *H. erythrogravidus* surgiu como grupo interno a um clado maior que contém as linhagens de *H. coatneyi* (Figura 4).

A divergência genética entre as linhagens do clado maior variou de 0,3% a 3,7% (Figura 4, Tabela 4). A divergência genética máxima entre as linhagens de *H. erythrogravidus* (ZOCAP01, ZOCAP14) incluindo ZCSB01 e ZCSB02 foi de 0,3%. A divergência máxima entre as linhagens de *H. erythrogravidus* é igual a divergência mínima encontrada no clado maior, que agrupa as linhagens de *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus*. Duas linhagens atribuídas à espécie *H. coatneyi* (DENCOR01, ZOCAP08) ficaram de fora deste clado maior, chegando a apresentar divergência genética de 5,0% e 5,3% de TANVAS02, linhagem agrupada com as demais linhagens de *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus* (Figura 4, Tabela 4).

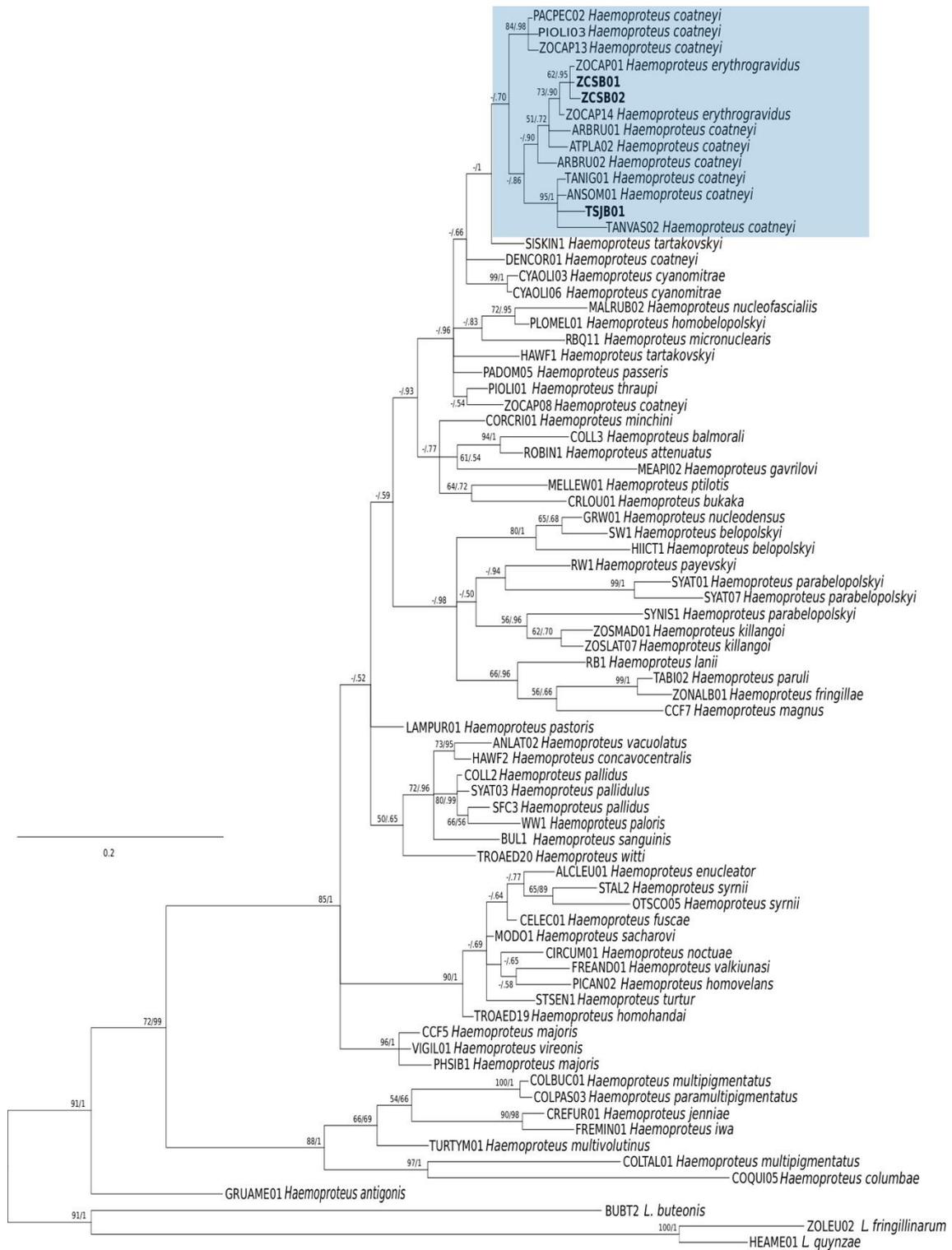


Figura 4. Relações evolutivas entre linhagens das morfoespécies de *Haemoproteus* estimadas pela análise de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*). A topologia representada é da IB. Nós com valores suportes > 50% são indicados próximos aos clados ML/BI, respectivamente. (-) indica valores < 50%. As sequências do presente estudo estão em negrito. *Leucocytozoon* spp. foram usadas como grupo externo. Barra representa 20 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

Tabela 4. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479 pb do gene mitocondrial citocromo b entre as linhagens de *Haemoproteus coatneyi* e *Haemoproteus erythrogravidus* usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito.

| Linhagens | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| 1 <i>H. cyanomitrae</i> (CYAOLI03) | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 <i>H. cyanomitrae</i> (CYAOLI06) | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 <i>H. coatneyi</i> (PACPEC02) | 0.031 | 0.031 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 <i>H. coatneyi</i> (PIOLI03) | 0.028 | 0.028 | 0.003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 <i>H. coatneyi</i> (ZOCAP13) | 0.034 | 0.034 | 0.003 | 0.006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 <i>H. erythrogravidus</i> (ZOCAP01) | 0.041 | 0.041 | 0.022 | 0.025 | 0.025 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 ZCSB01 | 0.041 | 0.041 | 0.022 | 0.025 | 0.025 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 ZCSB02 | 0.041 | 0.041 | 0.022 | 0.025 | 0.025 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 <i>H. erythrogravidus</i> (ZOCAP14) | 0.037 | 0.037 | 0.018 | 0.021 | 0.022 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 <i>H. coatneyi</i> (ARBRU02) | 0.034 | 0.034 | 0.015 | 0.018 | 0.018 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.009 | | | | | | | | | | | | | |
| 11 <i>H. coatneyi</i> (ARBRU01) | 0.034 | 0.034 | 0.022 | 0.025 | 0.025 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.009 | 0.009 | | | | | | | | | | | | |
| 12 <i>H. coatneyi</i> (ATPLA02) | 0.037 | 0.037 | 0.018 | 0.021 | 0.022 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.006 | 0.009 | 0.009 | | | | | | | | | | | |
| 13 <i>H. coatneyi</i> (TANIG01) | 0.028 | 0.028 | 0.024 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.024 | 0.021 | 0.025 | 0.024 | | | | | | | | | | |
| 14 <i>H. coatneyi</i> (ANSOM01) | 0.025 | 0.025 | 0.021 | 0.024 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.021 | 0.018 | 0.021 | 0.021 | 0.003 | | | | | | | | | |
| 15 TSJB01 | 0.031 | 0.031 | 0.028 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.028 | 0.024 | 0.028 | 0.028 | 0.003 | 0.006 | | | | | | | | |
| 16 <i>H. coatneyi</i> (TANVAS02) | 0.037 | 0.037 | 0.034 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.034 | 0.031 | 0.034 | 0.034 | 0.015 | 0.012 | 0.018 | | | | | | | |
| 17 <i>H. thraupi</i> (PIOLI01) | 0.024 | 0.024 | 0.031 | 0.028 | 0.034 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.025 | 0.015 | 0.018 | 0.025 | 0.034 | 0.031 | 0.037 | 0.043 | | | | | | |
| 18 <i>H. coatneyi</i> (ZOCAP08) | 0.028 | 0.028 | 0.034 | 0.031 | 0.037 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.034 | 0.025 | 0.028 | 0.034 | 0.044 | 0.041 | 0.047 | 0.053 | 0.015 | | | | | |
| 19 <i>H. tartakovskyi</i> (SISKIN1) | 0.024 | 0.024 | 0.018 | 0.021 | 0.021 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.025 | 0.021 | 0.021 | 0.025 | 0.028 | 0.025 | 0.031 | 0.031 | 0.024 | 0.028 | | | | |
| 20 <i>H. coatneyi</i> (DENCOR01) | 0.024 | 0.024 | 0.031 | 0.028 | 0.034 | 0.041 | 0.041 | 0.041 | 0.037 | 0.034 | 0.034 | 0.037 | 0.034 | 0.037 | 0.037 | 0.050 | 0.024 | 0.027 | 0.024 | | | |
| 21 <i>H. passeris</i> (PADOM05) | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.025 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.028 | 0.025 | 0.034 | 0.034 | 0.041 | 0.037 | 0.044 | 0.047 | 0.021 | 0.025 | 0.028 | 0.028 | 0.000 | |

5.3.4 Delimitação Computacional das Espécies

O método de delimitação computacional MPTP agrupou em uma única espécie as linhagens obtidas no presente estudo com *H. erythrogravidus* e *H. coatneyi*, e ainda com outras 10 morfoespécies de *Haemoproteus*: *Haemoproteus micronuclearis*, *Haemoproteus nucleofascialis*, *Haemoproteus homobelopolskyi*, *Haemoproteus cyanomitrae*, *Haemoproteus tartakovskiyi*, *Haemoproteus thraupi*, *Haemoproteus fringillae*, *Haemoproteus magnus*, *Haemoproteus passeris* e *Haemoproteus motacillae*.

5.3.5 Hospedeiro aviário e distribuição

As linhagens do presente estudo (ZCSB01, ZCSB02 e TSJB01) e as demais linhagens que agruparam no clado de *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus* estão distribuídas em hospedeiros da ordem Passeriformes do continente americano (Tabela 4).

Tabela 5. Linhagens que foram previamente atribuídas às morfoespécies *Haemoproteus coatneyi* e *H. erythrogravidus**, linhagens do presente estudo (negrito) que agruparam no mesmo clado, seus respectivos hospedeiros e a localidade que os hospedeiros infectados foram capturados.

| Linhagem | Espécie de ave | Localidade |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------|
| PACPEC02 | <i>Caryothraustes canadensis</i> | Guiana |
| | <i>Saltator coerulescens</i> | Guiana |
| | <i>Hemitriccus margaritaceiventer</i> | Brasil |
| | <i>Nemosia pileata</i> | Brasil |
| | <i>Mionectes olivaceus</i> | Equador |
| | <i>Euphonia xanthogaster</i> | Equador |
| | <i>Piranga rubra</i> | Colômbia |
| | <i>Saltator maximus</i> | Equador |
| | <i>Amphispiza bilineata</i> | México |
| | <i>Piranga flava</i> | Estados Unidos |
| PIOLI03 | <i>Piranga olivacea</i> | Colômbia |
| ZOCAP13 | <i>Piranga olivacea</i> | Colômbia |
| | <i>Zonotrichia capensis</i> | Colômbia |
| ZOCAP01* | <i>Zonotrichia capensis</i> | Chile |
| | <i>Zonotrichia capensis</i> | Peru |
| | <i>Zonotrichia capensis</i> | Colômbia |
| | <i>Zonotrichia capensis</i> | Equador |
| | <i>Zonotrichia capensis</i> | Equador |
| ZCSB01 | <i>Zonotrichia capensis</i> | Brasil |
| ZCSB02 | <i>Zonotrichia capensis</i> | Brasil |
| ZOCAP14* | <i>Zonotrichia capensis</i> | Colômbia |
| ARBRU01 | <i>Buarremon brunneinucha</i> | Colômbia |
| ATPLA02 | <i>Atlapetes pallidinucha</i> | Colômbia |
| ARBRU02 | <i>Buarremon brunneinucha</i> | Colômbia |
| | <i>Atlapetes melanocephalus</i> | Colômbia |
| TANIG01 | <i>Vireo olivaceus</i> | Colômbia |
| | <i>Tangara nigroviridis</i> | Colômbia |
| | <i>Tangara nigroviridis</i> | Colômbia |

Continuação

| Linhagem | Espécie de ave | Localidade |
|-----------------|----------------------------------|-------------------|
| | <i>Hemispingus superciliaris</i> | Colômbia |
| | <i>Tangara vassorii</i> | Colômbia |
| | <i>Eriocnemis vestita</i> | Equador |
| | <i>Tangara vassorii</i> | Equador |
| ANSOM01 | <i>Anisognathus somptuosus</i> | Colômbia |
| TSJB01 | <i>Tangara sayaca</i> | Brasil |
| TANVAS02 | <i>Hemispingus atropileus</i> | Colômbia |
| | <i>Tangara vassorii</i> | Colômbia |

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram apresentadas evidências morfológicas e moleculares de protozoários parasitos do gênero *Haemoproteus*, em aves da Mata Atlântica, que levantam discussão sobre a diferenciação e identificação das espécies *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus*.

Os gametócitos de *Haemoproteus* sp. visualizados em *T. sayaca* e nos dois espécimes de *Z. capensis*, apresentaram similaridades morfológicas com os gametócitos de *H. (Parahaemoproteus) coatneyi* Burry-Caines & Bennett, 1992. Dentre as principais semelhanças com esta espécie estão: o formato de halter em gametócitos jovens, gametócitos maduros com crescimento longitudinal, aderidos ao núcleo e a membrana externa dos eritrócitos apresentando o formato halteridial, núcleo em posição subterminal a terminal nos macrogametócitos e não distinguível nos microgametócitos, grânulos de pigmentos distribuídos aleatoriamente no citoplasma dos macrogametócitos e geralmente agrupados nos polos do microgametócitos. Alguns gametócitos visualizados em *T. sayaca* e *Z. capensis* apresentaram uma leve constrição na parte central do parasito, característica não muito comum, mas que também foi observada na descrição original de *H. coatneyi* (BURRY-CAINES; BENNET, 1992) e poucos gametócitos apresentaram tendência em formar uma protrusão semelhante a “balão” no lado não parasitado do eritrócito, característica ainda não registrada na espécie.

Sabe-se que a variação na forma e na quantidade de gametócitos de *Haemoproteus* spp. pode ocorrer quando os esfregaços são produzidos em momentos diferentes de intensidade da infecção, isto é, em infecção aguda, crônica ou de recaída e quando demora-se a fazer os esfregaços e a umidade no ar está elevada, o formato do parasito também pode ser alterado (VALKIŪNAS, 2005). Mas, como os esfregaços destas aves estão com boa qualidade e sua produção foi realizada de forma adequada, as alterações observadas podem estar relacionadas ao desenvolvimento progressivo dos parasitos. Formas diferentes de uma mesma espécie de *Haemoproteus* já foram observadas em esfregaços feitos a partir de uma mesma ave, em épocas distintas (BURRY-CAINES; BENNET, 1992). Dessa forma, essas duas características incomuns observadas não são suficientes para se concluir que a espécie aqui estudada seria outra, diferente de *H. coatneyi*.

No entanto, Mantilla et al. (2016) utilizaram dois caracteres morfológicos para diferenciar a espécie *H. erythrogravidus* em *Z. capensis* no Equador e na Colômbia, sendo esses semelhantes àqueles caracteres não comuns que visualizamos em *T. sayaca* e *Z. capensis*, que são: formação de uma protrusão em forma de balão no envelope dos eritrócitos infectados pela maioria dos gametócitos em desenvolvimento e a largura atenuada na região central dos macrogametócitos e microgametócitos apresentando formato de halter. Ambas as características já foram visualizadas em outras espécies de *Haemoproteus* como, por exemplo, eritrócitos parasitados por *Haemoproteus (Parahaemoproteus) fringillae* que apresentaram protrusões ligeiramente visíveis em seus envelopes e gametócitos de *Haemoproteus (Parahaemoproteus) attenuatus* que apresentam largura marcadamente atenuada em sua região central evidenciando o formato de halter (VALKIŪNAS, 2005). Porém, Mantilla et al. (2016) justificaram que tais protrusões foram observadas apenas nos estágios finais do desenvolvimento dos gametócitos, sendo menos proeminentes, e que *H. fringillae* e *H. erythrogravidus* são claramente diferentes geneticamente, apresentando divergência genética entre 4,3% e 4,5% com base no fragmento de 479 pb do gene *cytb*. Da mesma forma, justificaram que o caractere largura atenuada foi visto somente em microgametócitos de *H. attenuatus* e que a divergência genética para *H. erythrogravidus* está entre 4,3% e 4,6% no *cytb*, o que seria confiável para a diferenciação destas espécies (MANTILLA et al., 2016). Além das características morfológicas Mantilla et al. (2016) utilizaram dados moleculares do fragmento do gene mitocondrial *cytb* (479 pb) e o genoma mitocondrial completo (5871 pb)

para diferenciar *H. erythrogravidus* de *H. coatneyi*, e a divergência genética entre estas espécies para o gene *cytb* e para o genoma completo foi 0,7% e 0,9%, respectivamente. Se levarmos em consideração a baixa divergência genética (< 1%) e o fato dos caracteres morfológicos utilizados para diferenciação já terem sido observados em outras espécies, pode ser que *H. erythrogravidus* não seja um caso de especiação.

Um valor limite de divergência genética no *cytb* tem sido utilizado para diferenciar as espécies de hemossporídeos. Segundo Hellgren et al. (2007) espécies que apresentam distância genética acima de 5%, são morfológicamente distintas, a menos que sejam claramente diferenciadas morfológicamente ou apresentem elevada divergência em outro gene. No entanto, há exemplos de espécies de hemossporídeos que diferem menos que 1% no gene *cytb*, como em *Haemoproteus jenniae* e *Haemoproteus iwa* que apresentam 0,6% de divergência genética no gene *cytb* e 4% em um segmento do gene do apicoplasto, além disso, são bem diferenciadas morfológicamente (LEVIN et al., 2012). Outro exemplo é *Haemoproteus pallidus* e *Haemoproteus minutus* que diferem 0,7% no gene *cytb* completo, mas são bem diferenciados morfológicamente (HELLGREN et al., 2007).

Dessa maneira, a reconstrução filogenética do presente estudo mostrou que as linhagens ZCSB01 e ZCSB02 de *Z. capensis* e TSJB01 de *T. sayaca* estão intimamente relacionadas às linhagens de *H. coatneyi* e às linhagens caracterizadas como *H. erythrogravidus*. A maior divergência genética entre as linhagens do clado que agrupa essas espécies está bem abaixo do valor de corte para diferenciar as espécies de hemossporídeos, como sugerido por Hellgren et al. (2007). A linhagem ZCSB01 apresentou 100% de similaridade com a linhagem ZOCAP01 atribuída a *H. erythrogravidus*, mas a caracterização morfológica de ZCSB01 não foi totalmente compatível com a morfologia de ZOCAP01. Como não temos dados de outros genes para confirmar a diferenciação da espécie aqui estudada, sugerimos que as variações morfológicas dos gametócitos encontrados em *Z. capensis* e *T. sayaca* e os valores baixo de divergência genética das linhagens encontradas nessas espécies para as outras linhagens de *H. coatneyi*, não são suficientes para dizer que a infecção seria de *H. erythrogravidus*. As linhagens DENCOR e ZOCAP08 embora tenham sido atribuídas a *H. coatneyi*, ramificaram-se distantemente desta espécie e não apresentam registro morfológico, no entanto, podem representar espécies diferentes.

A fim de obter mais informações para discutir se *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus* são espécies distintas, utilizamos o método computacional de delimitação de espécies, no entanto, o método agrupou as duas espécies mais outras dez morfoespécies de *Haemoproteus* em uma espécie única. A baixa divergência genética encontrada no *cytb* para muitas espécies de *Haemoproteus* pode interferir na delimitação de espécies, uma vez que este algoritmo leva em consideração o comprimento de ramo da topologia filogenética, e consequentemente o número de substituições por sítio ao longo do tempo. Levando em consideração que as espécies em questão não apresentaram grandes diferenças em relação ao comprimento de ramo, é esperado que o algoritmo de delimitação de espécie agrupe várias linhagens em uma mesma espécie. Isso mostra a importância de utilizar a maior quantidade possível de dados informativos para a identificação das espécies de hemossporídeos.

Além dos dados morfológicos e moleculares obtidos neste trabalho, podemos levar em consideração o fato de *H. coatneyi* já ter sido registrado em *Z. capensis* de várias localidades da América do Sul, inclusive na Mata Atlântica do Brasil, (MalAvi database, BENSCH et al., 2009; VALKIŪNAS, 2005). Apesar da especificidade pelo hospedeiro atualmente não ser considerada um caractere taxonômico válido para identificação das espécies de hemossporídeos, este aspecto foi utilizado com sucesso no início da revisão taxonômica de Haemoproteidae (VALKIŪNAS & ASHFORD, 2002) e pode ser utilizado como informação adicional aos métodos moleculares e morfológicos.

Assim, de acordo com os dados históricos, moleculares, morfológicos e do hospedeiro, sugerimos que a espécie registrada, em *T. sayaca* e *Z. capensis* do presente estudo, seja *H. coatneyi*, e que as variações morfológicas aqui visualizadas sejam variações intraespecíficas destes hemosporídeos. No entanto, informações do gene nuclear ou do gene do apicoplasto, assim como dados experimentais podem ser avaliados futuramente para melhor elucidar a taxonomia de *H. coatneyi* e *H. erythrogravidus*.

5.5 CONCLUSÕES

1. *Tangara sayaca* e *Zonotrichia capensis* da Mata Atlântica de Minas Gerais são parasitados por uma espécie de *Haemoproteus* que apresenta alta similaridade morfológica com *Haemoproteus (Parahaemoproteus) coatneyi*.
2. Análise filogenética agrupou as linhagens de *Haemoproteus* do presente estudo com linhagens de *Haemoproteus coatneyi* previamente descritas.
3. A baixa divergência genética entre as linhagens do presente estudo, as linhagens de *H. erythrogravidus* e as linhagens *H. coatneyi* sugere que todas essas linhagens podem de *H. coatneyi*.
4. Devido à alta similaridade morfológica da morfoespécie registrada com *H. coatneyi* e com a baixa divergência genética encontrada, sugerimos que *T. sayaca* e *Z. capensis* são parasitados por *H. coatneyi*.
5. Estudos com outros genes ou com novas ferramentas de delimitação podem auxiliar na análise da validade da espécie *H. erythrogravidus*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Mata Atlântica é reconhecida como um *hotspot* de biodiversidade, pois apresenta um grande número de espécies endêmicas e devido à ação antrópica restam apenas pequenos fragmentos florestais de sua cobertura original. Dentre os principais fatores que levam à extinção de espécies em florestas tropicais estão a perda e a fragmentação de habitats. Além disso, a introdução de agentes patogênicos e doenças infecciosas em uma comunidade pode causar o declínio de populações susceptíveis.

Desse modo, o presente estudo avaliou a presença de parasitos hemosporídeos em aves da família Thraupidae em fragmentos da Mata Atlântica na Zona da Mata Mineira. Informações importantes foram obtidas confirmando que os hemosporídeos estão amplamente distribuídos nas populações de aves estudadas. Estes parasitos são comuns em aves do mundo todo e são conhecidos por causar patologias sanguíneas e teciduais nos hospedeiros vertebrados. Estudos experimentais recentes evidenciaram a obstrução de capilares cerebrais causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. Isso pode causar isquemia e morte rápida em aves que têm intensidade parasitária muito baixa durante o estágio crônico da infecção. Além disso, a gravidade da doença causada por uma dada linhagem do parasito pode variar acentuadamente em diferentes espécies de hospedeiros aviários, desde ausência de qualquer sintoma clínico até alta mortalidade. Entretanto, a gravidade da doença em aves silvestres tem sido significativamente subestimada.

A alta prevalência e a baixa parasitemia de hemosporídeos encontrada no presente trabalho pode ser um indício desse cenário de infecção crônica e chama a atenção, uma vez que as infecções graves podem estar ocultas nas populações de aves locais. Além disso, a nova ferramenta de delimitação computacional de espécies mostrou que existe uma ampla variedade de espécies de hemosporídeos nas aves estudadas e que estes parasitos apresentam baixa especificidade parasitária, sendo distribuídos globalmente.

Estudos que utilizam novas ferramentas de delimitação de espécies podem trazer novas perspectivas para a taxonomia integrativa de parasitos hemosporídeos, uma vez que o maior conhecimento sobre a distribuição das espécies permitirá a identificação de áreas importantes para a implementação de estratégias de conservação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H.B. Sobre o cyclo evolutivo do halterídeo do pombo: nota preliminar. **Brazil-Medico**, Rio de Janeiro, v. 21(15), p.141–142, 1907.
- ARAGÃO, H.B. Sobre o cyclo evolutivo e a transmissão do *Haemoproteus culumbae*. **Revista Médica de São Paulo**, v. 11(20), p. 409–416, 1908.
- ARRIERO, E. & MØLLER, A.P. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, p. 1504–1513, 2008.
- ASGHAR, M.; HASSELQUIST, D.; BENSCH, S. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? **Journal Avian Biology**, v. 42, p.530–537, 2011.
- ATKINSON, C.T.; GREINER, E.C.; FORRESTER, D.J. Pre-erythrocytic development and associated host responses to *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. **Journal Protozoology**, v. 33, p. 375–381, 1986.
- ATKINSON, C.T.; & VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: LOYE, J.E.; ZUK, M. (eds.), **Birdparasite interactions**. Oxford, Oxford University Press, 1991, p. 19–48.
- ATKINSON, C.T.; DUSEK, R.J.; WOODS, K.L.; IKO, W.M.J. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, p. 197–204, 2000.
- ATKINSON, C.T. & LAPOINTE, D.A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23(1), p. 53–63, 2009.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007.
- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67(1), p. 1–48, 2015. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- BEADELL, J.S.; GERING, E.; AUSTIN, J.; DUMBACHER, J.P.; PEIRCE, M.A.; PRATT, T.K.; ATKINSON, C.T.; FLEISCHER, R.C. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3829–3844, 2004.
- BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T.; REIS, S.E.; RICKLEFS, R.O.; BRAGA, E.M. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct Cerrado habitats in Brazil. **PLoS ONE**, v. 6(4), p. 10, 2011.
- BENNETT, G. & LOPES, O.S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 117–134, 1980.

- BENNETT, G. F.; GARNHAM, P.C.C.; FALLIS, A.M. On the status of the genera *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 and *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporidiida: Leucocytozooidae and Haemoproteidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 43, p. 927–932, 1965.
- BENNETT, G.F. & CAMPBELL, A.G. Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. **Canadian Journal of Zoology**, v. 50, p. 1269–1275, 1972.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, v. 267, p. 1583–1589, 2000.
- BENSCH, S.; PÉREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, v. 58, p. 1617–1621, 2004.
- BENSCH, S.; WALDENSTRÖM, J.; JONZÉN, N.; WESTERDAHL, H.; HANSSON, B.; SEJBERG, D.; HASSELQUIST, D. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. **The Journal of Animal Ecology**, v. 76(1), p.112–122, 2007.
- BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1353–1358, 2009.
- BENTZ, S.; RIGAUD, T.; BARROCA, M.; MARTIN-LAURENT, F.; BRU, D.; MOREAU, J.; FAIVRE, B. Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European, blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. **Parasitology**, v. 133, p. 685–692, 2006.
- BERTRAM, M. R.; HAMER, S. A.; HARTUP, B. K.; SNOWDEN, K. F.; MEDEIROS, M. C.; OUTLAW, D. C.; HAMER, G. L. A novel haemosporida clade at the rank of genus in North American cranes (Aves: Gruiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 109, p. 73–79, 2017.
- BLAIR, C. & BRYSON, R.W.JR. Cryptic diversity and discordance in single-locus species delimitation methods within horned lizards (Phrynosomatidae: *Phrynosoma*). **Molecular Ecology Resources**, v. 17(6), p. 1168–1182, 2017.
- BOENIGK, J.; ERESHEFSKY, M.; HOEF-EMDEN, K.; MALLET, J.; BASS, D. Concepts in protistology: species definitions and boundaries. **European Journal Protistology**, v. 48, p. 96–102, 2012.
- BONA A.C.D. & NAVARRO-SILVA, M.A. Diversidade de Culicidae durante os períodos crepusculares em bioma de Floresta Atlântica e paridade de *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25(1), p. 40–48, 2008.

- BONNEAUD, C.; SEPIL, I.; MILA, B.; BUERMANN, W.; POLLINGER, J. The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. **Journal of Tropical Ecology**, v. 25, p. 439–447, 2009.
- BOSHOLN, M.; FECCHIO, A.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E.M.; ANCIÃES, M. Effects of avian malaria on male behaviour and female visitation in lekking blue-crowned manakins. **Journal of Avian Biology**, v. 47, 457–465, 2016.
- BRAGA, E.M.; SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; VALKIŪNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106(1), p. 3–11, 2011.
- BURRY-CAINES, J.R.; BENNETT, G.F. The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporina) of the avian families Fringillidae and Emberizidae s.l. **Canadian Journal of Zoology**, v.70, p. 1149–1160, 1992.
- BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83(4), p. 575–583, 1997.
- CAMPANILI, M. & SCHÄFFER, W.B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental**. Brasília: MMA/SBF, 2010, p. 96.
- CARSTENS, B.C. & DEWEY, T.A. Species delimitation using a combined 81coalescent and information-theoretic approach: na example from north American Myotis bats. **Systematic Biology**, v. 59, p. 400–414, 2010.
- CARSTENS, B.C.; PELLETIER, T.A.; REID, N.M.; SATLER, J.D. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 4369–4383, 2013.
- CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; NERY, C.V.C.; HENRIQUE, P.C.; GONZALEZ, I.H.L.; MONTEIRO, E.F.; GUIMARÃES, L.O.; ROMANO, C.M.; KIRCHGATTER, K. *Plasmodium* (*Novyella*) *nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 286–291, 2013.
- CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; DE OLIVEIRA GUIMARÃES, L.; MONTEIRO, E.F.; GUIDA, F.J.V.; SIMÕES, R.F.; RODRIGUES, P.T.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E.J.; KIRCHGATTER, K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria Journal**, v. 16, p. 83, 2017.
- CHASAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T.B.; SEHGAL, N.M.R. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4121–4133, 2009.
- CLARK, N.J.; CLEGG, S.M.; LIMA, M.R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 329–338, 2014.

CLARK, N.J.; ADLARD, R.D.; CLEGG, S.M. Molecular and morphological characterization of *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *ptilotis*, a parasite infecting Australian honeyeaters (Meliphagidae), with remarks on prevalence and potential cryptic speciation. **Parasitology Research**, v. 114, p. 1921–1928, 2015.

CORRADETTI, A.; GARNHAM, P.C.C.; LAIRD, M. New classification of the avian malária parasites. **Parassitologia**, v. 5(1), p. 1–4, 1963.

CORREA, C.; VÁSQUEZ, D.; CASTRO-CARRASCO, C.; ZÚÑIGA-REINOSO, Á.; ORTIZ, J.C.; PALMA, R.E. Species delimitation in frogs from South American temperate forests: The case of *Eupsophus*, a taxonomically complex genus with high phenotypic variation. **PLoS ONE**, v. 12(8): e0181026, 2017.

CRACRAFT, J. Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. In: **Species Concept and Phylogenetic Theory: A Debate** (Q. D. Wheeler, and R. Meier, eds.). Columbia University Press, New York, p. 3–14, 2000.

DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D.A.; DE JUANA, E. **Handbook of the Birds of the World Alive**. Lynx Edicions, Barcelona, 2018. (disponível em <http://www.hbw.com/> , acesso em 15/08/2018).

DIMITROV, D.; ZEHTINDJIEV, P.; BENSCH, S.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T.; VALKIŪNAS, G. Two new species *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporida, Haemoproteidae) from European birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. **Systematic Parasitology**, v. 87, p. 135–151, 2014.

DIMITROV, D.; IEZHOVA, T.A.; ZEHTINDJIEV, P.; BOBEVA, A.; ILIEVA, M.; KIRILOVA, M.; BEDEV, K.; SJÖHOLM, C. Molecular characterisation of three avian haemoproteids (Haemosporida, Haemoproteidae), with the description of *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *palloris* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 93(5), p. 431–449.

DIMITROV, D.; ILIEVA, M.; IVANOVA, K.; BRLÍK V.; ZEHTINDJIEV P. Detecting local transmission of avian malaria and related haemosporidian parasites (Apicomplexa, Haemosporida) at a Special Protection Area of Natura 2000 network. **Parasitology Research**, p. 2117–2187, 2018.

DINHOPL, N.; NEDOROST, N.; MOSTEGL, M. M.; WEISSENBACHER-LANG, C.; WEISSENBÖCK, H. In situ hybridization and sequence analysis reveal an association of *Plasmodium* spp. with mortalities in wild passerine birds in Austria. **Parasitology Research**, v. 114, p. 1455–1462, 2015.

DURRANT, K.L.; BEADELL, J.S.; ISHTIAQ, F.; GRAVES, G.R.; OLSON, S.L.; GERING, E.; PEIRCE, M.A.; MILENSKY, C.M.; SCHMIDT, B.K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R.C. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**, v. 60, p. 98–111, 2006.

ELDRIDGE, N. CRACRAFT, J. **Phylogenetic patterns and the evolutionary process: method and theory in comparative biology**. New York: Columbia University, 1980, p. 349.

ENCE, D.D.; CARSTENS, B.C. SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species

- delimitation. **Mol. Ecol. Resour.** v.11, p. 473–480, 2011.
- ESSELSTYN, J.A.; EVANS, B.J.; SEDLOCK, J.L.; ANWARALI KHAN, F.A.; HEANEY, L. R. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 279, p. 3678–3686, 2012.
- FALK, B.G.; MAHLER, D.L.; PERKINS, S.L. Tree-based delimitation of morphologically ambiguous taxa: a study of the lizard malaria parasites on the Caribbean island of Hispaniola. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 967–980, 2011.
- FALLON, S.M.; RICKLEFS, R.E.; LATTA, S.C.; BERMINGHAM, E. Temporal stability of insular avian malarial parasite communities. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 271, p. 493–500, 2004.
- FECCHIO, A.; MARINI, M.A.; BRAGA, E.M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no cerrado brasileiro. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, p. 127–135, 2007.
- FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E.M.; MARINI, M.A. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. **Emu – Austral Ornithology**, v. 111, p. 132–138, 2011.
- FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SVENSSON-COELHO, M.; MARINI, M.A.; RICKLEFS, R.E. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 181–192, 2013.
- FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; RIBAS, A. C. A.; SILVEIRA, P.; CAPARROZ, R.; MARINI, M. Â. Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporidia prevalence in White-banded Tanager (*Neothraupis fasciata*) in Central Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v. 93, p. 71–77, 2015.
- FECCHIO, A.; PINHEIRO, R.; FELIX, G.; FARIA, I. P.; PINHO, J.B.; LACORTE, G. A.; BRAGA, E.M.; FARIAS, I.P.; ALEIXO, A.; TKACH, V.V.; COLLINS, M.D.; BELL, J.A.; WECKSTEIN, J.D. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. **Ecography**, p. 1–10, 2017a.
- FECCHIO, A.; SILVEIRA, P.; WECKSTEIN, J.D.; DISPOTO, J.H.; ANCIÃES, M.; BOSHOLN, M.; TKACH, V.V.; BELL, J. A. First Record of *Leucocytozoon* (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: Evidence for Rarity in Neotropical Lowlands or Lack of Sampling for This Parasite Genus? **Journal of Parasitology**, v. 104(2), p. 168–172, 2018a.
- FERREIRA-JUNIOR, F.C.; RODRIGUES, R.A.; SATO, Y.; BORGES, M.A.Z.; BRAGA, E.M. Searching for putative avian malaria vectors in a Seasonally Dry Tropical Forest in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 587, 2016.
- FERREIRA JUNIOR, F.C.; RODRIGUES, R.A.; ELLIS, V.A.; LEITE, L.O. BORGES, M.A.Z.; BRAGA E.M. Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. **PLoS ONE**, 12:e0178791. 2017.

FERREIRA-JUNIOR, F.C.; DUTRA, D.A.; MARTINS, N.R.S.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, E.M. *Haemoproteus paraortalidum* n. sp. in captive Black-fronted Piping-guans *Aburria jacutinga* (Galliformes, Cracidae): high prevalence in a population reintroduced into the wild. **Acta Tropica**, v. 188, p. 93–100. 2018.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: University Press, 2004, p. 220.

FUJISAWA, T.; ASWAD, A.; BARRACLOUGH, T.G. A rapid and scalable method for multilocus species delimitation using Bayesian model comparison and rooted triplets. **Systematic Biology**, v. 65, p. 759–771, 2016.

GABALDON, A.; ULLOA, G. Holoendemicity of malaria: an avian model. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 501–507, 1980.

GALEN, S.C.; NUNES, R.; SWEET, P.R.; PERKINS, S.L. Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, p. 128, 2018.

GARNHAM, P.C. (ed) **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966. 877p.

GLAIZOT, O.; FUMAGALLI, L.; IRITANO, K.; LALUBIN, F.; VAN ROOYEN, J.; CHRISTE, P. High prevalence and lineage diversity of avian malaria in wild populations of great tits (*Parus major*) and mosquitoes (*Culex pipiens*). **PLoS ONE**, v. 7(4), p. e34964, 2012.

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

GONZALEZ-QUEVEDO, C.; PABÓN, A.; RIVERA-GUTIERREZ, H.F. Prevalence of haemosporidians in a Neotropical endemic bird área. **Avian Conservation and Ecology**, v. 11(1),7, 2016.

GONZÁLEZ, A.D.; LOTTA, I.A.; GARCÍA, L.F.; MONCADA, L.I.; MATTA, N.E. Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. **Parasitology International**, v. 64(4), p. 48–59, 2015.

GREINER, E.C.; BENNETT, G.F.; WHITE, E.M.; COOMBS, R.F. Distribution of the avian hematozoa of North America. **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, p. 1762–1787, 1975.

GUEDES, M.L. Culicidae (Diptera) no Brasil: relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecologia Australis**, v. 16(2), p. 283–296, 2012.

HAM-DUEÑAS, J.G.; CHAPA-VARGAS, L.; STRACEY, C.M.; HUBER-SANNWALD, E. Haemosporidian prevalence and parasitemia in Black-Throated Sparrow (*Amphispiza bilineata*) in central-Mexican dryland habitats. **Parasitol Resourch**, v. 116, p. 2527–2537, 2017.

HAMILTON, W.D. & ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? **Science**, v. 218, p. 384–387, 1982.

HAMILTON, W.D. & POULIN, R. The Hamilton and Zuk Hypothesis Revisited: A Meta-Analytical Approach. **Behaviour**, v. 134, p. 299–320, 1997.

HARRIGAN, R.J.; SEDANO, R.; CHASAR, A.C.; CHAVES, J.A.; NGUYEN, J.T.; WHITAKER, A.; SMITH, T.B. New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. **Evolutionary Applications**, v. 7, p. 799–811, 2014.

HASSELQUIST, D. Comparative immunology in birds: hypothesis and tests. **Journal of Ornithology**, v. 148, p. 571–582, 2007.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 797–802, 2004.

HELLGREN, O.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **The Journal of Parasitology**, v. 93, p. 889–896, 2007.

HELLGREN, O.; PEREZ-TRIS, J. & BENSCH, S. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. **Ecology** v. 90, p. 2840–2849, 2009.

HERNÁNDEZ-LARA, C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, F.; SANTIAGO-ALARCON, D. Spatial and seasonal variation of avian malaria infections in five different land use types within a Neotropical montane forest matrix. **Landscape and Urban Planning**, v. 157, p. 151–160, 2017.

HESS, P.N. & DE MORAES RUSSO, C.A. An empirical test of the midpoint rooting method. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 92, p. 669–674, 2007.

HUANG, J-P. & KNOWLES, L.L. The species versus subspecies conundrum: quantitative delimitation from integrating multiple data types within a single Bayesian approach in Hercules beetles. **Systematic Biology**, v. 65, p. 685–99, 2016.

HUDSON, P.J.; DOBSON, A.P. Host-parasite processes and demographic consequences. *In: Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Edited by D.H. Clayton and J. Moore. Oxford University Press, Oxford, p. 128–154. 1997.

IEZHOVA, T.A.; VALKIŪNAS, G.; LOISEAU, C.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N.M. *Haemoproteus cyanomitrae* sp. nov. (Haemosporida: Haemoproteidae) from a widespread African songbird, the Olive sunbird, *Cyanomitra olivacea*. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 137–143, 2010.

ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; PALINAUSKAS, V.; IEZHOVA, T. A.; DINHOPL, N.; NEDOROST, N.; WEISSENBACHER-LANG, C.; WEISSENBÖCK, H.; VALKIŪNAS, G. Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium (Giovannolaia) homocircumflexum*

infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 15, p. 256, 2016.

JAMES, S.P. & TATE, P. New knowledge of the life-cycle of malária parasites. **Nature**, London, v. 139, p. 545, 1937.

JONES, M.R.; CHEVIRON, Z.A.; CARLING, M.D. Spatial Patterns of Avian Malaria Prevalence in *Zonotrichia capensis* on the Western Slope of the Peruvian Andes. **Journal of Parasitology**, v. 99, p. 903–905, 2013.

KAPLI, P.; LUTTEROPP, S.; ZHANG, J.; KOBERT, K.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A.; FLOURI, T. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov Chain Monte Carlo. **Bioinformatics**, v. 33(11), p. 1630–1638, 2017.

KARADJIAN, G.; PUECH, M.P.; DUVAL, L.; CHAVATTE, J.M.; SNOUNOU, G.; LANDAU, I. *Haemoproteus syrnii* in *Strix aluco* from France: morphology, stages of sporogony in a hippoboscid fly, molecular characterization and discussion on the identification of *Haemoproteus* species. **Parasite**, v. 20, p. 32, 2013.

KARADJIAN, G.; MARTINSEN, E.; DUVAL, L.; CHAVATTE, J. M.; LANDAU, I. *Haemoproteus ilanpapernai* n. sp. (Apicomplexa, Haemoproteidae) in *Strix seloputo* from Singapore: morphological description and reassignment of molecular data. **Parasite**, v. 21, p. 17, 2014.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, p. 1–7, 2017.

KNOWLES, S.C.L.; WOOD, M.J.; ALVES, R.; WILKIN, T.A.; BENSCH, S.; SHELDON, B.C. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitemia in a wild bird population. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 1062–1076, 2011.

KNOWLES, S.C.L.; WOOD, M.J.; ALVES, R.; SHELDON, B.C. Dispersal in a patchy landscape reveals contrasting determinants of infection in a wild avian malária system. **Journal of Animal Ecology**, v. 83, p. 429–439, 2014.

KÖPPEN, W. **Roteiro para classificação climática**. Mimeo, 1970.

KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T.A.; SEHGAL, R.N.M.; CARLSON, J.S.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular characterization of *Haemoproteus sacharovi* (Haemosporida, Haemoproteidae), a common parasite of columbiform birds, with remarks on classification of haemoproteids of doves and pigeons. **Zootaxa**, v. 3613(1), p. 85–94, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33(7), p. 1870–1874, 2016.

LACORTE, G.A.; FÉLIX, G.M.F.; PINHEIRO, R.R.B.; CHAVES, A.V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F.S.; LEITE, L.O.; SANTOS, F.R.; BRAGA, E.M. Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites– a molecular survey from southeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 8(3), e57770, 2013.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; HUMPHREY, P.S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the Area de Pesquisas Ecológicas do Guamá, Belém, Pará, Brasil. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 197–198, 1970.

LAINSON, R.; LANDAU, I.; SHAW, J.J. On a new family of non-pigmented parasites in the blood of reptiles: Garniidae fam. nov., (Coccidiida: Haemosporidiidea). Some species of the new genus *Garnia*. **International Journal Parasitology**, v. 1, p. 241–250, 1971.

LAINSON, R.; LANDAU, I.; SHAW, J.J. Further parasites of the family Garniidae (Coccidiida: Haemosporidiidea) in Brazilian lizards. *Fallisia effusa* gen. nov., sp. nov. and *Fallisia modesta* gen. nov., sp. nov. **Parasitology**, v. 68, p. 117–125, 1974.

LANDAU, I.; CHAVATTE, J.; PETERS, W.; CHABAUD, A. The subgenera of avian Plasmodium. **Parasite**, v. 17, p. 3–7, 2010.

LAPOINTE D. A.; ATKINSON, C.T.; SAMUEL, M.D. Ecology and conservation biology of avian malária. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1249, p. 211–226, 2012.

LATTA, S.C.; RICKLEFS, R.E. Prevalence patterns of avian haemosporida on Hispaniola. **Journal of Avian Biology**, v. 41, p. 25–33, 2010.

LEAVITT, S.; MOREAU, C.; LUMBSCH, H.T. The dynamic discipline of species delimitation: progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. In: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R, editors. **Recent Advances in Lichenology**: Springer; India, p. 11–44, 2015.

LEITE, Y.F.C.; PINHEIRO, R.P.; BRAGA, E.M. Prevalência de Hemosporideos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. **Ornithologia**, v. 6(1), p. 1–13, 2013.

LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; VANORMELINGEN, P.; STEEN, F.; LOPEZ-BAUTISTA, J.M.; ZUCCARELLO, G.C.; DE CLERCK, O. DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v. 49(2), p. 79–196, 2014.

LEVIN, I.I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; O'BRIEN, S.L.; PARKER, P.G. Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of hippoboscid-transmitted avian hemoproteids. **The Journal of Parasitology**, v. 98, p. 847–854, 2012.

LEVIN, I.I.; ZWIERS, P.; DEEM, S.L.; GEEST, E.A.; HIGASHIGUCHI, J.M.; IEZHOVA, T.A.; JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI, G.; KIM, D.H.; MORTON, J.P.; PERLUT, N.G.; RENFREW, R.B.; SARI, E.H.R.; VALKIŪNAS, G.; PARKER, P.G. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos islands and evidence for arrival via migratory birds. **Conservation Biology**, v. 27(6), p. 1366–1377, 2013.

LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. CRC Press, ISBN 978-0849346538, Boca Raton, Florida, USA, 1988, 224 p.

LIMA, L. M. **Birds of the Atlantic Forest: richness, status, composition, endemism, and conservation**. Dissertation, Universidade de São Paulo, 2014.

LITTLEWOOD, D.T.J. Systematics as a cornerstone of parasitology: overview and preface. **Parasitology**, v. 138, p. 1633–1637, 2012.

LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R.S.; SCHMIDT, K.A.; KEESING, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **PNAS**, v. 100 (2), p. 567–571, 2003.

LOISEAU, C.; IEZHOVA, T.; VALKIŪNAS, G.; CHASAR, A.; HUTCHINSON, A.; BUERMANN, W.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N.M. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 21–29, 2010.

LUCENA, D.T. Lista dos protozoários hemoparasitas de aves da região neotropical. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 2(1), p. 33–66, 1941.

MACCALLUM, W.G. On the flagellated form of the malarial parasite. **Lancet**, v. 11, p. 1240–1241, 1897.

MACCALLUM, W.G. On the haematozoan infections of birds. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 3, p. 117–136, 1898.

MANTILLA, J.S.; MATTA, N.E.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; GONZÁLEZ, A.D.; MONCADA, L.I. Identification of *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (Great Thrush) in Colombia. **The Journal of Parasitology**, v. 99, p. 662–668, 2013a.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ, A.D.; VALKIŪNAS, G.; MONCADA, L.I.; MATTA, N.E. Description and molecular characterization of *Plasmodium (Novyella) unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. **Parasitology Research**, v. 112, p. 4193–4204, 2013b.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ, A.D.; LOTTA, I.A.; MOENS, M.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; VALKIŪNAS, G.; MONCADA, L.I.; PÉREZ-TRIS, J.; MATTA, N.E. *Haemoproteus erythrogravidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): Description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. **Acta Tropica**, v. 159, p. 83–94, 2016.

MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; MERINO, S.; TOMÁS, G.; MORENO, J.; MORALES, J.; LOBATO, E.; GARCÍA-FRAILE, S.; BELDA, E.J. The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. **Biology Letters**, v. 6, p. 663–665, 2010.

MARTINSEN, E.S.; PERKINS, S.; SCHALL, J.J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 261–273, 2008.

MARZAL, A. Recent advances in studies on avian malaria parasites. *In*: Okwa, O.O. (ed.) **Malaria parasites**. In Tech, 2012, p. 135–158.

MARZAL, A.; GARCÍA-LONGORIA, L.; CALLIRGOS, J.M.C.; SEHGAL, R.N.M. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. **Biological Invasions**, v. 17, p. 39-45, 2015.

MAYDEN, R.L. A hierarchy of species concepts: the denouement of the species problem *In*: **The Units of Biodiversity - Species in Practice Special** (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds.). Systematics Association, v. 54, 1997.

MMA - Ministério do Meio Ambiente - Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade Brasileira - Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, 2002. 404 p.

MCCALLUM, H.; DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. **Tree**, v. 10, p.190–194, 1995.

MEIER-KOLTHOFF, J.P.; AUCH, A.F.; KLENK, H.-P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 60, 2013.

MELLO, B.; VILELA, J.F.; SCHRAGO, C.G. Conservation phylogenetics and computational species delimitation of Neotropical primates. **Biological Conservation**, v. 217, p. 397–406, 2018.

MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R.A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C.F.; IPPI, S.; SABAT, P.; ROZZI, R.; MCGEHEE, S. Haematozoa in forest birds from Southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**, v. 33, p. 329–340, 2008.

MERINO, S.; HENNICKE, J.; MARTÍNEZ, J.; LUDYNIA, K.; TORRES, R.; WORK, T.M.; STROUD, S.; MASELLO, J.F.; QUILLFELDT, P. Infection by *Haemoproteus* parasites in four species of frigatebirds and the description of a new species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v. 98(2), p. 388–397, 2012.

MIJARES, A.; ROSALES, R.; SILVA-ITURRIZA, A. Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. **Avian Diseases**, v. 56(3), p. 583–588, 2012.

MOENS, M.A.; VALKIŪNAS, G.; PACA, A.; BONACCORSO, E.; AGUIRRE, N.; PÉREZ-TRIS, J. Parasite specialization in a unique habitat: hummingbirds as reservoirs of generalist blood parasites of Andean birds. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, p. 1234–1245, 2016.

- MOENS, M.A.J.; PÉREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 41–49, 2015.
- MONAGHAN, M.T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; INWARD, D.J.; LEES, D.C.; RANAIVOSOLO, R.; EGGLETON, P.; BARRACLOUGH, T.G.; VOGLER, A.P. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology**, v. 58, p. 298–311, 2009.
- MOTTA, R.O.C.; ROMERO MARQUES, M.V.; FERREIRA JUNIOR, F.C.; ANDERY DDE, A.; HORTA, R.S.; PEIXOTO, R.B.; LACORTE, G.A.; MOREIRA, P.A.; LEME, F.O.P.; MELO, M.M.; MARTINS, N.R.S.; BRAGA, E.M. Does haemosporidian infection affect hematological and biochemical profiles of the endangered Black-fronted piping-guan (*Aburria jacutinga*)? **Peer J**, v. 1, p. e45, 2013.
- MUSHER, L.J. & CRACRAFT, J. Phylogenomics and species delimitation of a complex radiation of Neotropical suboscine birds (*Pachyramphus*). **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 118, p. 204–21, 2018.
- NILSSON, E.; TAUBERT, H.; HELLGREN, O.; HUANG, X.; PALINAUSKAS, V.; MARKOVETS, M.Y.; VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S. Multiple cryptic species of sympatric generalists within the avian blood parasite *Haemoproteus majoris*. **Journal Evolution Biology**, v. 29(9), p. 1812–1826, 2016.
- OLIVEIRA, L.; CEDROLA, F.; SENRA, M.V.X.; SCOPEL, K.K.G.; MARTINELE, I.; TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; D'AGOSTO, M. Polymorphism evidence in *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* (Lucena, 1939) (Apicomplexa, Haemosporida) isolated from Brazilian wild birds. **Parasitology International**, v.70, p.70 – 76, 2019.
- OUTLAW, D.C. & RICKLEFS, R.E. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. **Parasitology**, v. 141, p. 1223–1232, 2014.
- OUTLAW R.K.; COUNTERMAN B.; OUTLAW D.C. Differential patterns of molecular evolution among Haemosporidian parasite groups. **Parasitology**, v. 142(4), p. 612–622, 2015.
- PACHECO, M.A.; MATTA, N.E.; VALKIŪNAS, G.; PARKER, P.G.; MELLO, B.; STANLEY JR, C.E.; LENTINO, M.; GARCIA-AMADO, M.A.; CRANFIELD, M.; KOSAKOVSKY POND, S.L.; ESCALANTE, A.A. Mode and rate of evolution of haemosporidian mitochondrial genomes: timing the radiation of avian parasites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 383–403, 2017.
- PAGENKOPP, K.M.; KLICKA, J.H. Geographic variation in malaria parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). **Conservation Genetics**, v. 9, p. 1577–1588, 2008.
- PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria

parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). **Zootaxa**, v. 1626, p. 39–50, 2007.

PALINAUSKAS, V.; IEZHOVA, T.A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; MARKOVETS, M. Y.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular characterization and distribution of *Haemoproteus minutus* (Haemosporida, Haemoproteidae): A pathogenic avian parasite. **Parasitol International**, v. 62, p. 358–363, 2013.

PALINAUSKAS, V.; ŽIEGYTĖ, R.; ILGŪNAS, M.; IEZHOVA, T.A.; BERNOTIENĖ, R.; BOLSHAKOV, C.; VALKIŪNAS, G. Description of the first cryptic avian malaria parasite, *Plasmodium homocircumflexum* n. sp.; with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes. **International Journal for Parasitology**, v. 45(1), p. 51–62, 2015.

PALINAUSKAS, V.; ŽIEGYTĖ, R.; IEZHOVA, T.A.; ILGŪNAS, M.; BERNOTIENĖ, R.; VALKIŪNAS, G. Description, molecular characterisation, diagnostics and life cycle of *Plasmodium elongatum* (lineage pERIRUB01), the virulent avian malaria parasite. **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 697–707, 2016.

PERKINS, S.L. Species concepts and malaria parasites: Detecting a cryptic species of *Plasmodium*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 267, p. 2345–2350, 2000.

PERKINS, S.L. & SCHALL, J.J. A molecular phylogeny of malaria parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 972–978, 2002.

PERKINS, S.L. & AUSTIN, C.C. Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: Integrating morphology and molecules. **The Journal of Parasitology**, v. 95, p. 424–433, 2009.

PERKINS, S.L.; MARTINSEN, E.S.; FALK, B.G. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. **Parasitology**, v. 138, p. 1664–1674, 2011.

PERKINS, S.L. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. **The Journal of Parasitology**, v. 100(1), p. 11–25, 2014.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. **R Core Team_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.1–137, 2018.

PONS, J.; BARRACLOUGH, T.G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D.P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN W.D.; VOGLER, A.P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, v. 55, p. 595–609, 2006.

POULIN, R. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. **International Journal for Parasitology**, v. 23(7), p. 937–944, 1993.

POULIN, R. Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being male? **The American Naturalist**, v. 147, p. 287–295, 1996.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D. A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. **PloS One**, v. 8, p. e66213, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2018.

READ, A.F. Passerine polygyny: a role for parasites? **The American Naturalist**, v. 138, p. 434–459, 1991.

REICZIGEL, J.; ROZSA, L.; REICZIGEL, A. Quantitative Parasitology (QPweb). Disponível em: < <http://www2.univet.hu/qpweb> >. Acesso em: 20/01/2018, 2014.

REINOSO-PÉREZ, M.T.; CANALES-DELGADILLO, J.C.; CHAPA-VARGAS, L.; RIEGORUIZ, L.R. Haemosporidian parasite prevalence, parasitemia, and diversity in three resident bird species at a shrubland dominated landscape of the Mexican highland plateau. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 307, 2016.

REMPLE, J.D. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18(2), p. 75–88, 2004.

RIBEIRO, S.F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F.C.; MARINI, M.A.; VAGO, A.R.; BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261–267, 2005.

RICKLEFS, R.E. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 4722–4725, 1992.

RICKLEFS, R.E. & FALLON, S.M. Diversification and host switching in avian malária parasites. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 269, p. 885–892, 2002.

RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; FALLON, S. M.; MARTÍNEZ-ABRAÍN, A.; SCHEUERLEIN, A.; GRAY, J.; LATTA, S.C. Community relationships of avian malaria parasites in Southern Missouri. **Ecological Monographs**. v. 75, p. 543–559, 2005.

RICKLEFS R.E.; MEDEIROS M., ELLIS V.A., SVENSSON-COELHO M, BLAKE JG, LOISELLE BA, SOARES, L.; FECCHIO, A.; OUTLAW, D.; MARRA, P.P.; LATTA, S.C.; VALKIŪNAS, G.; HELLGREN, O.; BENSCH, S. Avian migration and the distribution of malaria parasites in New World passerine birds. **Journal of Biogeography**, v. 44, p. 1113 – 1123, 2016.

RIDGELY, R.S. & TUDOR, G. **Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines**. Austin: University of Texas Press, 2009. 750p.

ROOS, F.L.; BELO, N.O.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E.M. Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*, Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. **Parasitology Research**, v. 114(10), p. 3903–3911, 2015.

RYDER, O.A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution** v. 1, p. 9–10, 1986.

SÁ, M.R. Studies of avian malaria and Brazil in the international scientific context (1907-1945). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 18, p. 499–518, 2011.

SANTIAGO-ALARCON, D.; OUTLAW, D.C.; RICKLEFS, R.E.; PARKER, P.G. Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. **International Journal for Parasitology**, v. 40(4), p. 463–470, 2010.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H.M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. **Biological Reviews**, v. 87(4), p. 928–64, 2012.

SAVE Brasil. Sociedade para a Conservação das Aves do Brasil. 2018. Disponível em: <<http://www.savebrasil.org.br>>. Acesso em: 18/12/2018.

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; MANICA, L.T.; MARINI, M.A. Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds, effects of fragment size and habitat dependency. **Bird Conservation International**, v. 20(4), p. 432–439, 2010.

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M.A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21(1), p. 7–15, 2012.

SEEGAR, S.W.; EVERETT, S.L.; SLADEN, W.J.L.; TRPIS, M. A mallophaga, *Trinoton anserinum*, as a cyclo developmental vector for a heart worm parasite of water fowl. **Science**, v. 194, p.739–741, 1976.

SEHGAL, R.N.M.; HULL, A.C.; ANDERSON, N.L.; VALKIŪNAS, G.; MARKOVETS, M.J.; KAWAMURA, S. TELL, L.A. Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. **Journal of Parasitology** v. 92, p. 375–379, 2006.

SEHGAL, R.N.M.; BUERMANN, W.; HARRIGAN, R.J.; BONNEAUD, C.; LOISEAU, C.; CHASAR, A.; SEPIL, I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.; SAATCHI, S.; SMITH, T.B. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest Bird. **Proceedings of the Royal Society**, v. 278, p. 1025–1033, 2011.

SEHGAL, RN. Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4(3), p. 421–430, 2015.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira, edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 1997. 912p.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira**. São Paulo: Avis Brasilis, 2014. 607p.

SMITH, B.T.; RIBAS, C.C.; WHITNEY, B.M.; HERNANDEZ-BANOS, B.E.; KLICKA, J. Identifying biases at different spational and temporal scales of diversification: a case study in the Neotropical parrotlet genus *Forpus*. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 483–94, 2013.

- SOL, D.; JOVANI, R.; TORRES, J. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. **Oecologia**, v. 135, p. 542–547, 2003.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30(9), p. 1312–1313, 2014.
- TALAVERA, G. & CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56(4), p. 564–577, 2007.
- TALISUNA, A.O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical microbiology review**, v. 17, p. 235–254, 2004.
- TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in Life Sciences (American Mathematical Society), v. 17, p. 57–86, 1986.
- TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; SENRA, M.V.X.; D'AGOSTO, M.; MASSARD, C.L. Multidisciplinary re-description of *Plasmodium (Novyella) paranucleophilum* in Brazilian wild birds of the Atlantic Forest kept in captivity. **Parasitology Research**, v. 116(7), p. 1887–1897, 2017.
- TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; OLIVEIRA, L.; SENRA, M.V.; MASSARD, C.L.; D'AGOSTO, M. Molecular and morphological characterization of a brazilian lineage of *Plasmodium (Novyella) unalis* in *Turdus* spp. (Passeriformes) of the Atlantic Forest, with remarks on new hosts and high genetic variation. **The Journal of Parasitology**, v. 104(1), p. 70–78, 2018.
- VALKIŪNAS, G. **Bird Haemosporida**, Institute of Ecology, Vilnius, Lithuania, 1997. 607p.
- VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. CRC Press Boca Raton, Florida, 2005. 947p.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R.N.M.; BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. **The Journal of Parasitology**, v. 94(6), p. 1395–1401, 2008a.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; LOISEAU, C.; CHASAR, A. THOMAS, B.S.; SEHGAL, R.N.M. New species of haemosporidian parasites (Haemosporida) from African rainforest birds, with remarks on their classification. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1213–1228, 2008b.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1512–1515, 2009a.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; LOISEAU, C.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N.M. New malaria parasites of the subgenus *Novyella* in African rainforest birds, with remarks on their high prevalence, classification and diagnostics. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1061–1077, 2009b.

VALKIŪNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; LEVIN, I.I.; IEZHOVA, T.A.; PARKER, P.G. A new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the endemic Galapagos dove *Zenaida galapagoensis*, with remarks on the parasite distribution, vectors, and molecular diagnostics. **Journal of Parasitology**, v. 96, 783–792, 2010a.

VALKIŪNAS, G.; SEHGAL, R. N.; IEZHOVA, T. A.; HULL, A. C. Identification of *Leucocytozoon toddi* group (Haemosporida: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of leucocytozoids. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 170–177, 2010b.

VALKIŪNAS, G.; ASHFORD, R.W.; BENSCH, S.; KILLICK-KENDRICK, R.; PERKINS, S. A cautionary note concerning Plasmodium in apes. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 231–232, 2011.

VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; BERNOTIENĖ, R.; KAZLAUSKIENĖ, R.; IEZHOVA, T.A. Further observations on in vitro hybridization of hemosporidian parasites: patterns of ookinete development in *Haemoproteus* spp. **The Journal of Parasitology**, v. 99(1), p. 124–136, 2013.

VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; DIMITROV, D.; BERNOTIENĖ, R.; ZEHTINDJIEV, P.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T.A. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. **Parasitology Research**, v. 113(6), p. 2251–2263, 2014.

VALKIŪNAS, G.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; ŽIEGYTĖ, R.; BERNOTIENĖ, R.; JUSYS, V.; EIGIRDAS, V.; FRAGNER, K.; WEISSENBÖCK, H.; IEZHOVA, T.A. Plasmodium delichoni n. sp.: description, molecular characterization and remarks on the exoerythrocytic merogony, persistence, vectors and transmission. **Parasitology Research**, v. 115(7), p. 2625–2636, 2016.

VALKIŪNAS, G.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; PALINAUSKAS, V.; BERNOTIENĖ, R.; IEZHOVA, T.A. Molecular characterization and distribution of Plasmodium matutinum, a common avian malaria parasite. **Parasitology**, v. 144(13), p. 1726–1735, 2017.

VALKIŪNAS, G. & IEZHOVA, T.A. Keys to the avian malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 17(1), p. 212, 2018.

VAN OERS K.; RICHARDSON, D.S.; SÆTHER, S.A.; KOMDEUR, J. Reduced blood parasite prevalence with age in the *Seychelles Warbler*: selective mortality or suppression of infection? **Journal Ornithology**, v. 151, p. 69–77, 2010.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S.G.; GAFF, M.L.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaii land birds. **Ecology Monographs**, v. 56, p. 327–344, 1986.

VANSTREELS, R.; DA SILVA-FILHO, R.; KOLESNIKOVAS, C.; BHERING, R.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; JUNIOR, F.; BRAGA, E.; CATÃO-DIAS, J. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. **Veterinary Research**, v. 46(1), p. 1–12, 2015.

VENABLES, W.N. & RIPLEY, B.D. **Modern Applied Statistics with S**. Fourth Edition. Springer, New York, 2002.

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

WEATHERHEAD, P.J. & BENNETT, G.F. Ecology of parasitism of Brown-headed Cowbirds by haematozoa. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, p. 1–7, 1992.

WEISS, R. A.; MCMICHAEL, A.J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 10, p.70–76, 2004.

WHITE, E.M.; GREINER, E.C.; BENNET, G.F.; HERMAN, C.M. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. **Revista de Biologia Tropical**, v. 26, p. 43–102, 1978.

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

YANG, Z. Maximum Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA Sequences with Variable Rates over Sites: Approximate Methods. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 306–314, 1994.

YANG, Z. & RANNALA, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, p. 9264–9269, 2010.

ZEHTINDJIEV, P.; KRIŽANAUSKIENÉ, A.; BENSCH, S.; PALINAUSKAS, V.; ASGHAR, M.; DIMITROV, D.; SCEBBA, S.; VALKIŪNAS, G. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction–based protocols for amplification of the cytochrome *b* gene. **The Journal of Parasitology**, v. 98, p. 657–665, 2012.

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29(22), p. 2869–2876, 2013.

ZHAO, Y.; YI, Z.; GENTEKAKI, E.; ZHAN, A.; AL-FARRAJ, SA; SONG, W. Utility of combining morphological characters, nuclear and mitochondrial genes: an attempt to resolve the conflicts of species identification for ciliated protists. **Molecular Phylogenetic Evolution**. v.94, p.718–729, 2016.

ZUK, M. & MCKEAN, K.A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. **International Journal Parasitology**, v. 26(10), p. 1009–1023, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) DA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF)

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 29268-3 e 29268-4

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) DA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 042/2012- CEEA sobre “HEMOPARASITOS E ECTOPARASITOS EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MARTA TAVARES D’AGOSTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 042/2012- CEEA about “HEMOPARASITOS E ECTOPARASITOS EM AVES SILVESTRES DA MATA ATLÂNTICA DE MINAS GERAIS”, under responsibility of MARTA TAVARES D’AGOSTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012.

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.



Presidente/CEEA



p/ Secretario/CEEA

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 29268-3 e 29268-4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-3 | Data da Emissão: 10/09/2012 13:53 | Data para Revalidação*: 10/10/2013 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Coleta e Transporte de material biológico e ectoparasitos de aves mantidas pelo IBAMA - Juiz de Fora | 06/2011 | 12/2012 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se deslinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|----------------------------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------|
| 1 | Renata da Silva Matos | Mestranda | 056.612.256-10 | mg12 692408 ssp-MG | Brasileira |
| 2 | Ralph Maturano Pinheiro | Doutorando | 118.809.587-08 | 21239083-5 Detran-RJ | Brasileira |
| 3 | Caio Marcio de Oliveira Monteiro | Doutorando | 058.965.206-03 | mg11387585 ssp-MG | Brasileira |
| 4 | LUIZA DE OLIVEIRA | Iniciação Científica | 087.191.406-90 | MG-14.548.228 SSP-MG | Brasileira |
| 5 | Diego Marques de Oliveira | Iniciação Científica | 089.787.156-13 | MG-14.005.512 SSP-MG | Brasileira |
| 6 | Viviane Zeringöta Rodrigues | Mestranda | 072.284.726-24 | MG12226949 SSP MG-MG | Brasileira |
| 7 | Marta Tavares d'Agosto | Pesquisadora | 236.026.276-91 | M591318 sspmg-MG | Brasileira |
| 8 | Hermes Ribeiro Luz | Pesquisador | 088.990.417-09 | 1714411 SSP-ES | Brasileira |
| 9 | Fernanda Calmon Britto | Mestranda | 042.528.316-01 | mg10629294 ssp-MG | Brasileira |
| 0 | Raquel Cristina Tostes | Mestranda | 062.338.396-96 | 13270601 SSP-MG | Brasileira |
| 1 | Tatiane de Oliveira Souza Senra | Mestranda | 054.787.916-44 | MG16668527 SSP MG-MG | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74714921



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-3 | Data da Emissão: 10/09/2012 13:53 | Data para Revalidação*: 10/10/2013 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição : Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

| | | | | | |
|---|-------------------------|----------------|----------------|-------------------|------------|
| 1 | Isabel Martinele Corrêa | Pós-doutoranda | 041.246.516-78 | MG10773857 SSp-MG | Brasileira |
| 2 | | | | | |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-----------------|----|---------------------------|--------------------|
| 1 | LIMA DUARTE | MG | Vila Manejo | Fora de UC Federal |
| 2 | PALMA | MG | Sítio Java | Fora de UC Federal |
| 3 | JUIZ DE FORA | MG | Sítio Malícia | Fora de UC Federal |
| 4 | JUIZ DE FORA | MG | Granja Passarada (casa 5) | Fora de UC Federal |
| 5 | CORONEL PACHECO | MG | Fazenda da Embrapa | Fora de UC Federal |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|--|--|
| 1 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ | Passeriformes, Psittaciformes, Falconiformes |

Material e métodos

| | | |
|---|---------------------------------|---|
| 1 | Amostras biológicas (Aves) | Ectoparasita, Sangue |
| 2 | Método de captura/coleta (Aves) | Outros métodos de captura/coleta (rede de neblina de 10 x 3 metros e com malha de 38mm), Puçá |

Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino | Tipo Destino |
|---|--------------------------------------|--------------|
| 1 | Universidade Federal de Juiz de Fora | |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74714921



Página 2/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-3 | Data da Emissão: 10/09/2012 13:53 | Data para Revalidação*: 10/10/2013 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição : Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, 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).

| Táxon* | Qtde. | Tipo de amostra | Qtde. | Data |
|--------|-------|-----------------|-------|------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74714921



Página 3/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-4 | Data da Emissão: 03/06/2013 16:47 | Data para Revalidação*: 03/07/2014 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição : Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Coleta e Transporte de material biológico e ectoparasitos de aves mantidas pelo IBAMA - Juiz de Fora | 06/2011 | 12/2012 |
| 2 | Coleta e transporte de material biológico e ectoparasitos de aves obdidos "in situ" | 12/2012 | 12/2013 |
| 3 | Coleta e transporte de material biológico e ectoparasitos de aves mantidas pelo IBAMA - Juiz de Fora | 12/2012 | 12/2013 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Outras ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | Esta autorização não exime o titular de atender a IN 27 de 2002, que trata do Sistema Nacional de Anilhamento. |
|---|--|

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|----------------------------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------|
| 1 | Renata da Silva Matos | Mestranda | 056.612.256-10 | mg12 692408 ssp-MG | Brasileira |
| 2 | Ralph Maturano Pinheiro | Doutorando | 118.809.587-08 | 21239083-5 Detran-RJ | Brasileira |
| 3 | Caio Marcio de Oliveira Monteiro | Doutorando | 058.965.206-03 | mg11387585 ssp-MG | Brasileira |
| 4 | LUIZA DE OLIVEIRA | Iniciação Científica | 087.191.406-90 | MG-14.548.228 SSP-MG | Brasileira |
| 5 | Viviane Zeringóta Rodrigues | Mestranda | 072.284.726-24 | MG12226949 SSP MG-MG | Brasileira |
| 6 | Marta Tavares d'Agosto | Pesquisadora | 236.026.276-91 | M591318 sspmg-MG | Brasileira |
| 7 | Hermes Ribeiro Luz | Pesquisador | 088.990.417-09 | 1714411 SSP-ES | Brasileira |
| 8 | Fernanda Calmon Brito | Mestranda | 042.528.316-01 | mg10629294 ssp-MG | Brasileira |
| 9 | Raquel Cristina Tostes | Mestranda | 062.338.396-96 | 13270601 SSP-MG | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11224323



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-4 | Data da Emissão: 03/06/2013 16:47 | Data para Revalidação*: 03/07/2014 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição : Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

| | | | | | |
|----|---------------------------------|----------------------|----------------|----------------------|------------|
| 10 | Tatiane de Oliveira Souza Senra | Mestranda | 054.787.916-44 | MG16668527 SSP MG-MG | Brasileira |
| 11 | Isabel Martinele Corrêa | Pós-doutoranda | 041.246.516-78 | MG10773857 SSP-MG | Brasileira |
| 12 | João Luiz Horacio Faccini | Pesquisador | 242.424.547-91 | 2082745 IFP/RJ-RJ | Brasileira |
| 13 | Tatiane Pinheiro Lopes Novato | Mestranda | 013.316.426-80 | 11013274 SSP-MG | Brasileira |
| 14 | Laryssa Xavier Araújo | Mestranda | 072.107.246-13 | MG-8516689 SSP-MG | Brasileira |
| 15 | Talys Henrique Assumpção Jardim | Iniciação científica | 130.997.757-70 | 24647571-9 DETRAN-RJ | Brasileira |
| 16 | Lúcio Moreira Campos Lima | Mestrando | 088.641.736-84 | MG14550363 SSP-MG | Brasileira |
| 17 | Diego Rodrigues Melo | Mestrando | 057.686.567-23 | 15230952 SSP-MG | Brasileira |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-----------------|----|---------------------------|--------------------|
| 1 | LIMA DUARTE | MG | Vila Manejo | Fora de UC Federal |
| 2 | PALMA | MG | Sítio Java | Fora de UC Federal |
| 3 | JUIZ DE FORA | MG | Sítio Malícia | Fora de UC Federal |
| 4 | JUIZ DE FORA | MG | Granja Passarada (casa 5) | Fora de UC Federal |
| 5 | CORONEL PACHECO | MG | Fazenda da Embrapa | Fora de UC Federal |
| 6 | JUIZ DE FORA | MG | Sítio Vista Alegre | Fora de UC Federal |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|--|--|
| 1 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ | Passeriformes, Psittaciformes, Falconiformes |

Material e métodos

| | | |
|---|---------------------------------|---|
| 1 | Amostras biológicas (Aves) | Ectoparasita, Sangue |
| 2 | Método de captura/coleta (Aves) | Outros métodos de captura/coleta (rede de neblina de 10 x 3 metros e com malha de 38mm), Puçá |

Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino | Tipo Destino |
|---|--------------------------------------|--------------|
| 1 | Universidade Federal de Juiz de Fora | |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11224323



Página 2/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 29268-4 | Data da Emissão: 03/06/2013 16:47 | Data para Revalidação*: 03/07/2014 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Erik Daemon de Souza Pinto | CPF: 641.665.627-20 |
| Título do Projeto: Hemoparasitos e ectoparasitos em aves silvestres da Zona da Mata mineira | |
| Nome da Instituição : Universidade Federal de Juiz de Fora | CNPJ: 21.195.755/0001-69 |

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, 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).

| Táxon* | Qtde. | Tipo de amostra | Qtde. | Data |
|--------|-------|-----------------|-------|------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11224323



Página 3/3