

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

**TESE**

**Novas espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* e  
*Haemoproteus* em aves silvestres de ambientes  
montanos da Mata Atlântica do sudeste do Brasil**

**Talys Henrique Assumpção Jardim**

**2022**



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

**NOVAS ESPÉCIES DE PARASITOS DO GÊNERO *Plasmodium* E  
*Haemoproteus* EM AVES SILVESTRES DE AMBIENTES  
MONTANOS DA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE DO BRASIL**

**TALYS HENRIQUE ASSUMPCÃO JARDIM**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

*e Coorientação dos Professores*  
**Roberto Júnio Pedrosa Dias  
e Carlos Luiz Massard**

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

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2022

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

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

37n      Jardim, Talys Henrique Assumpção, 1991-  
Novas espécies de parasitos do gênero Plasmodium e  
Haemoproteus em aves silvestres de ambientes montanos  
da Mata Atlântica do sudeste do Brasil / Talys  
Henrique Assumpção Jardim. - Seropédica, 2022.  
103 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Coorientador: Roberto Junio Pedroso Dias.  
Coorientador: Carlos Luiz Massard.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências  
Veterinárias, 2022.

1. Haemosporida. 2. endemismo. 3. morfometria. 4.  
cyt-b. 5. aves silvestres. I. Azevedo Santos,  
Huarrisson, 1980-, orient. II. Junio Pedroso Dias,  
Roberto, 1982-, coorient. III. Massard, Carlos Luiz,  
1947-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências  
Veterinárias. V. Título.



ATA N° 6441/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.078164/2022-99

Seropédica-RJ, 28 de dezembro de 2022.

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

**TALYS HENRIQUE ASSUMPÇÃO JARDIM**

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

TESE APROVADA EM 28/12/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

*(Assinado digitalmente em 30/12/2022 14:26)*

**HUARRISSON AZEVEDO SANTOS**

*DESP (12.28.01.00.00.00.52)*

*Matrícula: ###014#2*

*(Assinado digitalmente em 30/12/2022 15:20)*

**MARISTELA PECKLE PEIXOTO**

*DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)*

*Matrícula: ###034#8*

*(Assinado digitalmente em 29/12/2022 12:47)*

**PATRICIA GONZAGA PAULINO**

*DESP (12.28.01.00.00.00.52)*

*Matrícula: ###991#3*

*(Assinado digitalmente em 30/12/2022 13:39)*

**GLAUBER THIAGO MARTINS BARINO**

*CPF: ###.###.826-##*

*(Assinado digitalmente em 28/12/2022 12:43)*

**FRANCIANE CEDROLA VALE**

*CPF: ###.###.536-##*

*Dedico esta Tese aos meus Mestres e às minhas paixões*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Huarrisson Santos**, pela grande oportunidade.

Ao Professor **Roberto Dias**, pelo compromisso.

À minha amada, **Gabriela Porto**, pelo companheirismo na profissão e na vida.

Aos amigos do **LabProto** e do **Lasave**, por toda a ajuda prestada.

Aos **Estagiários** e **Ajudantes de campo**, pelas horas duras de trabalho sob intempéries.

À **UFRRJ**, pelas experiências.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, pelo aprendizado.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro do projeto e pela concessão da bolsa de Doutorado.

Agradeço carinhosamente ao **Professor Erik Daemon** (In memoriam), pelo incentivo incondicional e pelos ensinamentos carregados até hoje.

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

## **BIOGRAFIA**

Talys Henrique Assumpção Jardim, filho de Juciara Werneck Assumpção e Carlos Henrique Oliveira Jardim, nasceu em 12 de março de 1991, na cidade de Petrópolis, região serrana do Rio de Janeiro.

Em agosto de 2011 ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais e em dezembro de 2016 diplomou-se Bacharel em Ciências Biológicas. Durante toda graduação foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Protozoologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto.

Em 2017, 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 2019.

Em 2019, 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 coorientação do Professor Doutor Roberto Júnio Pedrosa Dias, sendo bolsista pelo CNPq.

## RESUMO GERAL

JARDIM, Talys Henrique Assumpção. **Novas espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* e *Haemoproteus* em aves silvestres de ambientes montanos da Mata Atlântica do sudeste do Brasil.** 102p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A Mata Atlântica é um dos grandes “hotspots” de biodiversidade e endemismo de espécies do mundo. Um dos fatores responsáveis por gerar tanta diversidade é o relevo. As montanhas oferecem condições ambientais distintas em relação às áreas circundantes além de forte isolamento geográfico, resultando em altas taxas de endemismo. Os estudos sobre a biodiversidade em montanhas da Mata Atlântica já revelaram a presença de diversas espécies, porém ainda não se conhece a diversidade de hemossporídeos aviários nesses locais. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade de hemossporídeos aviários em ambientes montanos da Mata Atlântica utilizando técnicas morfológicas, moleculares e filogenéticas. Foram amostradas 621 aves em altitudes de 700 a 2500 metros acima do nível do mar. Na análise dos esfregaços sanguíneos a prevalência de parasitos do gênero *Plasmodium* registrada foi 4,25% (26/521) e *Haemoproteus* de 4,35% (27/621). Em uma ave da espécie *Rhopias gularis* amostrada no Parque Nacional do Itatiaia foi possível caracterizar e descrever uma nova espécie de parasito da malária aviária, *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni*. Em hospedeiros Columbiformes da espécie *Geotrygon montana* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos foi descrito *Haemoproteus (Haemoproteus) massardi*. As características morfológicas das novas espécies de hemossporídeos mostraram-se consistentes e inéditas, assim como as características genéticas recuperadas através das análises filogenéticas. Através dos resultados obtidos enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade global de hemossporídeos e das espécies que ocorrem na Mata Atlântica, um bioma altamente ameaçado que tem o potencial de abrigar muitas espécies de parasitos da malária aviária ainda não conhecidos pela ciência, dada sua grande biodiversidade e a pouca amostragem realizada até o momento. Os dados aqui apresentados sugerem um efeito considerável do relevo sobre a diversidade e endemismo de parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* na Mata Atlântica, uma vez que as novas espécies descritas ocorrem em ambientes montanos desse bioma.

**Palavras-chave:** Haemosporida; endemismo; morfometria; *cyt-b*; aves silvestres.



## GENERAL ABSTRACT

JARDIM, Talys Henrique Assumpção. **New parasite species of *Plasmodium* and *Haemoproteus* genus in wild birds from in montane environments of the Atlantic Forest of southeastern Brazil.** 102p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The Atlantic Forest is one of the great “hotspots” of biodiversity and species endemism in the world. One of the factors responsible for generating so much diversity is the relief. The mountains offer distinct environmental conditions in relation to the surrounding areas, in addition to strong geographic isolation, resulting in high rates of endemism. Studies on biodiversity in mountains of the Atlantic Forest have already revealed the presence of several species, but the diversity of avian hemosporidia in these places is still unknown. Thus, the objective of the present study was to investigate the diversity of avian hemosporidia in montane environments of the Atlantic Forest using morphological, molecular, and phylogenetic techniques. 621 birds were sampled at altitudes from 700 to 2500 meters above sea level. In the analysis of blood smears, the prevalence of parasites of the genus *Plasmodium* recorded was 4.25% (26/521) and *Haemoproteus*, 4.35% (27/621). In a bird of the species *Rhopias gularis* sampled in the Itatiaia National Park, it was possible to characterize and describe a new species of avian malaria parasite, *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni*. In Columbiform hosts of the species *Geotrygon montana* in the Serra dos Órgãos National Park, *Haemoproteus (Haemoproteus) massardi* was described. The morphological characteristics of the new species were consistent and unprecedented, as well as the genetic characteristics of the parasites recovered through phylogenetic analyses. Through the results obtained, we enriched our knowledge about the global diversity of hemosporidia and the species of the Atlantic Forest, a highly threatened biome that has the potential to harbor many species of avian malaria parasites not yet known to science, given its great biodiversity and the little sampling already carried out. The data presented here suggest a considerable effect of relief on the diversity and endemism of parasites of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* in the Atlantic Forest, since the new species described occur in mountainous environments of this biome.

**Keywords:** Hemosporida; endemism; morphometry; *cyt-b*; wild birds.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Morfometria das formas eritrocíticas de *P. erikdaemoni* em amostras de *Rhopias gularis* (RHOGUL01). Todas as medidas foram realizadas em micrometros ( $\mu$ ). São mostrados valores mínimos, máximos, média e desvio padrão. No total foram mensuradas 25 fotomicrografias de cada forma de desenvolvimento do parasito. **30**

**Tabela 2.** Informações sobre as linhagens filogeneticamente próximas à *Plasmodium erikdaemoni* sp. nov. de acordo com a reconstrução filogenética realizada com o conjunto de dados contendo todas as sequencias de *Plasmodium* disponíveis no banco de dados MalAvi (BENSCH et a., 2009). **31**

**Tabela 3.** Comparações morfométricas entre *Plasmodium erikdaemoni* e *Plasmodium unalis*. **36**

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Informações sobre as linhagens filogeneticamente próximas à *Haemoproteus massardi* sp. nov. de acordo com a reconstrução filogenética realizada com o conjunto de dados contendo todas as sequencias de *Haemoproteus* disponíveis no banco de dados MalAvi (BENSCH et a., 2009). **49**

**Tabela 2.** Morfometria de *Haemoproteus massardi* sp. nov. realizada em esfregaços sanguíneos de *Geotrygon montana*. Todas as medidas foram realizadas em micrometros ( $\mu$ ). Valores máximos, mínimos, média e desvio padrão. Foram mensuradas 30 fotomicrografias de cada forma de desenvolvimento do parasito. **53**

**Tabela 3.** Comparações morfométricas entre *Haemoproteus massardi*, *Haemoproteus paramultipgmentatus* e *Haemoproteus columbae*. **57**

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*: Parte superior no vetor; Parte inferior nas aves hospedeiras: I, II - merogonia exoeritrocitária primária; III – merogonia eritrocítica; IV - merogonia exoeritrocitária secundária; 1 - esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoíto em macrófagos; 5, 6 - metacriptozoítos; 7 - merozoítos no eritrócitos; 8 - gametócitos; 9 - merozoíto em eritrócitos; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoito em células endoteliais de vasos capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogametócito; 18 - exflagelação de microgametócitos; 19 - fertilização do macrogametócito; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Figura adaptada de VALKIUNAS (2005). **7**

**Figura 2.** Representação do ciclo biológico de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves. 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 (VALKIUNAS, 2005). **9**

**Figura 3.** Locais de amostragem dos estudos com hemosporídeos aviários na América do Sul. Os pontos vermelhos indicam a localização geográfica. Adaptado de GIL-VARGAS e SEDANO-CRUZ (2019). **12**

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Mapa altimétrico representando os locais de amostragem do presente estudo na região Sudeste do Brasil: A – Parque Nacional do Itatiaia; B – Parque Nacional do Caparaó; C – Parque Nacional da Serra dos Órgãos. **21**

**Figura 2:** Reconstrução filogenética baseada em um fragmento de 469 pares de base do gene *cyt-b* de espécies do gênero *Plasmodium*. O método de reconstrução filogenética foi o Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo GTR+G+I. O método de bootstrap com 649 pseudoréplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Haemoproteus columbae* (HAECOL01) e *Haemoproteus syrniai* (STAL2) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software RaxML. Barra representa 7 substituições por posições de 100 nucleotídeos. **26**

**Figura 3.** *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni* sp. nov. (linhagem RHOGUL01) em esfregaços sanguíneos de *Rhopias gularis* corados com Giemsa. (A-D) Trofozoítos; (E-H) Merontes eritrocíticos; (I-J) Macrogametócitos; (M-P) Microgametócitos. Setas simples indicam os núcleos dos parasitos, triângulos indicam grânulos de pigmento hemozoínico e a flecha indica os merozoítos. Barra de escala = 10 µm. **29**

## CAPÍTULO 2

**Figura 1:** Reconstrução Filogenética baseada em um fragmento de 478 pares de base do gene *cyt-b* de espécies do gênero *Haemoproteus*. O método de reconstrução filogenética foi o de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo GTR + G + I. O método de bootstrap com 799 pseudoréplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Plasmodium gallinaceum* (GALLUS01) e *Plasmodium relictum* (SGS1) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software RaxML. Barra representa 3 substituições por posições de 100 nucleotídeos. **48**

**Figura 2.** Gametócitos de *Haemoproteus massardi* sp. nov. (linhagem GEOMON03) em esfregaços sanguíneos de *Geotrygon montana* corados com Giemsa. Gametócitos jovens (1,2,13,14); Macrogametócitos (1-12); Microgametócitos (13-24). Setas simples indicam os núcleos dos parasitos, triângulos indicam grânulos de pigmento hemozoínico e a flecha indica os vacúolos. Barra de escala = 10 µm. **51**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Os hemosporídeos	3
2.2 O gênero <i>Plasmodium</i> em aves	5
2.3 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> em aves	5
2.4 O gênero <i>Haemoproteus</i> em aves	8
2.5 Ciclo biológico de <i>Haemoproteus</i> em aves	8
2.4 Malária Aviária	10
2.5 Estudos sobre hemosporídeos em aves no Brasil	11
2.6 Diversidade e endemismo nas montanhas da Mata Atlântica	13
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>15</b>
3 DESCRIÇÃO DE <i>Plasmodium (Novyella) erikdaemoni</i> sp. nov. EM <i>Rhopias gularis</i> (Passeriformes, Thamnophilidae) NAS MONTANHAS NEOTROPICAIS COM BASES, MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FILOGENÉTICAS	
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.2.1 Amostragem	20
3.2.2 Análises morfológicas	22
3.2.3 Análises moleculares	22
3.2.4 Análises filogenéticas	24
<b>3.3 RESULTADOS</b>	<b>25</b>
3.3.1 Análises dos esfregaços sanguíneos	25
3.3.2 Análises filogenéticas	25
3.3.3 Descrição do parasito	26
<b>3.4 DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>3.5 CONCLUSÕES</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>38</b>
4 CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE <i>Haemoproteus (Haemoproteus) massardi</i> sp. nov. EM COLUMBIFORMES NATIVOS NAS MONTANHAS DA MATA ATLÂNTICA	
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>41</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>

4.2.1 Amostragem	43
4.2.2 Análises morfológicas	44
4.2.3 Análises moleculares	44
4.2.4 Análises filogenéticas	46
<b>4.3 RESULTADOS</b>	<b>47</b>
4.2.3 Análises dos esfregaços sanguíneos	47
4.2.4 Análises filogenéticas	47
4.3.1 Descrição do parasito	49
<b>4.4 DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>4.5 CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>60</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS A</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS B</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS C</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, são mais de 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos (MMA, 2022). Dentre as espécies de animais, as aves representam o segundo maior táxon em número de espécies registradas, totalizando 1.919 espécies, distribuídas em 33 ordens, 103 famílias e 705 gêneros (PACHECO et al., 2021). Na Mata Atlântica, estima-se que ocorram em torno de 891 espécies de aves (FIGUEIREDO et al., 2014). Em relação endemismo, atualmente esse bioma conta com 27 gêneros e 213 espécies exclusivas (PACHECO et al., 2021). Neste contexto o relevo é um dos fatores com grande influência sobre a diversidade e riqueza de espécies da Mata Atlântica (JENKINS et al., 2015). Neste bioma culminam seis dos dez pontos mais altos do Brasil (IBGE, 2006), nas regiões da Mantiqueira, Serra do Caparaó e Serra do Mar, destacando-se o Pico da Bandeira com 2890 metros acima do nível do mar.

Os ambientes montanos oferecem condições ambientais muito distintas em relação às áreas de baixada e por conta dessa diferença apresentam acentuado nível de endemismo (KORNER & SPEHN, 2002). O fator mais influente sobre o alto nível de endemismo das montanhas da Mata Atlântica é isolamento geográfico proporcionado por estes ambientes, onde, os organismos com o passar do tempo acumulam adaptações exclusivas frente às espécies das planícies circundantes ocorrendo interrupções nos intercâmbios bióticos e iniciando uma ruptura populacional, que pode resultar em especiação (GRAHAM et al., 2014). Dessa forma, com as restrições do fluxo gênico e a conectividade geográfica reduzida entre indivíduos é possível a aplicação da teoria da especiação através da biogeografia de ilhas (MACARTHUR e WILSON, 1967), onde os processos de diversificação das espécies nas montanhas da Mata Atlântica ocorrem de formas semelhantes ao de ilhas oceânicas. Essa teoria já foi comprovada em vários organismos (KITAYAMA et al., 1996; POREMBSKI et al., 1998; BARBARÁ et al., 2007; VASCONCELOS E RODRIGUES 2010; CHAVES et al., 2015; PRATES et al., 2017), porém ainda não foi testada para os hemospórideos aviários.

Dados da literatura mostram que hospedeiros parasitados por hemospórideos podem ser mais susceptíveis à predação, sofrerem com a redução da habilidade de estabelecer territórios, de obter alimentos e manutenção da massa corporal (ATKINSON, et al., 2001). Além disso, o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de

seus hospedeiros tem influência não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa, dispersão, diversidade genética e na estrutura de comunidade (GARAMSZEGI et al., 2005; MARZAL et al., 2005). A presença de parasitos pode ainda ameaçar a biodiversidade causando declínio de populações naturais, uma vez que, diminui tanto a sobrevivência como a reprodução de seus hospedeiros (ALTIZIER et al., 2001). O conhecimento sobre o impacto da malária aviária nas aves, apesar de importante, ainda é insipiente e grande parte dos estudos está focada em aves domésticas (VALKIUNAS, 2005). Contudo, alguns dados sobre aves silvestres têm demonstrado que tais patogenias podem ser devastadoras (ATKINSON et al., 2008), e casos de mortalidade, declínio populacional e extinção de espécies de aves em decorrência de infecções virulentas por hemosporídeos, já foram reportados, como o clássico caso da introdução acidental de *Plasmodium relictum*, bem como de seus vetores em Ilhas Havaianas na década de 1980 (VAN RIPER III et al. 1986).

Dessa forma, em um cenário onde temos uma região com alta biodiversidade, como a Mata Atlântica, uma doença altamente relevante, como a malária aviária e grandes lacuna de conhecimento, como o caso das amostragens nas montanhas brasileiras e os hemosporídeos, este estudo apresenta como objetivo principal: ampliar o conhecimento sobre a diversidade de parasitos hemosporídeos aviários nas regiões altimontanas na Mata Atlântica brasileira.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os hemosporídeos

A descoberta dos hemosporídeos e os estudos na área têm início em 1885, quando o pesquisador russo Vassily Danilewsky ao analisar esfregaços sanguíneos de répteis e aves detecta formas de desenvolvimento intraeritrocitárias de um parasito muito semelhante ao agente da malária humana (VALKIUNAS, 2005; SÁ, 2011). Anos depois, com a descrição detalhada das formas encontradas, a comparação destas em estudos com hemoparasitos de diversos hospedeiros e com um entendimento maior sobre o desenvolvimento e a infecção destes parasitos, Danilewsky cunha o termo “hemosporídeos” (VALKIUNAS, 2005). Os hemosporídeos (Apicomplexa, Haemosporida) são protozoários parasitos que realizam parte de seu ciclo de biológico em células sanguíneas e nos tecidos de hospedeiros vertebrados (fase assexuada) (anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e parte em tecidos de hospedeiros invertebrados (fase sexuada) (dípteros hematófagos), seus vetores. (GARNHAM, 1966; PERKINS, 2014). Os representantes da ordem Haemosporida compartilham como características do grupo: o ciclo biológico heteroxeno (esquizogonia ocorre no hospedeiro vertebrado e gametogonia/esporogonia no vetor), a presença de macrogametócitos e microgametócitos (que se desenvolvem de forma independente nas células do hospedeiro vertebrado), a presença oocineto ou zigoto móvel (no hospedeiro invertebrado); e esporozoítos sem membrana celular (no hospedeiro invertebrado) (GARNHAM, 1966; REMPLÉ, 2004; VALKIUNAS, 2005). A partir destas características somadas à outras características específicas de cada táxon do grupo, a sistemática atual classifica os hemosporídeos aviários em 3 principais famílias: Plasmodiidae, Haemoproteidae e Leucocytozoidae, onde as espécies que infectam aves pertencem, respectivamente, aos gêneros: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Fallisia* e *Leucocytozoon*, classificados da seguinte forma (VALKIUNAS, 2005):

Ordem: Haemosporida

Família: Haemoproteidae

Gênero: *Haemoproteus*

Subgêneros *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*

Família: Plasmodiidae

Gênero: *Plasmodium*

Subgêneros *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Bennettinia* e *Huffia*

Família: Leucocytozoidae

Gênero: *Leucocytozoon*

Subgêneros *Leucocytozoon* e *Akiba*

A taxonomia dos hemosporídeos, em grande parte dos seus mais de 100 anos de história, levou em conta quase sempre a utilização caracteres morfológicos baseados no conceito da similaridade morfológica para a identificação e delimitação das espécies do grupo (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). Nesse contexto, os caracteres dos parasitos observados em esfregaços sanguíneos sob microscopia como: a presença de merontes e quando presentes o número de merozoítos nos merontes; o tamanho e a forma dos gametócitos; a presença ou ausência de pigmento de hemozoína; o tipo de célula hospedeira infectada; as alterações causadas pelo parasito nas células infectadas somados a espécie de hospedeiro infectado e a região de registro do parasito, serviram de parâmetro para a descrição das espécies de hemosporídeos e guiaram a classificação taxonômica do grupo durante grande parte da sua história (GARNHAM, 1966; PERKINS et al., 2000; VALKIUNAS, 2005; SÁ, 2011). Contudo, o aumento de publicações de novas espécies baseadas em similaridade morfológica e principalmente com base nos hospedeiros e locais-tipo resultou com o passar dos anos em uma superestimação da diversidade dos hemosporídeos e uma taxonomia conflituosa e repleta de espécies inválidas gerando problemas de identificação durante mais de um século (PERKINS et al., 2000; VALKIUNAS, 2005). O salto na sistemática do grupo tem início com a implementação, domínio e popularização das técnicas de PCR e sequenciamento genético entre os pesquisadores da área (HELGREEN et al., 2004; BRAGA et al., 2011). A partir destas técnicas novas informações taxonômicas passaram a ser obtidas a partir do sequenciamento genético de várias espécies de hemosporídeos e começaram a revelar diferenças entre as espécies parasitos (BENSCH et al., 2004).

A implementação das técnicas de PCR, sequenciamento genético e reconstrução filogenética associadas a padronização das sequencias de hemosporídeos produzidas, trouxe avanço para a taxonomia do grupo (BENSCH, et al., 2004; et al., 2009; HELGREEN et al., 2004;). Problemas como homonímias, sinonímias e *Incertae sedis* foram resolvidos gerando a reclassificação de muitos táxons de Haemosporida tanto à nível de espécie quanto à nível de Família (VALKIUNAS, 2005; e IEZHIVA, 2018; et al., 2022; BENSCH et al., 2009;). Dessa forma a soma de estudos morfológicos utilizando as técnicas clássicas e a utilização modernos métodos moleculares e filogenéticos tornou-se o “padrão-ouro” para a detecção, identificação, classificação e descrição de novas espécies para os parasitos do grupo (VALKIUNAS, 2005; BESNCH et al., 2009; BRAGA et al., 2011; FECCHIO et al., 2020; MANDAL, 2021). Contudo, apesar da

grande contribuição dos métodos moleculares para o entendimento da diversidade de hemosporídeos, a popularização em escala global destes métodos em detrimento das técnicas morfológicas tem gerado cada vez mais sequencias genéticas de hemosporídeos aviários não relacionadas às espécies do parasito (BENSCH, 2009). O banco de dados específico de Hemosporídeos aviários (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) MalAvi (BENSCH et al., 2009) possui mais de 4787 linhagens do gene *cyt-b* destes parasitos menos de 0,1% das linhagens são relacionadas a espécies caracterizadas morfológicamente.

## **2.2 O gênero *Plasmodium* em aves**

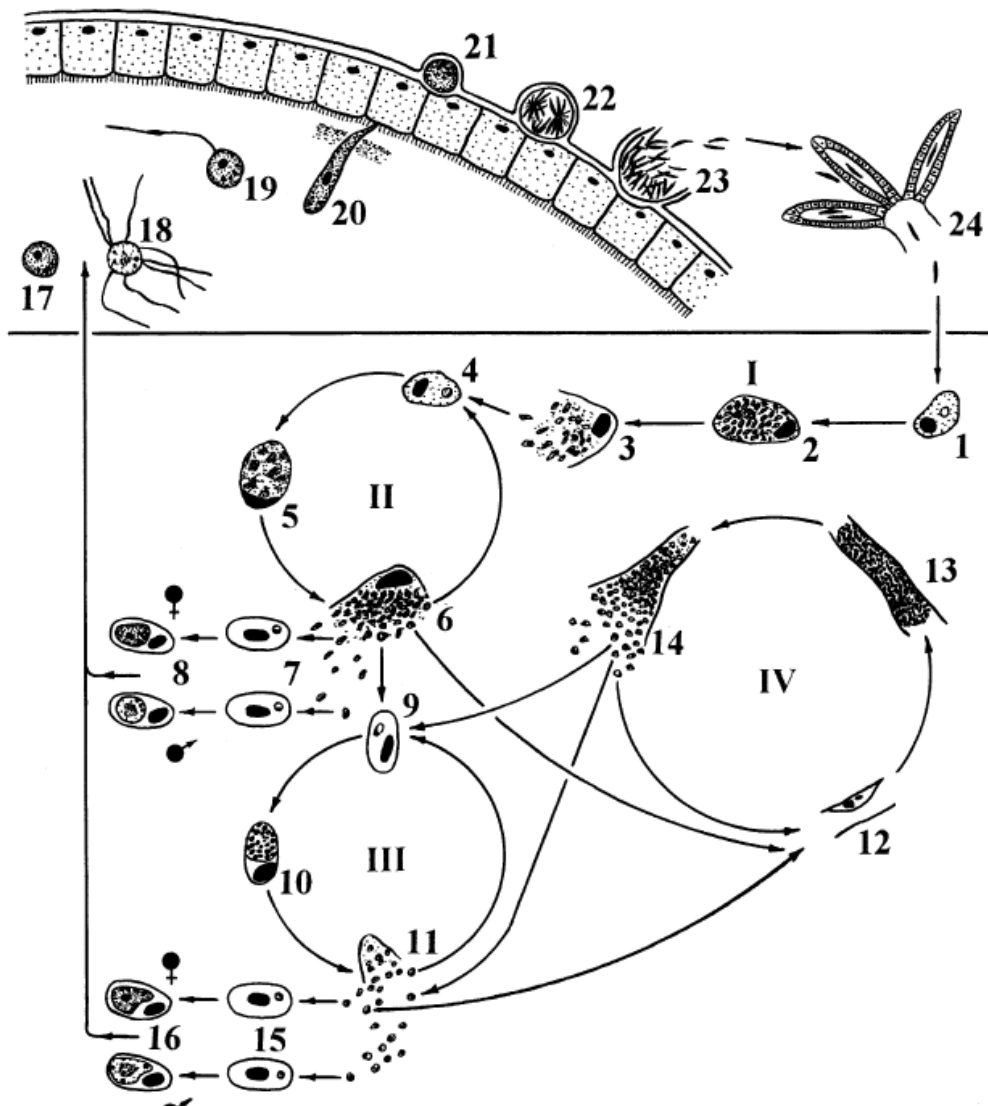
O gênero *Plasmodium* possui 5 subgêneros capazes de infectar aves: *Novyella*, *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Bennettinia* e *Huffia*. Cada subgênero de *Plasmodium* apresenta características distintas quanto à patogenia, distribuição e principalmente quanto à morfologia das formas de desenvolvimento do parasito (VALKIUNAS, 2005). Baseados nos caracteres morfológicos e nas sequencias do gene *cyt-b* dos parasitos são reconhecidas 55 espécies válidas do gênero *Plasmodium*, predominando a maior riqueza no subgênero *Novyella* (VALKIUNAS & IEZHOVA, 2018). Este grupo de hemoparasitos pode ser encontrado em todas as regiões biogeográficas do planeta, com exceção da Antártida (VALKIUNAS, 2005), uma vez que possuem grande capacidade de infectarem, se desenvolverem e completarem seus ciclos biológicos em diversas espécies de aves em quase todas famílias e ordens existentes (CAMPBELL, 1995; VALKIUNAS, 2005; BENSCH et al., 2009; CLARK et al., 2014; SEHGAL et al., 2015). A transmissão de *Plasmodium* tem como vetores mosquitos hematófagos da Ordem Diptera e Família Culicidae, sendo que somente as fêmeas os gêneros *Culex*, *Coquillettidia*, *Aedes*, *Mansonia*, *Culisetta*, *Anopheles*, *Psorophora* ao se alimentarem do sangue de aves infectadas transmitem o parasito (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; NJABO et al., 2009; EJIRI et al., 2011; SANTIAGO-ALARCON et al., 2012).

## **2.3 Ciclo de biológico de *Plasmodium* em aves**

De acordo com GARNHAM (1966) e VALKIUNAS (2005) a reprodução assexuada dos parasitos do gênero *Plasmodium* ocorrem em aves (hospedeiros vertebrados) e a reprodução sexuada ocorre em mosquitos da família Culicidae (hospedeiros invertebrados). O ciclo biológico *Plasmodium* spp. pode ser dividido em

três etapas: fases exoeritrocíticas<sup>1</sup> e eritrocíticas<sup>2</sup> (ocorrem no hospedeiro vertebrado) e a fase esporogônica<sup>3</sup> (ocorrem no mosquito transmissor) (Figura 1):

- 1- A fase exoeritrocítica tem início na inoculação de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares dos mosquitos infectados durante o repasto sanguíneo em aves. A merogonia exoeritrocitária primária consiste em duas gerações de formação de merontes, que são chamados criptozoítos. Os criptozoítos, que ainda não possuem capacidade de infectar as células sanguíneas, geralmente se desenvolvem em células reticulares de diversos órgãos, como pulmão, baço e fígado e em tecidos como a pele e mucosas, dando origem à metacriptozoítos. Os metacriptozoítos podem gerar novos criptozoítos ou se diferenciarem em fanerozoítos (capazes de infectar células sanguíneas). Durante a merogonia exoeritrocitária secundária ocorrem várias gerações de merontes (fanerozoítos).
- 2- Na fase eritrocítica, os merozoítos resultantes das fases anteriores podem infectar eritrócitos e dividem-se assexuadamente por merogonia originando merontes (esquizontes), que quando completam seu desenvolvimento se rompem liberando outros merozoítos capazes de infectar novamente eritrócitos. Ao penetrar em outra célula, estes merozoítos recomeçam seu desenvolvimento, podendo se diferenciar, através de merogonias, em novos merontes ou podem se diferenciar em formas que darão origem aos gametas, chamadas gametócitos, os quais são ingeridos por mosquitos vetores durante o repasto sanguíneo.
- 3- Logo após a ingestão dos gametócitos pelos vetores inicia-se a fase gametogônica. Os gametócitos, estimulados pela diferença térmica do meio (estômago do mosquito) em relação ao hospedeiro vertebrado, completam seu desenvolvimento na luz do estômago do mosquito onde rompem os eritrócitos em que estavam contidos. Os microgametócitos produzem, por exflagelação, microgametas que se unem a macrogametas produzidos a partir dos macrogametócitos, originando um zigoto, o qual se diferencia em uma forma móvel (oocineto). O oocineto ultrapassa a parede estomacal e forma cistos na membrana subserosa externa do intestino do vetor. Através de esquizogonia o oocisto produz grande número de esporozoítos que quando completam seu desenvolvimento são liberados na hemocele do mosquito. Através do deslocamento da hemolinfa pelo corpo dos mosquitos, os esporozoítos chegam à glândula salivar e permanecem até o momento do repasto sanguíneo nas aves, onde são inoculados.



**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*: Parte superior no vetor; Parte inferior nas aves hospedeiras: I, II - merogonia exoeritrocitária primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exoeritrocitária secundária; 1 - esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoíto em macrófagos; 5, 6 - metacriptozoítos; 7 - merozoítos no eritrócitos; 8 - gametócitos; 9 - merozoíto em eritrócitos; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoíto em células endoteliais de vasos capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogametócito; 18 - exflagelação de microgametócitos; 19 - fertilização do macrogametócito; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Figura adaptada de VALKIUNAS (2005).

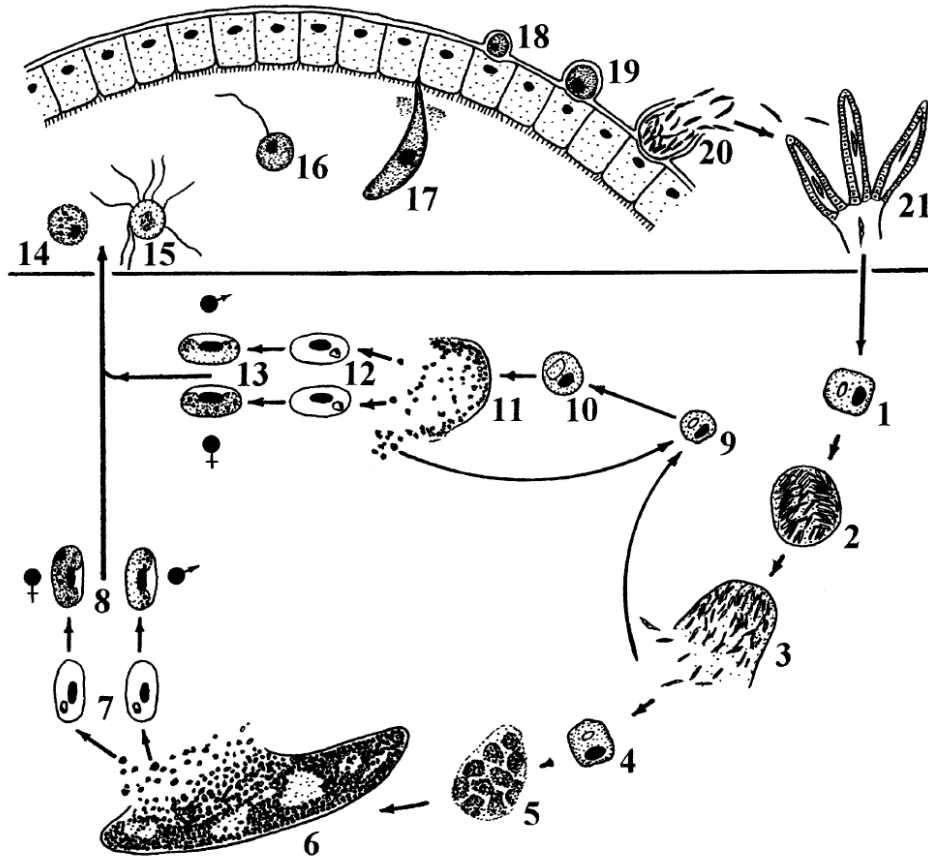
## **2.4 O gênero *Haemoproteus* em aves**

O gênero *Haemoproteus*, possui 2 subgêneros que ocorrem em aves: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*. A divisão entre os dois subgêneros de *Haemoproteus* se dá pelos vetores envolvidos na transmissão: enquanto o subgênero *Haemoproteus* é transmitido por moscas da família Hippoboscidae, o subgênero *Parahaemoproteus* é transmitido por mosquitos da família Ceratopogonidae (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; KRIZANAUSKIENE et al., 2013). O subgênero *Haemoproteus* possui grande parte de suas espécies associadas à hospedeiros da ordem Columbiforme (pombos), por sua vez o subgênero *Parahaemoproteus* possui uma maior diversidade de hospedeiros, sendo registrado em quase todas as ordens de aves, mas principalmente em Passeriformes (VALKIUNAS, 2005; e IEZHOVA, 2022). Baseados nos caracteres morfológicos e nas sequencias do gene *cyt-b* dos parasitos são reconhecidas atualmente 177 espécies destes parasitos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; e IEZHOVA, 2022; BENSCH et a., 2009; DIMITROV et al., 2014). Assim como os parasitos do gênero *Plasmodium*, as espécies do gênero *Haemoproteus* podem ser encontrados em todas as regiões biogeográficas do planeta, com exceção da Antártida (VALKIUNAS, 2005; BENSCH et a., 2009).

## **2.5 Ciclo de biológico de *Haemoproteus* em aves**

De acordo com GARNHAM (1966) e VALKIŪNAS (2005) a reprodução assexuada dos parasitos do gênero *Haemoproteus* ocorrem em aves (hospedeiros vertebrados) e a reprodução sexuada ocorre em mosquitos da família Ceratopogonidae e hippoboscidade (hospedeiros invertebrados) (Figura 2). O ciclo nas aves se inicia quando os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do vetor são inoculados no hospedeiro vertebrado e atingem as células endoteliais desenvolvendo-se em merontes exoeritrocíticos. Esta fase pode ocorrer em órgãos como, fígado, baço, rins, cérebro, pulmões e musculatura esquelética. Os merontes formam merozoítos que podem infectar novas células ou podem desenvolver-se em megalomerontes no tecido muscular. Os merozoítos formados dos megalomerontes podem infectar as células sanguíneas e desenvolverem-se em gametócitos nos eritrócitos. O ciclo nos vetores se inicia quando o inseto ingere os gametócitos durante o repasto sanguíneo, dando início à gametogênese. Os gametócitos assumem formato amebóide e rompem os eritrócitos no intestino do vetor. Macrogametas arredondados são produzidos pelo macrogametócito e

microgametas móveis são originados pela exflagelação do microgametócito. No ambiente extracelular ocorre a fertilização e formação do zigoto que dá origem ao oocineto móvel. O oocineto atravessa a camada epitelial do intestino do inseto dando origem ao oocisto. O oocisto realiza esporogonia formando grande número de esporozoítos. Após a maturação do oocisto, os esporozoítos se deslocam pela hemocele até as glândulas salivares do vetor.



**Figura 2.** Representação do ciclo biológico de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves. 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 (VALKIUNAS, 2005).

## 2.6 Malária aviária

Entre os parasitos hemospórideos, o gênero mais estudado e mais conhecido é *Plasmodium*. Muito do conhecimento gerado para o grupo pode ser justificado pelo fato do gênero incluir espécies causadoras da malária humana, uma doença globalmente relevante que apresenta em regiões menos desenvolvidas alta taxa de mortalidade (VALKIŪNAS, 2005; OMS, 2021). Contudo, segundo VALKIUNAS (2005), a malária aviária é causada também pelos gêneros de parasitos hemospórideos *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Em relação às espécies de hemospórideos que parasitam aves, algumas podem ser altamente patogênicas para alguns hospedeiros e outras espécies podem infectar aves de forma crônica durante toda a vida do indivíduo, gerando assim menor prejuízo (VALKIŪNAS, 2005). Durante o início dos estudos da malária aviária os pesquisadores acreditavam que o parasitismo pelos hemospórideos resultava em pouco ou quase nenhum dano para as aves hospedeiras, contudo, com o avançar das experimentações em espécies de aves domésticas, principalmente pombos-domésticos (*Columba livia*), os novos estudos começaram a demonstrar a patogenicidade da doença, os sintomas e a importância desta sobre a saúde e desenvolvimento das aves (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; SÁ, 2011). A infecção por parasitos da malária aviária tem como principais sinais clínicos nas aves hospedeiras: apatia, letargia, dispnéia, alterações neurológicas, febre, perda de peso, e, em casos mais extremos, morte súbita (ATKINSON et al. 1991; et al., 1995; et al., 2008; GARMSZEGI et al., 2005; MARZAL, et al. 2005; VALKIUNAS, 2005; CLARK et al., 2009). Por meio dos exames laboratoriais em períodos agudos de infecção por *Plasmodium* spp. nas aves, podem ser detectadas em suas amostras anemia hemolítica, leucocitose, linfocitose e hemoglobinúria (GARNHAM, 1966).

Os indivíduos com altas cargas parasitárias de parasitos hemospórideos apresentam-se anêmicas, letárgicas, anoréxicas e com penas eriçadas (ATKINSON et al., 2008; VALKIUNAS, 2005). Outro aspecto importante da infecção por *Plasmodium* é sua relação como fator de seleção natural de populações de aves silvestres, uma vez que estes parasitos podem ter influência direta sobre a biologia das aves, influenciando negativamente na escolha de parceiros sexuais, na construção de ninhos, na busca por alimentos, na defesa de predadores, no deslocamento durante a migração e na resposta imune à outras infecções parasitárias (HAMILTON & ZUK, 1982; VAN RIPER III et al., 1994; KNOWLES et al., 2010; LACOMBE et al., 2013; GARCIA-LONGORIA et al.,

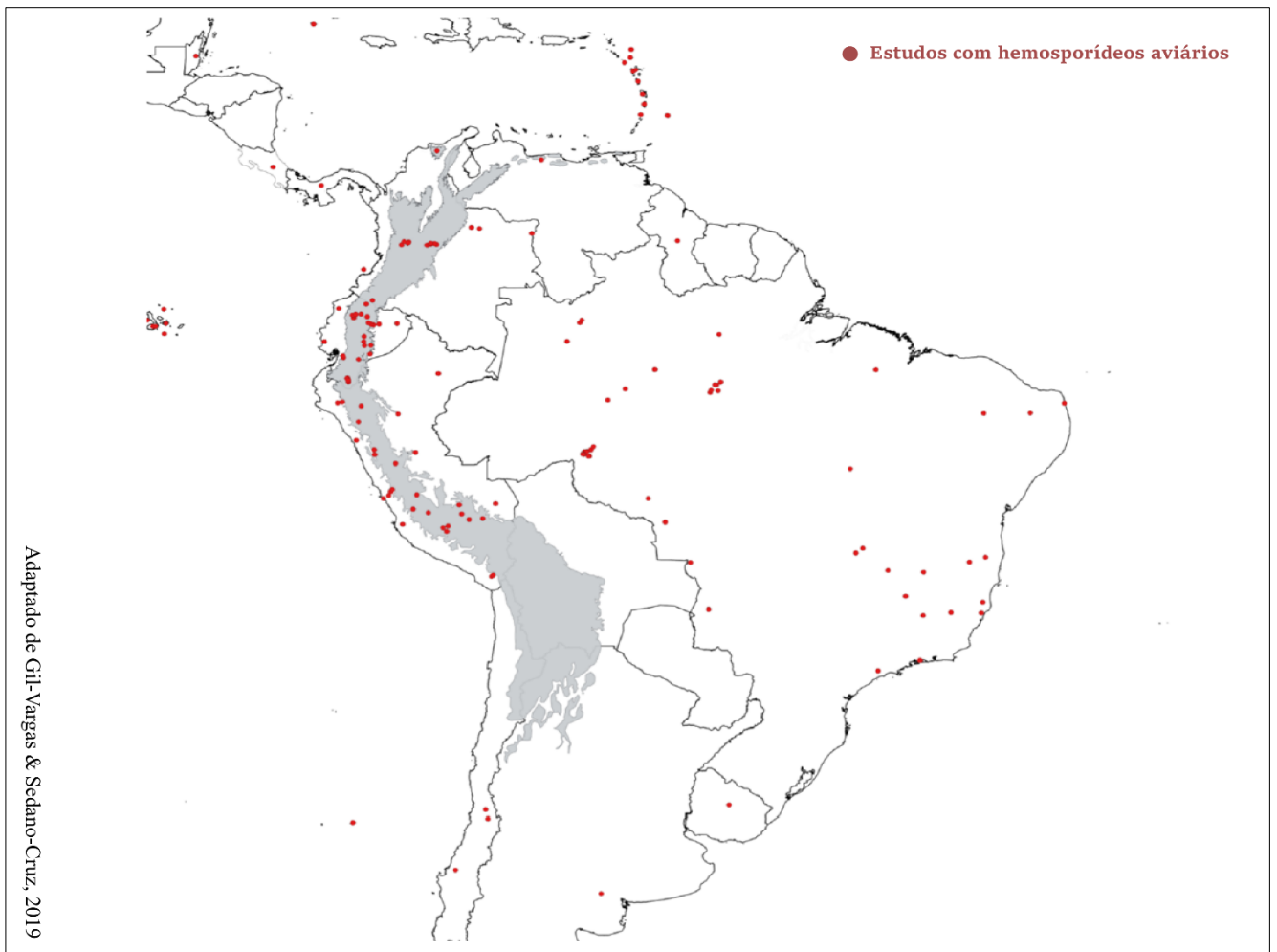


2016a; 2016b; MUKHIN et al., 2016). Contudo, apesar da importância da malária aviária sobre a saúde das aves silvestres, a patogenicidade e os efeitos da doença são desconhecidos para a maioria das espécies de aves, uma vez que 90% dos estudos experimentais com a doença são realizados em espécies domésticas (menos de 0,1% das espécies de aves), resultando em uma grande lacuna de conhecimento (VALKIUNAS, 2005). Neste cenário, alguns estudos epidemiológicos na área vêm mostrando os impactos da malária aviária sobre as espécies de aves silvestres, sugerindo um potencial devastador da doença sobre populações inteiras de aves silvestres e já sendo notados em todo mundo problemas de conservação de espécies, tendo a malária aviária como agente principal (ATKINSON et al., 1991; LAPOINTE et al., 2012; LIAO et al., 2017; FILLION et al., 2022; INGS & DENK, 2022; MIRANDA PAES et al., 2022;)

## **2.7 Estudos sobre o hemosporídeos em aves no Brasil**

O estudo sobre os hemosporídeos aviários no Brasil tem início em 1907 com as contribuições do pesquisador Henrique Aragão sobre ciclo biológico de *Haemoproteus columbae* em pombos-domésticos e desde então diversos estudos registram parasitos hemosporídeos em aves da grande biodiversidade brasileira (BRAGA et al., 2011; SÁ, 2011) em várias regiões do país (Figura 3). O histórico dos estudos com *Plasmodium* spp. no Brasil, assim como em todo mundo, possui duas fases: uma primeira anterior às técnicas de biologia molecular, antes dos anos 2000, e uma segunda depois dos anos 2000. Na primeira fase, na qual as ferramentas morfológicas prevaleciam, grande parte dos estudos da área se ocupou em registros de ocorrência locais de hemoparasitos e tentativas de revelar padrões de prevalência das infecções desses parasitos. Nesse período, destacam-se alguns estudos: LUCENA (1941) publicou a primeira revisão sobre a ocorrência de hemoparasitos em aves para a região Neotropical, onde estavam compilados registros infecção em mais de 100 espécies de aves brasileiras; LAINSON et al., (1970) realizam o primeiro estudo em aves da região Amazônica e os primeiros registros da prevalência *Plasmodium* spp.; No sudestes do Brasil: BENNET e LOPES (1980) estudaram 3.449 aves de 195 espécies e encontraram prevalência de 1,8% para *Plasmodium* spp.; e WOODWORTH-LYNAS et al. (1989), amostraram um total de 15.574 aves silvestres, onde foi registrada uma prevalência de 7,5% para o gênero *Plasmodium*.

Com o passar dos anos e implementação das técnicas de PCR e sequenciamento genético os estudos sobre *Plasmodium* no Brasil aumentam consideravelmente em



**Figura 3.** Locais de amostragem dos estudos com hemosporídeos aviários na América do Sul. Os pontos vermelhos indicam a localização geográfica. Adaptado de GIL-VARGAS e SEDANO-CRUZ (2019).

número chegando a sua segunda fase (depois dos anos 2000). Nessa nova fase, já com as novas ferramentas implementadas e difundidas, os estudos com *Plasmodium* no Brasil começaram a revelar um alta diversidade de linhagens genéticas do parasito (BENSCH, et al., 2009; BRAGA, et al., 2011). Na segunda fase dos estudos sobre *Plasmodium* no Brasil, além da riqueza e diversidade de linhagens geradas de forma exponencial, as novas ferramentas também foram aplicadas à estudos ecológicos, epidemiológicos e de conservação, inclusive com aves silvestres cativas e novas regiões e biomas (RIBEIRO et al., 2005; FECCHIO et al. 2007; 2011; 2013; 2017; 2019; BELO et al., 2009; 2011; SEBAIO et al., 2010; 2012; LACORTE et al. 2013; SVENSSON-COELHO et al., 2013; CHAGAS et al. 2015; 2017; TOSTES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; 2019; CEDROLA et al., 2021; BARINO et al., 2021). Para a Mata Atlântica alguns estudos

merecem destaque: SEBAIO et al. (2010), avaliando a relação entre a prevalência de hemossporídeos em aves e qualidade do hábitat; RIBEIRO et al. (2005), correlacionando características biológicas e comportamentais dos hospedeiros e a prevalência por hemossporídeos; LACORTE et al. (2013), registrando alta diversidade de linhagens de *Plasmodium* e a alta prevalência do parasito na Mata Atlântica; e ANJOS et al. (2021) descrevendo *Haemoproteus nucleocentralis*, uma nova espécie de parasito hemossporídeo em hospedeiros da espécie *Tangara desmaresti*, ambos endêmicos da Mata Atlântica.

## **2.8 Diversidade e endemismo nas montanhas da Mata Atlântica**

A Mata Atlântica Brasileira, mesmo sendo um dos ambientes mais ameaçados do planeta, ainda é reconhecidamente um dos grandes centros de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000). Neste contexto o relevo é um dos fatores com grande influência sobre a diversidade e riqueza de espécies no bioma (JENKINS et al., 2015). Na Mata Atlântica Sudeste culminam seis dos dez pontos mais altos do Brasil, nas regiões da Serra da Mantiqueira, Serra do Caparaó e Maciço Fluminense, destacando-se o Pico da Bandeira com 2890 metros acima do nível do mar (IBGE, 2006). Os ambientes montanos oferecem condições ambientais muito distintas em relação às áreas de baixada e por conta dessa diferença apresentam acentuado nível de endemismo (KORNER & SPEHN, 2002). O fator mais influente sobre o alto nível de endemismo das montanhas da Mata Atlântica é isolamento geográfico proporcionado por estes ambientes, onde, os organismos com o passar do tempo acumulam adaptações exclusivas frente às espécies das planícies circundantes ocorrendo interrupções nos intercâmbios bióticos e iniciando uma ruptura populacional, que pode resultar em especiação (GRAHAM et al., 2014). Dessa forma, com as restrições do fluxo gênico e a conectividade reduzida entre indivíduos é possível a aplicação da teoria especiação através da biogeografia de ilhas, onde os processos de diversificação das espécies nas montanhas da Mata Atlântica ocorrem de formas semelhantes ao de ilhas oceânicas (MACARTHUR e WILSON, 1967).

Historicamente, a compreensão sobre a distribuição de um organismo baseia-se em relatos feitos por diversos estudos ao longo do tempo. Neste contexto, um grande problema para o entendimento da distribuição das espécies são as regiões pouco amostradas pela ciência, como as áreas montanhosas. Para estas regiões, que na maioria das vezes são locais isolados ou de difícil acesso, novas amostragens sempre contribuem para interpretações inéditas, principalmente sobre espécies raras e crípticas que

difícilmente são contempladas em estudos por conta dificuldade em acessá-las. Os topos de montanha do leste brasileiro apesar de serem investigados por naturalistas desde o século 17 (VASCONCELOS e RODRIGUES, 2010) guardam espécies cuja diversidade e biologia ainda não foram totalmente revelados. A complexa geografia dessas áreas dificulta o acesso de pesquisadores, tornando os estudos raros e esparsos e somando-se a isso, os estudos ornitológicos realizados nas montanhas da Mata Atlântica, mesmo acontecendo ao longo de mais de um século, são poucos e baseados na maioria das vezes em métodos de observação para a obtenção dos registros de ocorrência, sendo inexistentes estudos onde ocorrem capturas das aves e assim inviabilizando possíveis estudos com hemoparasitos (VASCONCELOS e RODRIGUES, 2010; CHAVES, 2015). Contudo, as mesmas forças que dificultam os pesquisadores a obterem dados nestes locais, tornam estes ambientes ricos em espécies raras e endêmicas e dessa forma, quando estas regiões especiais são acessadas por especialistas, geralmente novos dados são somados às espécies que ali ocorrem.

## CAPÍTULO 1

### **3 DESCRIÇÃO DE *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni* sp. nov. EM *Rhopias gularis* (Passeriformes, Thamnophilidae) NAS MONTANHAS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA**

## RESUMO

A Mata Atlântica é um dos grandes “hotspots” de biodiversidade e endemismo de espécies do mundo. Um dos fatores responsáveis por gerar tanta diversidade é o relevo. As montanhas oferecem condições ambientais muito distintas em relação às áreas circundantes além de forte isolamento geográfico, resultando em altas taxas de endemismo. Os estudos sobre a biodiversidade em montanhas da Mata Atlântica já revelaram a presença de diversas espécies, porém ainda não se conhece a diversidade de hemosporídeos aviários nesses locais. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade de parasitos do gênero *Plasmodium* em aves silvestres das montanhas da Mata Atlântica e, através dos resultados obtidos, descrever uma nova espécie de *Plasmodium* utilizando análises morfológicas e filogenéticas. Foram amostradas 621 aves em altitudes de 700 a 2500 metros acima do nível do mar. A prevalência de *Plasmodium* sp. registrada foi 4,25% (26/521). Em uma ave da espécie *Rhopias gularis* amostrada nas montanhas do Parque Nacional do Itatiaia foi possível caracterizar e descrever uma nova espécie de parasito da malária aviária, *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni*. A nova espécie apresentou como características: a presença de um único grande grânulo de pigmento hemozoínico redondo nos trofozoítos e merontes; formato de “leque” nos merontes eritrocitários; Gametócitos alongados com aparência levemente granulada; e posição central/subcentral dos núcleos nos gametócitos. A topologia recuperada pelas análises filogenéticas sugere o agrupamento da nova espécie com espécies de *Plasmodium* do subgênero *Novyella*, como grupo externo do clado. Neste estudo a soma de métodos morfológicos e filogenéticos permitiu a descrição de uma nova espécie de parasito da malária aviária em locais com alto nível de endemismo. Através dos resultados obtidos enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade de global de *Plasmodium* e das espécies de hemosporídeos da Mata Atlântica.

**Palavras-chave:** Haemosporida; endemismo; morfometria; *cyt-b*; aves silvestres.

## ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the great “hotspots” of biodiversity and species endemism in the world. One of the factors responsible for generating so much diversity is the relief. The mountains offer very different environmental conditions in relation to the surrounding areas, in addition to strong geographic isolation, resulting in high rates of endemism. Studies on biodiversity in mountains of the Atlantic Forest have already revealed the presence of several species, but the diversity of avian hemosporidia in these places is still unknown. Thus, the objective of the present study was to investigate the diversity of parasites of the genus *Plasmodium* in wild birds in the mountains of the Atlantic Forest and, through the results obtained, to describe a new species of Plasmodium using morphological and phylogenetic analyses. 621 birds were sampled at altitudes from 700 to 2500 meters above sea level. The prevalence of *Plasmodium* sp. recorded was 4.25% (26/521). In a bird of the species *Rhopias gularis* sampled in the mountains of the Itatiaia National Park, it was possible to characterize and describe a new species of avian malaria parasite, *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni*. The new species presented the following characteristics: the presence of a single large round pigment granule in trophozoites and meronts; “fan” shape in erythrocyte meronts; Elongated gametocytes with slightly granulated appearance; and central/subcentral position of nuclei in gametocytes. The topology recovered by the phylogenetic analyzes suggests the grouping of the new species with *Plasmodium* species of the subgenus *Novyella*, as an outgroup of the clade. In this study, the sum of morphological and phylogenetic methods allowed the description of a new species of avian malaria parasite in places with a high level of endemism. Through the results obtained, we enriched our knowledge about the global diversity of *Plasmodium* and the Atlantic Forest species.

**Keywords:** Haemosporida; endemism; morphometry; *cyt-b*; wild birds.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A Malária aviária é uma doença causada por hemoparasitos do gênero *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Haemosporida) (GARNHAM, 1966). Esta doença pode causar em seus hospedeiros anemia, letargia, inapetência sexual e fadiga e, em casos mais agudos, hepato e esplenomegalia e bloqueio de capilares que podem ser letais para o hospedeiro infectado (ATKINSON et al., 1991; et al., 1995; et al., 2008; GARMSZEGI et al., 2005; VALKIUNAS, 2005; MARZAL et al. 2005, CLARK et al., 2009;). Os impactos da malária aviária sobre as espécies de aves, principalmente as silvestres, tem mostrado o potencial patogênico de parasitos do gênero *Plasmodium* sobre seus hospedeiros e problemas de conservação de espécies. (LAPOINTE et al., 2012; LIAO et al., 2017; FILLION et al., 2022; INGS & DENK, 2022; MIRANDA PAES et al., 2022). *Plasmodium* possui como vetores envolvidos em seu ciclo de vida mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Culiseta* (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). Por conta da diversidade de espécies de vetores capazes de transmitir espécies de *Plasmodium*, a Malária aviária é uma considerada cosmopolita, com registros de ocorrência em aves de diversas espécies em todas as regiões do planeta, com exceção da Antártica (VALKIUNAS, 2005; BENSCH et al., 2009).

O gênero *Plasmodium* atualmente possui 55 espécies válidas distribuídas em 5 subgêneros: *Huffia*, *Haemamoeba*, *Bennettinia*, *Giovannolaia* e *Novyella* (VALKIUNAS e IEZHVA, 2018). Cada subgênero de *Plasmodium* apresenta características distintas quanto à patogenicidade, genética, distribuição e principalmente quanto à morfologia das formas de desenvolvimento do parasito (VALKIUNAS, 2005). A classificação taxonômica das espécies de *Plasmodium* baseada em caracteres morfológicos descritos somente através de esfregaços sanguíneos foi o padrão-ouro para a área de estudo até recentemente, quando os estudos de PCR e sequenciamento genético do gene *cyt-b* começaram a adicionar novas informações para a diversidade deste grupo de parasitos (MARTINSEN et al. 2006; OUTLAW & RICKLEFS, 2014). Porém, a identificação de *Plasmodium* através de técnicas morfológicas exige alto grau de experiência para detectar o parasito (infecções em baixa intensidade são comuns) e diferenciar as espécies nos seus diferentes estágios de desenvolvimento (trofozoítos, merontes eritrocitários, macro e microgametócitos) (VALKIUNAS, 2005). Atualmente, as perspectivas futuras para a área de estudo indicam a combinação de métodos morfológicos e métodos



moleculares/filogenéticos como a melhor forma de acessar as espécies de *Plasmodium* que ocorrem em aves (FECCHIO et al., 2020; BRAGA et al., 2011; MANDAL 2021).

Apesar da grande contribuição dos métodos moleculares para o entendimento da diversidade de *Plasmodium* spp., a utilização em larga escala destes métodos em detrimento das técnicas morfológicas tem gerado cada vez mais sequências genéticas de *Plasmodium* não relacionadas às espécies do parasito (MalAvi, 2022). O banco de dados específico de hemosporídeos aviários (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) MalAvi (BENSCH et al., 2009) registra 1443 linhagens do gene *cyt-b* de *Plasmodium* spp. onde somente 44 tem suas espécies identificadas. Dessa forma, há uma grande lacuna para a compreensão da diversidade de parasitos do gênero *Plasmodium*, e esta lacuna torna-se maior em regiões onde houve pouca amostragem como as regiões tropicais (CLARK et al., 2014). Atualmente, os estudos realizados nessas regiões que abordam os métodos morfológicos e moleculares para a diversidade de hemosporídeos em aves silvestres, têm revelado grande potencial para a descrição de novas espécies de *Plasmodium*, principalmente em regiões Neotropicais como os casos de *P. unalis* (MANTILLA et al., 2013) e *P. homopolare* (WALTHER et al., 2014).

Regiões Neotropicais são reconhecidamente ricas em número de espécies de diversos grupos de organismos também têm potencial para abrigar uma grande diversidade de *Plasmodium* spp., uma vez que apresentam grande diversidade de espécies hospedeiras (HAFFER, 1990), potenciais vetores (CHATURANGA et al., 2018) e grande heterogeneidade de ambientes (JENKINS et al., 2015), tais como as montanhas Andinas e a Mata Atlântica. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade de *Plasmodium* em aves silvestres de ambientes montanos da Mata Atlântica Brasileira utilizando caracteres morfológicos, seguido de PCR, sequenciamento de um fragmento do gene *cyt-b* e análise filogenética.

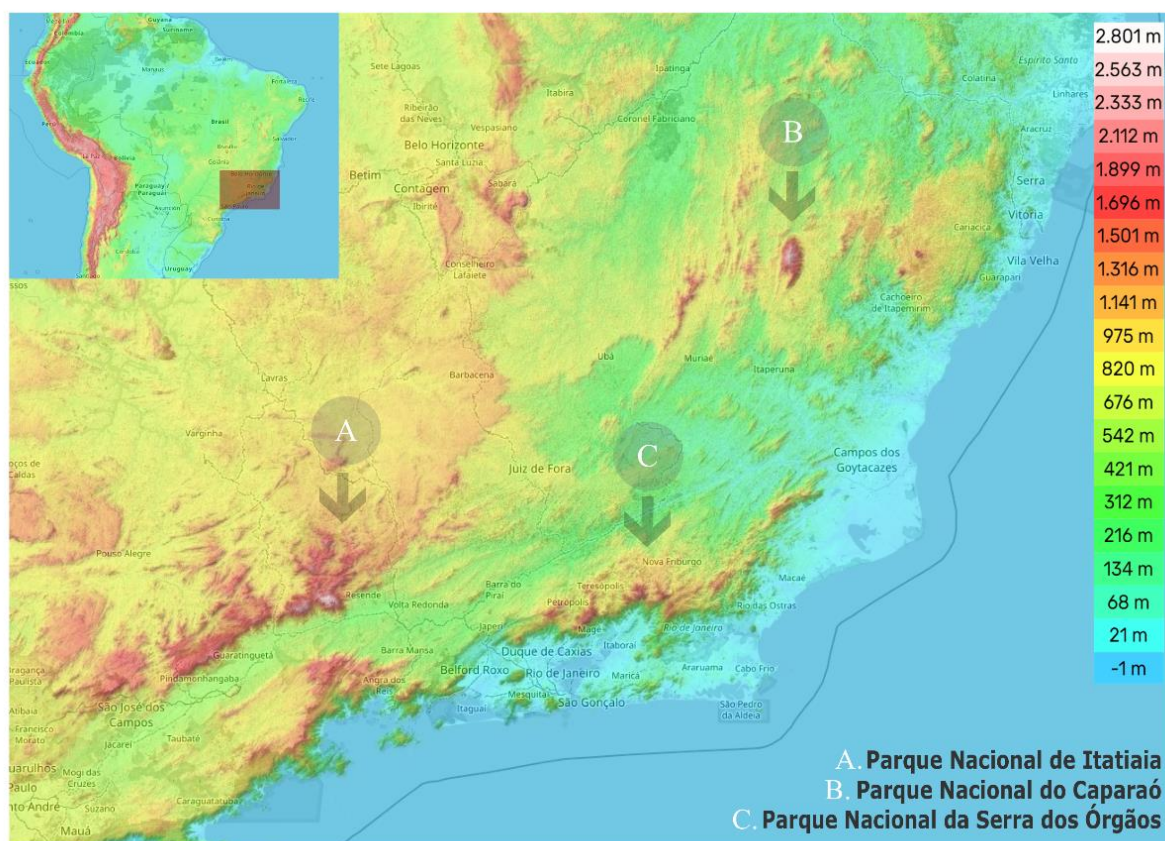
## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostragem

Com o objetivo de estimar o tamanho da amostra de aves nos três locais de coleta assumiu-se como parâmetro uma população infinita para um nível de esperada de 50%, erro amostral de 5% e nível de significância de 95%. Para tal foi utilizada a seguinte fórmula proposta por SAMPAIO et al. (2002):

$$N = \frac{p(1-p) \times \alpha^2}{d^2}$$

Sendo: N = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita; p = prevalência esperada (50%); quando não se conhece a prevalência de hemossporídeos em aves na região estudada, admitisse o valor da prevalência esperada em 50% para obter o maior número amostral possível;  $\alpha^2$  = Valores críticos associados ao grau de significância (1,96); ed = erro amostral. Após aplicação da referida fórmula, obteve-se um número amostral de 384 aves. Foram coletadas no total 621 aves, satisfazendo assim o número amostral mínimo. As coletas foram realizadas de forma não probabilística nas áreas de estudo.



**Figura 1.** Mapa altimétrico representando os locais de amostragem do presente estudo na região Sudeste do Brasil: A – Parque Nacional do Itatiaia; B – Parque Nacional do Caparaó; C – Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

A amostragem ocorreu entre janeiro de 2020 e setembro de 2022 em 3 Unidades de Conservação Federais situadas no sudeste do Brasil, são elas: Parque Nacional do Caparaó ( $20^{\circ} 26' 5''$  S,  $41^{\circ} 47' 2''$  W), Parque Nacional de Itatiaia ( $22^{\circ} 22' 31''$  S,  $44^{\circ} 39' 44''$  W) e Parque Nacional da Serra dos Órgãos ( $22^{\circ} 29' 35''$  S,  $43^{\circ} 4' 24''$  W) (Figura 1). Os locais de amostragem são representados por regiões montanhosas inseridas no bioma Mata Atlântica, onde foram realizadas coletas de aves silvestres entre 700 e 2500 metros de altitude acima do nível do mar. A captura das aves foi realizada por meio de redes ornitológicas (12 m de comprimento por 3m de altura e malha de 16 mm), estendidas desde antes do nascer do sol (~5:30am) até o meio do dia (~1:00pm). A vistoria das capturas nas redes ocorria em intervalos de 15-20 minutos para a retirada dos indivíduos. As aves capturadas foram contidas individualmente em sacos de algodão, levadas à base de amostragem e mantidas em local fresco e sombreado até o momento da triagem. Durante a triagem todas as aves foram medidas, pesadas, examinadas fisicamente e fotografadas para a identificação através dos guias de campo SIGRIST (2014).

Para a obtenção das amostras de sangue, as aves foram contidas manualmente para o extravasamento da veia braquial da asa realizada com agulha estéril. Parte do sangue obtido foi utilizado para a preparação de esfregaços sanguíneos (entre 3 e 5) e o restante foi coletado diretamente em cartões de papel (Whatman FTAcards®) para as análises moleculares. Os cartões de papel contendo as amostras de sangue foram isolados imediatamente em embalagens herméticas modelo “zip-lock”. O volume de sangue coletado em nenhum caso excedeu 1% do peso vivo total do animal. Após os procedimentos de coleta de sangue, todas as aves tiveram seus sinais vitais checados e foram liberadas imediatamente na natureza. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Juiz de Fora (protocolo nº 031/2017), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo nº 4863180222) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 68906-1/2020).

### **3.2.2 Análises morfológicas**

Para as análises microscópicas, os esfregaços sanguíneos foram secados ao ar imediatamente após sua confecção e em seguida foram fixados em metanol absoluto durante 3 minutos. Após a fixação em campo os esfregaços sanguíneos foram levados ao laboratório e corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em água destilada na proporção de 1:9 durante 40 minutos. A detecção dos parasitos nos esfregaços foi realizada em microscópio de luz Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan) sendo analisados 100 campos microscópicos em ampliação de 1000X para cálculo da prevalência e parasitemia. Os valores de prevalência foram calculados de acordo com BUSH et al. (1997) e o cálculo da parasitemia (intensidade da infecção) foi feito seguindo o método de GODFREY et al. (1987).

A obtenção das imagens das formas evolutivas de *Plasmodium* spp. foi realizada em microscópio de luz Olympus BX-51 DIC (Olympus, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital Olympus DP73. A morfometria das formas evolutivas de *Plasmodium* spp. foi realizada no software ImageProPlus 8.0 utilizando as características taxonômicas propostas por VALKIUNAS (2005) e VALKIUNAS e IEZHOVA (2018).

### **3.2.3 Análises moleculares**

Para a extração de DNA das amostras coletadas foi retirado um punch (6mm) do cartão de papel contendo sangue da ave. A extração total de DNA foi realizada por Kit de

Extração de DNA Wizard® Genomic (Promega®, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração de DNA total e a pureza das amostras foi quantificada através de espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras extraídas foram padronizadas na concentração de 20ng/μL. Para estimativa da pureza das amostras foram realizadas leituras da absorvidade nos comprimentos de onda 230, 260 e 280nm. A pureza do DNA foi determinada pela razão de absorbâncias 260/280. As amostras extraídas e padronizadas foram estocadas à -80°C.

A detecção de *Plasmodium* spp. foi realizada a partir da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (*cyt-b*) através de nested PCR. Para a primeira reação foram utilizados os primers gerais de hemosporídeos aviários (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.) HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'), que amplificam aproximadamente 618 pares de base (pb) (HELLGREN et al., 2004). A reação foi realizada em um volume final de 25μL, contendo: 1X de Tampão de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), 1U de Platinum™ Taq DNA Polimerase, 0,4 mM de dNTP, 1,0 μM de cada primer, 3mM de MgCl<sub>2</sub> e 2μL (aproximadamente 40ng) de DNA genômico da amostra.

Para a segunda reação foram utilizados os primers específicos para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplificam aproximadamente 525 pb do gene *cyt-b* (HELLGREN et al., 2004). A reação de nPCR foi realizada utilizando as mesmas concentrações de reagentes da primeira reação, com exceção da concentração de primers que foi modificado para 0,6 μM. As condições de termociclagem de ambas as reações foram: 94°C por 5 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.

Para controle negativo das amostras foi utilizada água ultrapura. O DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* extraído a partir de cultivo celular foi utilizado como controle positivo. Todos os produtos resultantes da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Blue Green Loading Dye I (Biotecnologia LGC, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob luz ultravioleta. Os amplicons de PCR das amostras positivas foram purificados usando o Kit QIAquick®

Purification (Qiagen®, São Paulo, Brasil) e submetidos ao sequenciamento bidirecional com os iniciadores HaemF/HaemR2 (HELLGREN et al., 2004), no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante.

### 3.2.4 Análises filogenéticas

As análises de Reconstruções Filogenética foram realizadas utilizando dois conjuntos de dados contendo sequencias genéticas curadas do gene *cyt-b* de *Plasmodium* e as seqüências obtidas neste estudo. O primeiro conjunto de dados foi formado por todas as seqüências relacionadas a espécies válidas de *Plasmodium* segundo VALKIUNAS e IEZHOVA (2018). O segundo conjuntos de dados continha 1468 sequencias do gene *cyt-b* de *Plasmodium* disponíveis no banco de seqüências MalAvi (BENSCH et al. 2009) em novembro de 2022. Como grupo externo foram escolhidas sequencias de *Haemoproteus columbae* (HAECOL01) e *Haemoproteus syrnii* (STAL2) também obtidas através do banco de dados MalAvi.

Os dois conjuntos de dados foram alinhadas no software MAFFT (KATOHO et al., 2019) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas com a plataforma Gblocks (TALAVERA & CASTRESANA, 2007), obteve-se uma matriz com aproximadamente 479 pb. A inferência das relações filogenéticas de *Plasmodium* foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança 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) em ambos os conjuntos de dados. Os valores de suporte dos clados foram avaliados com o critério de auto-convergência de bootstrap do RaxML (STAMATAKIS, 2014) com 649 pseudo-replicatas para o primeiro conjunto de dados e 499 pseudo-replicatas para o segundo conjuntos de dados.

### 3.3 RESULTADOS

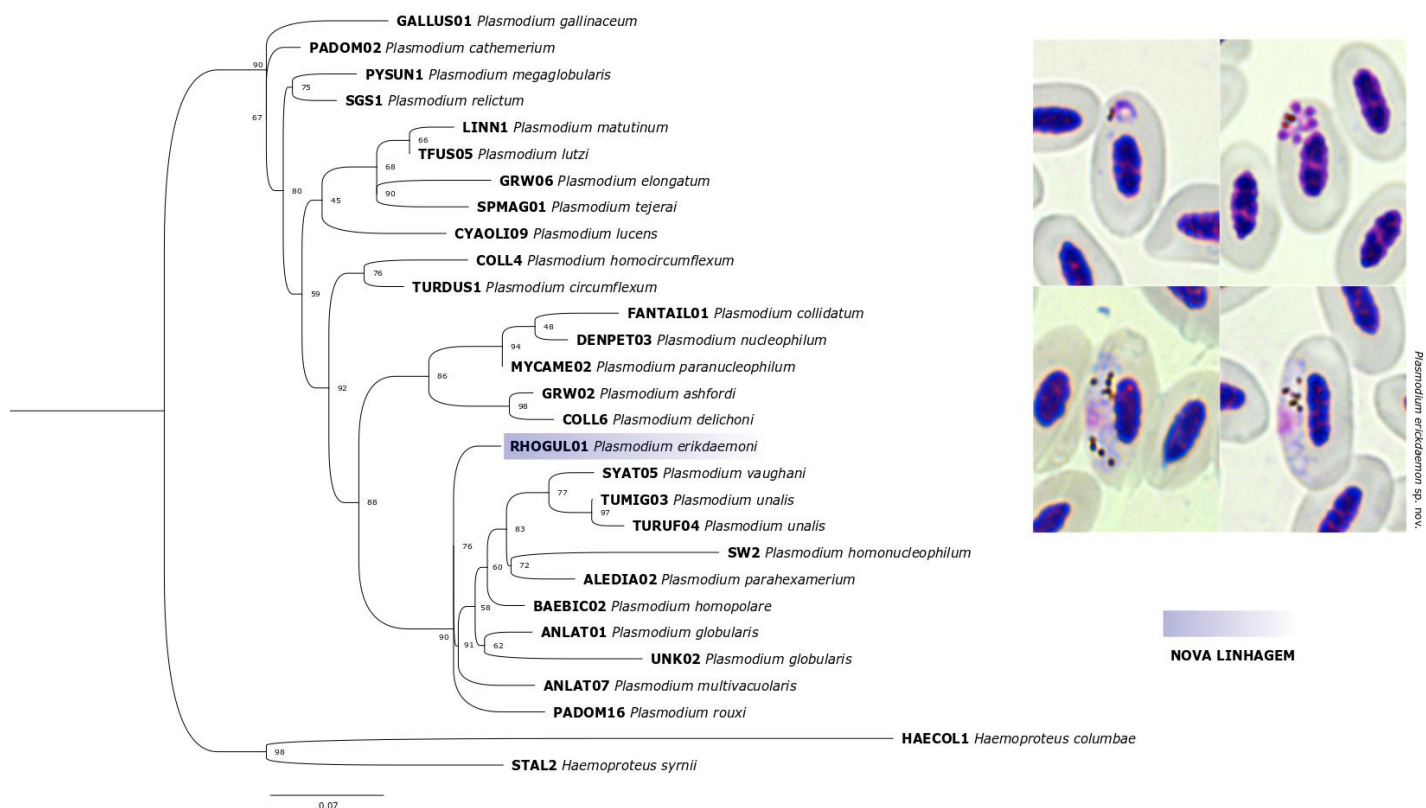
#### 3.3.1 Análises dos esfregaços sanguíneos

Das 621 aves amostradas (Anexo 1), 26 apresentaram infecção por *Plasmodium* spp. nas análises dos esfregaços sanguíneos, sugerindo uma prevalência de 4,25% na população de hospedeiros amostrados. A maioria das amostras positivas para *Plasmodium* registradas nas análises microscópicas apresentaram baixa parasitemia com trofozoítos sendo a forma mais frequente. A parasitemia média registrada foi de 0,03%.

Apenas em uma das amostras da espécie *Rhopias gularis* (Spix, 1825) (Anexo 2) entre os 16 indivíduos capturados desta espécie apresentou todas as formas evolutivas de *Plasmodium* em alta parasitemia (0,49%). Em todos os esfregaços, foi possível recuperar os caracteres morfológicos e morfométricos do parasito (meronte, macrogametócito e microgametócito) permitindo a caracterização (Tabela 1). As características morfológicas como trofozoítos e merontes eritrocitários com citoplasma escasso; merontes totalmente desenvolvidos menor que o núcleo de eritrócitos infectados e gametócitos alongados sugerem a classificação da espécie de *Plasmodium* no subgênero *Novyella*.

#### 3.3.2 Análises filogenéticas

Nos resultados das análises filogenéticas com o primeiro conjunto de dados contendo todas as morfoespécies de *Plasmodium* a nova linhagem, RHOGUL01, não se agrupou com nenhuma das espécies de *Plasmodium* já descritas, posicionando-se externamente ao clado contendo as espécies do subgênero *Novyella*: *Plasmodium globularis*, *Plasmodium homopolare*, *Plasmodium unalis*, *Plasmodium vaughani*, *Plasmodium homonucleophilum* e *Plasmodium parahexamerium*, *Plasmodium multivacuolaris* e *Plasmodium rouxi* (Figura 2). Na segunda reconstrução filogenética, contendo o conjunto de dados com todas as sequências do gene *cyt-b* disponíveis de *Plasmodium*, a nova linhagem obtida também não se associou a nenhuma morfoespécie de *Plasmodium*. A linhagem RHOGUL01 agrupou-se com outras linhagens de *Plasmodium* sp. encontradas em diferentes espécies de hospedeiros na América do Sul. São elas: COLIN08, COPIL02, SPMAG08, PYLEU05 e TULEU02 (Tabela 2).



**Figura 2:** Reconstrução filogenética baseada em um fragmento de 469 pares de base do gene *cyt-b* de espécies do gênero *Plasmodium*. O método de reconstrução filogenética foi o Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo GTR + G + I. O método de bootstrap com 649 pseudo-réplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Haemoproteus columbae* (HAECOL01) e *Haemoproteus syrnii* (STAL2) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software RaxML. Barra representa 7 substituições por posições de 100 nucleotídeos.

### 3.3.1 Descrição do parasito

#### Trofozoítos

Os trofozoítos foram registrados somente em eritrócitos maduros (n = 30) (Figura 3 A-D). A influência dos trofozoítos é pronunciada, sendo possível notar o deslocamento do núcleo da célula hospedeira até mesmo quando formas mais jovens de desenvolvimento foram observadas (Figura 3 A). Nos trofozoítos a forma de “anel” é rara e foi notada em poucos casos. A posição dos trofozoítos nas células hospedeiras varia de polar à subpolar, sendo a forma polar a mais comum, principalmente nas formas mais desenvolvidas (Figura 3 C). Os trofozoítos imaturos apresentam formato redondo enquanto os trofozoítos mais desenvolvidos apresentam formato variado, desde o formato de “vírgula” até o formato ameboide (Figura 3 B). Nos trofozoítos de *P. erikdaemoni* é possível notar



o citoplasma marcado e um pequeno núcleo. No citoplasma é possível notar em alguns casos a presença de pequenos vacúolos. A presença de grânulos de pigmento hemozoínico é notada desde as formas de desenvolvimento mais jovens e geralmente é localizada em uma das extremidades do trofozoíto. Nas formas mais desenvolvidas é possível notar conjuntos de pequenos grânulos agrupados (Figura 3 A). Também é possível notar a presença de um pequeno glóbulo azul geralmente associado aos grânulos de pigmento hemozoínico (Figura 3 B).

### **Meronte eritrocítico**

Os merontes eritrocíticos foram registrados exclusivamente em eritrócitos maduros (Figura 6 E-H). Casos de expulsão do núcleo da célula hospedeira foram notadas regularmente, sendo registrada a manutenção do parasito mesmo após o rompimento do eritrócito (Figura 3 H). Os merontes apresentaram o “formato de leque” típico das espécies do subgênero *Novyella* (Figura 3 F). Os núcleos geralmente estão dispostos irregularmente em merontes maduros. A maioria dos merontes totalmente desenvolvidos apresentam seis merozoítos, mas merontes em fases de desenvolvimento mais jovens foram notados com cinco merozoítos. A posição dos merontes desenvolvidos é geralmente polar em relação aos núcleos dos eritrócitos (Figura 3 F e G), sendo notada forte influência do parasito sobre o deslocamento do núcleo da célula hospedeira (Tabela 1).

Em poucos casos foi notado o contato dos merontes com o núcleo do eritrócito. O citoplasma dos merozoítos que compõem o meronte eritrocitário, na maioria dos casos é hialino, sendo notado somente em formas mais desenvolvidas corado de rosa. Os núcleos apresentaram tamanho variável, com o tamanho sendo aumentado à medida que o parasito se desenvolve. Os merontes contêm regularmente a presença de um destacado grânulo de pigmento marrom com tamanhos semelhantes aos núcleos dos dos merozoítos que compõem o meronte.

### **Macrogametócito**

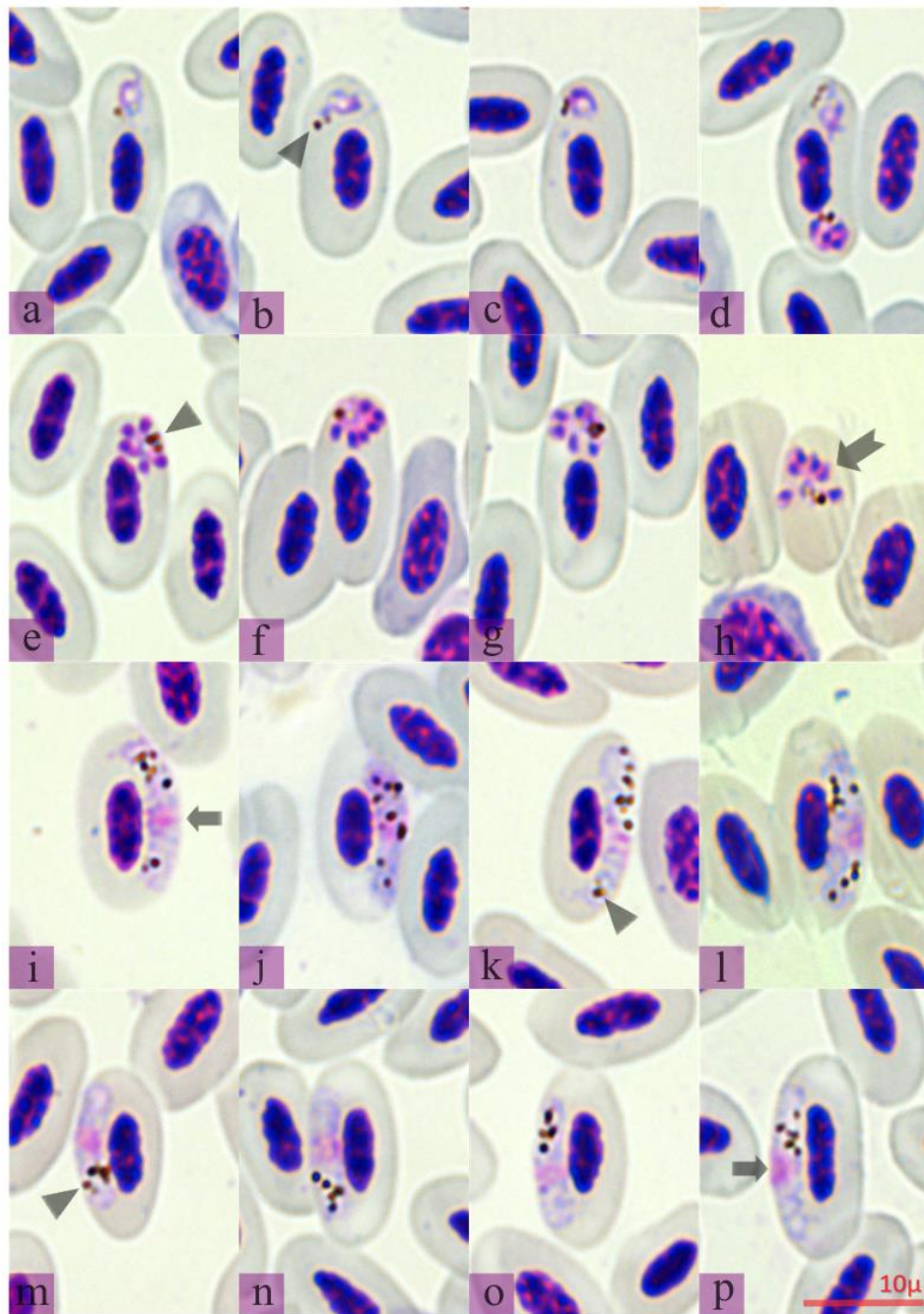
Os macrogametócitos de *P. erikdaemoni* desenvolvem-se exclusivamente em eritrócitos maduros (Figura 3 I-L). A influência dos macrogametócitos sobre a morfologia das células hospedeiras infectadas é pouco pronunciada nas formas imaturas, mas os macrogametócitos maduros deslocam lateralmente os núcleos dos eritrócitos infectados (Tabela 1). Os macrogametócitos se desenvolvem lateralmente em relação aos núcleos

dos eritrócitos infectados e geralmente aderem à parede externa da célula hospedeira se estendendo ao longo dos núcleos (Figura 3 K). As formas maduras fazem contato com o núcleo do eritrócito pela parte central dos macrogametócitos, apresentando as extremidades citoplasmáticas polares livres. As extremidades do macrogametócitos desenvolve-se em direção aos polos dos eritrócitos.

O citoplasma dos macrogametócitos de *P. erikdaemoni* é levemente granular apresentando leves inclusões globulares azuladas ( $\sim 0,5\mu$ ) dispersas por todo corpo do parasito (Figura 3 K). O núcleo do macrogametócito possui textura relativamente granulada e irregular com limites pouco definidos e uma posição central (Figura 3 I). A coloração apresentada pelos macrogametócitos é levemente azulada. Nos macrogametócitos é possível notar grânulos de cromatina amplamente distribuídos e normalmente associados ao núcleo do parasito (Figura 3 J). O número de grânulos variou de 5 a 8 (Tabela 1). Os grânulos apresentam tamanho variados, sendo registrados tamanhos entre  $0,3\ \mu\text{m}$  e  $1,0\ \mu\text{m}$ . Também foi notada distinta variação nas formas dos grânulos, sendo registradas formas arredondadas e ovais. Em poucos casos foram notados aglomerados de grânulos (Figura 3 J).

### **Microgametócito**

As características gerais da ontogenia e posicionamentos em relação às células hospedeiras dos microgametócitos são semelhantes aos macrogametócitos (Figura 3 M-P). O tamanho dos microgametócitos é ligeiramente menor em relação aos macrogametócitos (Na figura 3 compare as formas L e P) (Tabela 1). A coloração, já pouco definida nos macrogametócitos, é levemente menos intensa nos microgametócitos, apresentando um tom mais róseo e hialino (Figura 3 O). O número de grânulos de hemozoína é inferior ao macrogametócitos, em média 4,4 pigmentos por microgametócito. Estes grânulos apresentam posicionamento polar e subpolar e normalmente mostram-se adensados no citoplasma do parasito (Figura 3 P).



**Figura 3.** *Plasmodium (Novyella) erikdaemoni* sp. nov. (linhagem RHOGUL01) em esfregaços sanguíneos de *Rhopias gularis* corados com Giemsa. (A-D) Trofozoítos; (E-H) Merontes eritrocíticos; (I-J) Macrogametócitos; (M-P) Microgametócitos. Setas simples indicam os núcleos dos parasitos, triângulos indicam grânulos de pigmento hemozoínico e a flecha indica os merozoítos. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

**Tabela 1.** Morfometria das formas eritrócíticas de *P. erikdaemoni* em amostras de *Rhopias gularis* (RHOGUL01). Todas as medidas foram realizadas em micrometros ( $\mu\text{m}$ ). São mostrados valores mínimos, máximos, média e desvio padrão. No total foram mensuradas 25 fotomicrografias de cada forma de desenvolvimento do parasito.

<b>Característica</b>	<b>Medidas</b>
<b>Eritrócito não infectado</b>	
Comprimento	13,6 - 15,4 ( $14,4 \pm 0,48$ )
Largura	6,8 - 8,5 ( $7,6 \pm 0,43$ )
Área	85,0 - 97,4 ( $91,5 \pm 3,55$ )
<b>Núcleo do eritrócito não infectado</b>	
Comprimento	6,7 - 7,7 ( $6,9 \pm 0,42$ )
Largura	2,41 - 3,5 ( $6,9 \pm 0,22$ )
Área	15,3 - 19,5 ( $17,3 \pm 1,16$ )
<b>Meronte</b>	
Comprimento	4,4 - 6,4 ( $5,5 \pm 0,47$ )
Largura	3,7 - 4,9 ( $4,4 \pm 0,26$ )
Área	19,3 - 23,7 ( $21,8 \pm 1,25$ )
Nº de merozoítos	6
<b>Macrogametócito</b>	
Comprimento	12,1 - 15,0 ( $13,4 \pm 1,15$ )
Largura	2,6 - 3,6 ( $2,9 \pm 0,33$ )
Área	35,43 - 45,8 ( $42,1 \pm 2,87$ )
Nº de granulos de pigmento	5 - 8 ( $6,6 \pm 0,93$ )
NDR	0,7 - 1,1 ( $0,9 \pm 0,21$ )
<b>Núcleo do Macrogametócito</b>	
Comprimento	3,3 - 4,3 ( $3,7 \pm 0,26$ )
Largura	1,7 - 2,2 ( $2,0 \pm 0,13$ )
Área	5,9 - 7,0 ( $6,4 \pm 0,32$ )
<b>Eritrócito infectado</b>	
Comprimento	15,0 - 18,8 ( $17,5 \pm 0,99$ )
Largura	7,3 - 10,0 ( $9,0 \pm 0,77$ )
Área	98,91 - 143,7 ( $132,0 \pm 12,32$ )
<b>Núcleo do eritrócito infectado</b>	
Comprimento	6,9 - 8,3 ( $7,7 \pm 0,36$ )
Largura	2,6 - 3,6 ( $3,2 \pm 0,29$ )
Área	18,6 - 23,0 ( $21,2 \pm 1,26$ )
<b>Microgametócito</b>	
Comprimento	10,9 - 13,2 ( $12,2 \pm 0,48$ )
Largura	2,3 - 3,9 ( $2,7 \pm 0,34$ )
Área	34,8 - 38,9 ( $36,7 \pm 1,33$ )
Nº de granulos de pigmento	4 - 5 ( $4,4 \pm 0,5$ )
NDR	0,5 - 0,8 ( $0,65 \pm 0,30$ )
<b>Núcleo do Microgametócito</b>	
Comprimento	2,6 - 4,0 ( $3,5 \pm 0,42$ )
Largura	1,8 - 3,0 ( $2,4 \pm 0,36$ )
Área	1,0 - 5,1 ( $4,64 \pm 0,31$ )
<b>Eritrócito infectado</b>	
Comprimento	16,3 - 18,5 ( $17,1 \pm 0,60$ )
Largura	8,15 - 9,49 ( $8,8 \pm 0,34$ )
Área	116,8 - 125,2 ( $120,5 \pm 2,15$ )
<b>Núcleo do eritrócito infectado</b>	
Comprimento	7,0 - 8,3 ( $7,6 \pm 0,33$ )
Largura	2,8 - 3,9 ( $3,1 \pm 0,23$ )
Área	18,6 - 22,0 ( $20,1 \pm 0,80$ )

## Observações

Os caracteres morfológicos de *P. erikdaemoni* foram consistentes entre as formas obtidas no hospedeiro *Rhopias gularis* (Figura 3) (Tabela 1), tendo como caracteres diferenciais da espécie dentro do subgênero *Novyella* o seguinte conjunto: presença de um único grande grânulo de pigmento redondo nos trofozoítos e merontes; formato de “leque” nos merontes eritrocitários (Figura 3 E-G); Gametócitos alongados com aparência pouco granulada (Figura 3 K); posição dos central/subcentral dos núcleos nos gametócitos (Figura 3 I e P); presença de mais de 5 grânulos nos macrogametócitos e nos microgametócitos. As análises filogenéticas indicam proximidade genética de *P. erikdaemoni* (RHOGUL01) com as linhagens COLIN08, COPIL02, SPMAG08, PYLEU05 e TULEU02 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Informações sobre as linhagens filogeneticamente próximas à *Plasmodium erikdaemoni* sp. nov. de acordo com a reconstrução filogenética realizada com o conjunto de dados contendo todas as sequências de *Plasmodium* disponíveis no banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009).

Família e espécie do hospedeiro	Nome da linhagem (MalAvi)	País	Bioma	Referência
<b>Thamnophilidae</b>				
<i>Rhopias gularis</i>	RHOGUL01	Brasil	Mata Atlântica	Presente estudo
<i>Pyriglena leucoptera</i>	PYLEU05	Brasil	Mata Atlântica	Lacorte et al., 2013
<i>Pyriglena leucoptera</i>	SPMAG08	Brasil	Mata Atlântica	Fecchio et al., 2019
<i>Pyriglena leuconota</i>	SPMAG08	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<i>Drymophila caudata</i>	SPMAG08	Peru	Amazônia	Fecchio et al., 2019
<i>Drymophila caudata</i>	SPMAG08	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<b>Conopophagidae</b>				
<i>Conopophaga lineata</i>	COLIN08	Brasil	Mata Atlântica	Lacorte et al., 2013
<b>Thaupidae</b>				
<i>Coryphospingus pileatus</i>	COPIL02	Brasil	Mata Atlântica	Lacorte et al., 2013
<b>Cotingidae</b>				
<i>Pyroderus scutatus</i>	SPMAG08	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<i>Pyroderus scutatus</i>	SPMAG08	Peru	Andes	Fecchio et al., 2019
<b>Dendrocolaptidae</b>				
<i>Xiphorhynchus ocellatus</i>	SPMAG08	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<b>Troglodytidae</b>				
<i>Henicorhina leucophrys</i>	SPMAG08	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<b>Turdidae</b>				
<i>Turdus leucomelas</i>	TULEU02	Brasil	Mata Atlântica	Lacorte et al., 2013
<i>Turdus leucomelas</i>	TULEU02	Brasil	Mata Atlântica	Lacorte et al., 2013
<b>Spheniscidae</b>				
<i>Spheniscus magellanicus</i>	SPMAG08	Brasil	Mata Atlântica	Vanstreels et al., 2015

## Sumário taxonômico

Hospedeiro-tipo: *Rhopias gularis* (Passeriformes, Thamnophilidae).

Sequências de DNA: linhagem *cyt-b* mitocondrial ITA228/RHOGUL01.

Localidade-tipo: Parque Nacional de Itatiaia, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil (22° 22' 31" S, 44° 39' 44" W, 800 metros acima do nível do mar).

Prevalência: A prevalência de *P. erikdaemoni* na espécie de hospedeiro tipo foi de 6,25% (1/16).

Distribuição geográfica: *Plasmodium erikdaemoni* (RHOGUL01) foi encontrado na Mata Atlântica Sudeste do Brasil no Parque Nacional de Itatiaia.

Local de infecção: Eritrócitos maduros.

Espécimes tipo: Lâminas de esfregaços sanguíneos depositadas na Coleção do Laboratório de Protozoologia da UFJF. Número de tombo HP-1950.0 e HP1950.1.

Etimologia: O nome da espécie rende homenagem ao Parasitologista brasileiro Erik Daemon de Souza Pinto.

## 3.4 DISCUSSÃO

### 3.4.1 Análises dos esfregaços sanguíneos

A prevalência de *Plasmodium* spp. registrada nos indivíduos amostrados foi de 4,25% (n= 26/621). Os padrões de prevalência de *Plasmodium* spp. são altamente variáveis apresentando diferentes valores ao redor do globo (VALKIUNAS, 2005). Como *Plasmodium* é um parasito reconhecidamente cosmopolita, tanto em relação aos locais de ocorrência tanto quanto as espécies de hospedeiros em que se desenvolve, é de se esperar que haja uma relação epidemiológica específica com cada grupo de hospedeiros e ambientes onde é registrado. A literatura mostra que aves de regiões temperadas do globo são menos expostas a infecções por *Plasmodium* spp., enquanto em regiões tropicais há uma maior chance de infecção (MERINO et al., 2008; MENDES et al., 2005; RICKLEFS & SHELDON 2007; STARKLOF et al., 2020), sendo que algumas espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* apresentam dificuldade em completar seu desenvolvimento nos vetores invertebrados em temperaturas inferiores à 17° C (LAPOINTE et al., 2010).

Os locais onde foram realizadas as amostragens são ambientes montanos, onde a temperatura no verão raramente ultrapassa os 25°C e no inverno atingem facilmente temperaturas negativas próximas à -10° C (INPE, 2021). Assim, os padrões de infecção são regidos por diversos fatores, que vão desde as variáveis ambientais e passam diretamente pela composição das espécies da comunidade de aves hospedeiras, a competência dos vetores envolvidos e a espécie do parasito causador da infecção (FERRAGUTI et al., 2018; GONZÁLEZ-QUEVEDO et al., 2014; ISAKSSON et al., 2013). Como os locais de amostragem deste estudo apresentam características distintas de ambientes tropicais comuns, acreditamos que pela importância das variáveis climáticas sobre a prevalência, comparações com outros estudos realizados, mesmo que na Mata Atlântica, não seriam adequadas.

Nas 26 aves positivas para *Plasmodium* spp. na amostragem realizada os trofozoítos foram as formas de desenvolvimento do parasito mais frequentes e, na maioria dos casos, foram registrados em baixos níveis de infecção, sendo a parasitemia média observada de 0,03%. Baixos níveis de infecção são comumente observados em aves silvestres (VALKIUNAS, 2005) e podem ser explicados por fatores como a virulência do parasito e a eficiência do sistema imune do hospedeiro, além das condições fisiológicas da ave no momento da infecção (GARMSZEGI et al., 2005; MARZAL et al., 2005;

MUKHIN et al., 2016; ROLDÁN-ZURABIÁN et al., 2022; VALKIUNAS, 2005). De modo geral, assim como foi notado nas amostras deste estudo, a literatura sugere que as infecções crônicas por *Plasmodium* spp. são as mais comuns em aves silvestres e poucos indivíduos mostram altas cargas parasitárias (VALKIUNAS, 2005). Porém, além destes fatores, o método de amostragem utilizado para captura das aves tende a prevalecer indivíduos mais saudáveis, uma vez que as armadilhas de rede-ornitológica capturam somente aves durante o deslocamento. Dessa forma indivíduos com altas cargas parasitárias, que provavelmente tenham comprometimento fisiológico por conta da infecção não são capturados, uma vez que se deslocam menos em relação às aves saudáveis (GARMSZEGI et al., 2005; SCHOENLE et al., 2017). Esse fato causa um viés relevante para as interpretações sobre a intensidade da infecção da malária aviária e restringindo possíveis comparações.

### 3.4.2 Análises filogenéticas

Os resultados da reconstrução filogenética com o conjunto de dados contendo as morfoespécies (Figura 2) sustentam a descrição de uma nova espécie, *P. erikdaemoni*. A posição externa da nova linhagem em relação ao clado contendo as espécies *P. globularis*, *P. homopolare*, *P. unalis*, *P. vaughani*, *P. homonucleophilum* e *P. parahexamerium* (Figura 2) sugere que *P. erikdaemoni* pertença ao subgênero *Novyella*. Este é o subgênero de *Plasmodium* com a maior diversidade de espécies (22) e atualmente é o grupo mais representativo nas descrições de novas espécies (VALKIUNAS e IEZHOVA, 2018). Todas as características que unem os representantes desse subgênero foram notadas em *P. erikdaemoni*: trofozoítos e merontes eritrocitários com citoplasma escasso; tamanho dos merontes totalmente desenvolvidos menor que o dos núcleos de eritrócitos infectados; e gametócitos alongados. Assim, apoiado nos resultados das análises morfológicas e filogenéticas do gene *cyt-b*, *P. erikdaemoni* pode ser classificado no subgênero *Novyella*.

Nas análises filogenéticas com o conjunto total das linhagens de *Plasmodium*, a topologia recuperada mostra que as novas linhagens de *Plasmodium erikdaemoni* não se agruparam com linhagens de morfoespécies, reforçando a caracterização molecular inédita da espécie. As linhagens de *Plasmodium* spp. que se mostraram filogeneticamente mais próximas das linhagens de *Plasmodium erikdaemoni* foram COLIN08, COPIL02, SPMAG08, PYLEU05 e TULEU02 (Tabela 2) formando um clado. Isso sugere que estas linhagens podem pertencer à espécie *Plasmodium erikdaemoni*. Porém, como não houve



caracterização morfológica destas linhagens, a certeza sobre a relação destas linhagens à nova espécie depende da caracterização morfológica destas.

#### 4.4.2 Características de *Plasmodium erikdaemoni*

No hospedeiro *Rhopias gularis*, foram observadas todas as formas evolutivas de *Plasmodium* com uma parasitemia de 0,49%. Nessa amostra foi possível recuperar todos os caracteres morfológicos e morfométricos (trofozoíto, meronte, macrogametócito e microgametócito) permitindo a caracterização específica e a descrição de uma nova espécie, *Plasmodium erikdaemoni*. Para a caracterização de *P. erikdaemoni* foram utilizados os aspectos morfológicos e o uso de ferramentas moleculares seguido de uma análise filogenética baseada no gene *cyt-b* (VALKIUNAS e IEZHOVA, 2018). Atualmente estudos que contemplem as técnicas morfológicas para o estudo da diversidade de *Plasmodium* tem caído em desuso frente a grande produção de linhagens genéticas do gene *cyt-b*, sendo cada vez mais raras caracterizações específicas das linhagens encontradas. Para termos de comparação, o banco de dados específico de hemosporídeos MalAvi (BENSCH et al., 2009) possui mais de 1443 linhagens do gene *cyt-b* de *Plasmodium* onde somente 44 são relacionadas às 55 espécies válidas do parasito. Dessa forma, há grande disponibilidade de linhagens genéticas de *Plasmodium* que não foram caracterizadas, tampouco associadas a espécies válidas. Este parece ser o caso da nova linhagem-tipo de *P. erikdaemoni*, uma vez que os resultados da reconstrução filogenética mostram que a nova espécie agrupou em um clado com linhagens de *Plasmodium* spp. não caracterizadas morfológicamente (Figura 2).

Das espécies do subgênero *Novyella*, a que mais se aproxima morfológicamente com *P. erikdaemoni* é *P. unalis*, espécie do gênero *Plasmodium* que assim como *P. erikdaemoni*, foi descrita em ambientes montanhosos da América do Sul (MANTILLA et al., 2013). Entre as características compartilhadas entre as duas espécies estão a presença de um único e grande grânulo de pigmento redondo nos trofozoítos e merontes eritrocíticos; o formato de “leque” frequente nos merontes eritrocitários; e a posição dos núcleos nos gametócitos. Os gametócitos das duas espécies, apesar de parecidos em sua forma de desenvolvimento alongado, apresentam algumas características distintas. Em *Plasmodium unalis* o citoplasma tem aparência granulada e bordas mais irregulares enquanto *P. erikdaemoni* apresenta citoplasma com aparência levemente granulada e a borda celular dos gametócitos mais íntegras. Os tamanhos dos gametócitos também diferem entre as duas espécies sendo que em *P. erikdaemoni* são maiores e mais

volumosos (Tabela 3). Finalmente, a característica mais marcante para a diferenciação entre as duas espécies são os grânulos de pigmento hemozoínico. Enquanto em *P. unalis* os grânulos são maiores, mais condensados e se apresentam em menor quantidade, *P. erikdaemoni* apresentam grânulos menores, mais dispersos (mesmo nos microgametócitos) e em quantidade maior (Tabela 3). Assim, *P. erikdaemoni* mostra como seu conjunto de características exclusivas dentro do subgênero *Novyella*: a presença grânulo grande e único de pigmento redondo nos trofozoítos e merontes; formato de “leque” nos merontes eritrocitários; gametócitos alongados com aparência pouco granulada; posição central/subcentral dos núcleos nos gametócitos.

**Tabela 3.** Comparações morfométricas entre *Plasmodium erikdaemoni* e *Plasmodium unalis*.

	<i>Plasmodium erikdaemoni</i>	<i>Plasmodium unalis</i>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Rhopias gularis</i>	<i>Turdus fuscater</i>
<b>Referência</b>	Presente estudo	MANTILLA et al., 2013
<b>Medidas (μ)</b>		
<b>Meronte</b>	n = 30	n = 40
Comprimento	4,4 - 6,4 (5,5 ± 0,47)	2,2 - 9,1 (3,2 ± 1,1)
Largura	3,7 - 4,9 (4,4 ± 0,26)	1,6 - 2,8 (2,2 ± 0,3)
Área	19,3 - 23,7 (21,8 ± 1,25)	3,8 - 13,3 (5,1 ± 1,7)
Número de merozoítos	5 - 7 (6 ± 0,2)	3 - 8 (5 ± 0,6)
<b>Macrogametócito</b>	n = 30	n = 20
Comprimento	12,1 - 15,0 (13,4 ± 1,15)	11,3-12,6 (11,3 ± 0,8)
Largura	2,6 - 3,6 (2,9 ± 0,33)	1,4-2,6 (2,2 ± 0,3)
Área	35,43 - 45,8 (42,1 ± 2,87)	19,4-29,1 (24,1 ± 2,9)
Nº de granulos de pigmento	5 - 8 (6,6 ± 0,93)	4-11 (6,3 ± 1,9)
NDR	0,7 - 1,1 (0,9 ± 0,21)	-
<b>Núcleo do Macrogametócito</b>		
Comprimento	3,3 - 4,3 (3,7 ± 0,26)	1,6-2,5 (1,9 ± 0,3)
Largura	1,7 - 2,2 (2,0 ± 0,13)	1,0-1,8 (1,4 ± 0,3)
Área	5,9 - 7,0 (6,4 ± 0,32)	1,4-3,8 (2,1 ± 0,6)
<b>Microgametócito</b>	n = 30	n = 20
Comprimento	10,9 - 13,2 (12,2 ± 0,48)	10,2-12,9 (11,6 ± 0,9)
Largura	2,3 - 3,9 (2,7 ± 0,34)	1,8-2,8 (2,1 ± 0,3)
Área	34,8 - 38,9 (36,7 ± 1,33)	17,6-26,6 (23,3 ± 3,3)
Nº de granulos de pigmento	4 - 5 (4,4 ± 0,5)	4-11 (6,3 ± 1,9)
NDR	0,5 - 0,8 (0,65 ± 0,30)	-
<b>Núcleo do Microgametócito</b>		
Comprimento	2,6 - 4,0 (3,5 ± 0,42)	2,5-4,8 (3,5 ± 0,6)
Largura	1,8 - 3,0 (2,4 ± 0,36)	1,3-1,9 (1,6 ± 0,3)
Área	1,0 - 5,1 (4,64 ± 0,31)	2,5-4,8 (4,5 ± 1,0)

### 3.5 CONCLUSÕES

Neste estudo utilizamos ferramentas morfológicas, moleculares e filogenéticas para a descrição de uma nova espécie de parasito da malária aviária, *Plasmodium erikdaemoni* em hospedeiros da espécie *Rhopias gularis*, endêmica da Mata Atlântica. As características morfológicas de *Plasmodium erikdaemoni* mostraram-se consistentes e inéditas assim como as características genéticas da nova linhagem recuperada, confirmando a nova espécie. Através dos resultados obtidos enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade global de *Plasmodium* e das espécies da Mata Atlântica, um bioma altamente ameaçado que tem o potencial de abrigar muitas espécies de parasitos da malária aviária ainda não conhecidos pela ciência, dada sua grande biodiversidade e a pouca amostragem já realizada.

## CAPÍTULO 2

### **4 CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *massardi* sp. nov. EM COLUMBIFORMES NATIVOS NAS MONTANHAS DA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE BRASILEIRO**

## RESUMO

A Mata Atlântica é um dos centros globais de riqueza de espécies no mundo e tem no relevo como um dos principais fatores para as altas taxas de endemismo. Os processos de diversificação das espécies em montanhas ocorrem de formas semelhantes ao de ilhas oceânicas, onde o isolamento geográfico se reflete em restrições do fluxo gênico e diferenciação das populações de organismos isolados. O gênero *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) possui a maior diversidade entre os hemosporídeos aviários, sendo registradas 177 espécies destes parasitos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres ao redor do mundo. A diversidade de *Haemoproteus* em ambientes montanos do Brasil ainda é desconhecida, assim, o presente estudo tem como objetivo investigar a diversidade das espécies de *Haemoproteus* em aves silvestres nas montanhas da Mata Atlântica brasileira. Para isso foram amostradas 621 aves em 3 regiões da Mata Atlântica (P.N. Itatiaia, P.N. Serra do Órgãos e P.N. Caparaó). A prevalência geral da infecção por *Haemoproteus* na população de aves estudada de 4,35% (27/621). Entre os 11 Columbiformes amostrados a prevalência foi de 18,1%, onde 2 indivíduos da espécie *Geotrygon montana* mostraram formas de *Haemoproteus* em seus esfregaços sanguíneos. Através de ferramentas morfológicas, moleculares e filogenéticas foi realizada a caracterização de uma nova espécie de parasito hemosporídeo da família Haemoproteidae, *Haemoproteus (Haemoproteus) massardi*, descrito em hospedeiros da espécie *Geotrygon montana* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos. As características morfológicas de *Haemoproteus massardi* mostraram-se consistentes e inéditas nos dois indivíduos amostrados assim como as características genéticas do parasito recuperadas através das análises filogenéticas, dando respaldo suficiente para a confirmação da nova espécie. A presença de grandes vacúolos corados nos macrogametócitos e microgametócitos é a característica que distingue *Haemoproteus massardi* de todas as outras espécies de *Haemoproteus* encontrados em Columbiformes.

**Palavras-chave:** Haemosporida; endemismo; morfometria; *cyt-b*; aves silvestres.

## ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the global centers of species richness in the world and the relief is one of the main factors for the high rates of endemism. Species diversification processes in mountains occur in ways similar to oceanic islands, where geographic isolation is reflected in gene flow restrictions and differentiation of populations of isolated organisms. The genus *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) has the greatest diversity among avian hemosporidia, with 177 species of these parasites being recorded in several species of domestic and wild birds around the world. The diversity of *Haemoproteus* in montane environments in Brazil is still unknown, so the present study aims to investigate the diversity of *Haemoproteus* species in wild birds in the mountains of the Brazilian Atlantic Forest. For this, 621 birds were sampled in 3 regions of the Atlantic Forest (P.N. Itatiaia, P.N. Serra do Órgãos and P.N. Caparaó). The overall prevalence of *Haemoproteus* infection in the bird population studied is 4.35%. Among the 11 Columbiformes sampled, the prevalence was 18.1%, where 2 individuals of the species *Geotrygon montana* showed forms of *Haemoproteus* in their blood smears. Through morphological, molecular and phylogenetic tools, the characterization of a new species of hemosporid parasite of the Haemoproteidae family, *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *massardi*, described in hosts of the species *Geotrygon montana* in the Serra dos Órgãos National Park was performed. The morphological characteristics of *Haemoproteus massardi* were consistent and unprecedented in the two individuals sampled, as well as the genetic characteristics of the parasite recovered through phylogenetic analyses, providing sufficient support for the confirmation of the new species. The presence of large and stained vacuoles in macrogametocytes and microgametocytes is the feature that distinguishes *Haemoproteus massardi* from all other *Haemoproteus* species found in Columbiformes.

**Keywords:** Haemosporida; endemism; morphometry; *cyt-b*; wild birds.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os hemosporídeos aviários (Filo Apicomplexa, Ordem Haemosporida) são representados por 4 famílias, Plasmodiidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae e Garniidae (VALKIUNAS, 2005). A família Haemoproteidae, representada pelo gênero *Haemoproteus*, possui a maior diversidade entre os hemosporídeos, sendo registradas 177 espécies destes parasitos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres ao redor do mundo (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; e IEZHOVA, 2022; BENSCH et al., 2009; DIMITROV et al., 2014). O ciclo biológico de *Haemoproteus*, assim como os outros hemosporídeos, é heteroxeno, onde a fase assexuada ocorre em eritrócitos e em diversos tecidos do hospedeiro vertebrado, as aves, e a fase sexuada ocorre em dípteros hematófagos das famílias Hippoboscidae e Ceratopogonidae (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). O gênero *Haemoproteus* é dividido em dois subgêneros, *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* (BENNETT et al., 1965; GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). A divisão dos subgêneros se dá de acordo com as espécies de seus vetores, sendo que no subgênero *Haemoproteus* as espécies são vetoradas por moscas da família Hipoboscidae e em *Parahaemoproteus* as espécies são vetoradas por mosquitos da família Ceratopogonidae (VALKIUNAS, 2005; KRIZANAUSKIENE et al., 2013).

O subgênero *Haemoproteus* possui a maior diversidade de suas espécies em hospedeiros da Ordem Columbiformes (pombos, juritis e afins) e segundo VALKIUNAS (2005) esta associação pode estar relacionada ao comportamento gregário dessas aves que favorece a ocorrência de moscas da família Hippoboscidae e a transmissão de *Haemoproteus*. Os Columbiformes possuem distribuição mundial (SICK, 1997) sendo representados por mais de 300 espécies (DEL HOYO et al., 2018). No Brasil ocorrem 21 espécies de Columbiformes (PACHECO et al., 2021), como é o caso da espécie *Geotrygon montana* (Linnaeus, 1758). Esta espécie de columbiforme é considerada rara e ocorre em florestas úmidas maduras de ambientes montanhosos do México até a Argentina (SICK, 1997). As regiões montanas da Mata Atlântica são um importante local para a manutenção das populações de *Geotrygon montana* (KUEKER et al., 2020) e apesar dos estudos sobre a ocorrência de *Haemoproteus* na Mata Atlântica avançarem nos últimos anos, as linhagens relacionadas a esta espécie são raras e registradas em outras regiões biogeográficas (MalAvi, 2022).

A Mata Atlântica é considerada um dos cinco “hotspots” globais de importância para conservação biológica (MYERS et al., 2000), apresentando um dos mais altos graus

de riqueza de espécies e taxas de endemismo do mundo (RIBEIRO et al., 2009) e sendo o bioma da região Neotropical com maior número de espécies ameaçadas, principalmente aves (IUCN, 2021). Um dos fatores que contribui para as altas taxas de endemismo na Mata Atlântica é o relevo (JENKINS et al., 2015). Os processos de diversificação das espécies nas montanhas da Mata Atlântica ocorrem de formas semelhantes ao de ilhas oceânicas, onde o isolamento geográfico causado pelas montanhas se reflete em restrições do fluxo gênico e diferenciação das populações de organismos isolados (MACARTHUR e WILSON, 1967; KITAYAMA, 1996; BARBARÁ, 2007; POREMBSKI, 1998, VASCONCELOS, 2010, PRATES, 2017). Dessa forma, o presente estudo presente estudo tem como objetivo investigar a diversidade das espécies de *Haemoproteus* em aves silvestres nas montanhas da Mata Atlântica brasileira e descrever uma nova espécie desse parasito por meio de ferramentas morfológicas e filogenéticas.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Amostragem

Com o objetivo de estimar o tamanho da amostra de aves nos três locais de coleta assumiu-se como parâmetro uma população infinita para um nível de esperada de 50%, erro amostral de 5% e nível de significância de 95%. Para tal foi utilizada a seguinte fórmula proposta por SAMPAIO et al. (2002):

$$N = \frac{p(1-p) \times \alpha^2}{d^2}$$

Sendo: N = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita; p = prevalência esperada (50%); quando não se conhece a prevalência de hemossporídeos em aves na região estudada, admitisse o valor da prevalência esperada em 50% para obter o maior número amostral possível;  $\alpha^2$  = Valores críticos associados ao grau de significância (1,96); ed = erro amostral. Após aplicação da referida fórmula, obteve-se um número amostral de 384 aves. Foram coletadas no total 621 aves, satisfazendo assim o número amostral mínimo. As coletas foram realizadas de forma não probabilística nas áreas de estudo.

A amostragem ocorreu entre janeiro de 2020 e setembro de 2022 em 3 Unidades de Conservação Federais situadas no sudeste do Brasil, são elas: Parque Nacional do Caparaó (20° 26' 5" S, 41° 47' 2" W), Parque Nacional de Itatiaia (22° 22' 31" S, 44° 39' 44" W) e Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22° 29' 35" S, 43° 4' 24" W) (Figura 1 – Cap. 1). Os locais de amostragem são representados por regiões montanhosas inseridas no bioma Mata Atlântica, onde foram realizadas coletas de aves silvestres entre 700 e 2500 metros de altitude acima do nível do mar. A captura das aves foi realizada por meio de redes ornitológicas (12 m de comprimento por 3m de altura e malha de 16 mm), estendidas desde antes do nascer do sol (~5:30am) até o meio do dia (~1:00pm). A vistoria das capturas nas redes ocorria em intervalos de 15-20 minutos para a retirada dos indivíduos. As aves capturadas foram contidas individualmente em sacos de algodão, levadas à base de amostragem e mantidas em local fresco e sombreado até o momento da triagem. Durante a triagem todas as aves foram medidas, pesadas, examinadas fisicamente e fotografadas para a identificação através dos guias de campo SIGRIST (2014).

Para a obtenção das amostras de sangue, as aves foram contidas manualmente para o extravasamento da veia braquial da asa realizada com agulha estéril. Parte do sangue obtido foi utilizado para a preparação de esfregaços sanguíneos (entre 3 e 5) e o restante foi coletado diretamente em cartões de papel (Whatman FTAcards®) para as análises moleculares. Os cartões de papel contendo as amostras de sangue foram isolados imediatamente em embalagens herméticas modelo “zip-lock”. O volume de sangue coletado em nenhum caso excedeu 1% do peso vivo total do animal. Após os procedimentos de coleta de sangue, todas as aves tiveram seus sinais vitais checados e foram liberadas imediatamente na natureza. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Juiz de Fora (protocolo nº 031/2017), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo nº 4863180222) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 68906-1/2020).

#### **4.2.2 Análises morfológicas**

Para as análises microscópicas, os esfregaços sanguíneos foram secados ao ar imediatamente após sua confecção e em seguida foram fixados em metanol absoluto durante 3 minutos. Após a fixação em campo os esfregaços sanguíneos foram levados ao laboratório e corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em água destilada na proporção de 1:9 durante 40 minutos. A detecção dos parasitos nos esfregaços foi realizada em microscópio de luz Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan) sendo analisados 100 campos microscópicos em ampliação de 1000X para cálculo da prevalência e parasitemia. Os valores de prevalência foram calculados de acordo com BUSH et al. (1997) e o cálculo da parasitemia (intensidade da infecção) foi feito seguindo o método de GODFREY et al. (1987).

A obtenção das imagens das formas evolutivas de *Haemoproteus* foi realizada em microscópio de luz Olympus BX-51 DIC (Olympus, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital Olympus DP73. A morfometria dos gametócitos de *Haemoproteus* foi realizada no software ImageProPlus 8.0 utilizando as características propostas por VALKIUNAS (2005) e VALKIUNAS e IEZHOVA (2022).

#### **4.2.3 Análises moleculares**

Para a extração de DNA das amostras coletadas foi retirado um punch (6mm) do cartão de papel contendo sangue da ave. A extração total de DNA foi realizada por Kit de

Extração de DNA Wizard® Genomic (Promega®, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração de DNA total nas e a pureza das amostras foi quantificada através de espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras extraídas foram padronizadas na concentração de 20ng /µL. Para estimativa da pureza das amostras foram realizadas leituras da absorvidade nos comprimentos de onda 230, 260 e 280nm. A pureza do DNA foi determinada pela razão de absorbâncias 260/280. As amostras extraídas e padronizadas foram estocadas à -80°C.

A detecção de *Haemoproteus* foi realizada a partir da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (*cyt-b*) através de nested PCR. Para a primeira reação foram utilizados os primers gerais de hemosporídeos aviários (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.) HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplificam aproximadamente 618 pares de base (pb) (HELLGREN et al., 2004). A reação foi realizada em um volume final de 25µL, contendo: 1X de Tampão de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), 1U de Platinum™ Taq DNA Polimerase, 0,4 mM de dNTP, 1,0 µM de cada primer, 3mM de MgCl<sub>2</sub> e 2µL (aproximadamente 40ng) de DNA genômico da amostra.

Para a segunda reação foram utilizados os primers específicos para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplificam aproximadamente 525 pb do gene *cyt-b* (HELLGREN et al., 2004). A reação de nPCR foi realizada utilizando as mesmas concentrações de reagentes da primeira reação, com exceção da concentração de primers que foi modificado para 0,6 µM. As condições de termociclagem de ambas as reações foram: 94°C por 5 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.

Para controle negativo das amostras foi utilizada água ultrapura. O DNA genômico de *Haemoproteus syrnii* extraído a partir de amostras de patos-selvagens (*Cairinia moschata*) foi utilizado como controle positivo. Todos os produtos resultantes da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Blue Green Loading Dye I (Biotecnologia LGC, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob

luz ultravioleta. Os amplicons de PCR das amostras positivas foram purificados usando o Kit QIAquick® Purification (Qiagen®, São Paulo, Brasil) e submetidos ao sequenciamento bidirecional com os iniciadores HaemF/HaemR2 (HELLGREN et al., 2004), no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.2.4 Análises filogenéticas

As análises de Reconstruções Filogenética foram realizadas utilizando dois conjuntos de dados contendo sequencias genéticas curadas do gene *cyt-b* de *Haemoproteus* e as sequências obtidas neste estudo dos hospedeiros *Geotrygon montana*. O primeiro conjunto de dados foi formado por todas as sequências relacionadas a espécies válidas de *Haemoproteus* segundo VALKIUNAS e IEZHOVA (2022). O segundo conjuntos de dados continha 1873 sequencias do gene *cyt-b* de *Haemoproteus* disponíveis no banco de sequências MalAvi (BENSCH et al. 2009) em novembro de 2022. Como grupo externo foram escolhidas sequencias de *Plasmodium gallinaceum* e *Plasmodium (GALLUS01) relictum* (SGS1) também obtidas através do banco de dados MalAvi.

Os dois conjuntos de dados foram alinhadas no software MAFFT (KATOHI et al., 2019) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas com a plataforma Gblocks (TALAVERA & CASTRESANA, 2007), obteve-se uma matriz com aproximadamente 479 pb. A inferência das relações filogenéticas de *Haemoproteus* foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança 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) em ambos os conjuntos de dados. Os valores de suporte dos clados foram avaliados com o critério de auto-convergência de bootstrap do RaxML (STAMATAKIS, 2014) com 799 pseudo-replicatas para o primeiro conjunto de dados e 599 pseudo-replicatas para o segundo conjuntos de dados.

## 4.3 RESULTADOS

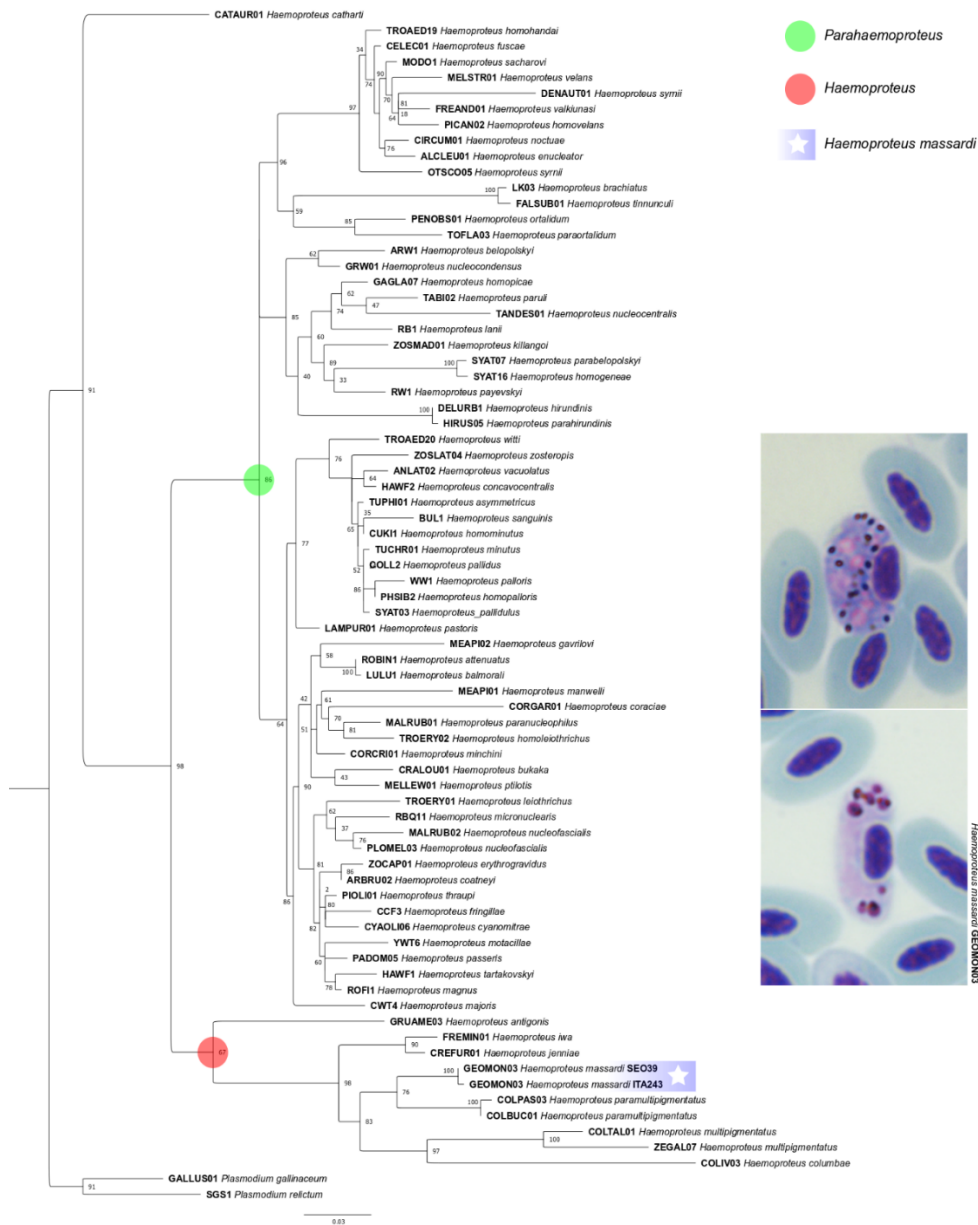
### 4.3.1 Análises dos esfregaços sanguíneos

Foi registrada a presença de gametócitos de parasitos do gênero *Haemoproteus* nos esfregaços sanguíneos de 27 indivíduos dos 621 amostrados, resultando em uma prevalência geral da infecção por *Haemoproteus* na população de aves estudada de 4,35%. Entre os 11 Columbiformes amostrados a prevalência foi de 18,1%, onde 2 indivíduos da espécie *Geotrygon montana* (Anexo 2) mostraram formas de *Haemoproteus* em seus esfregaços sanguíneos. A parasitemia média geral encontrada foi de 0,21%. Nos dois indivíduos de *Geotrygon montana* a parasitemia média foi superior à 0,38%. As formas de *Haemoproteus* encontradas nos esfregaços sanguíneos dos hospedeiros da espécie *Geotrygon montana* não apresentavam as características relacionadas às espécies já descritas de *Haemoproteus* que ocorrem em Columbiformes segundo as chaves taxonômicas de VALKIUNAS e IEZHOVA (2022).

### 4.3.2 Análises filogenéticas

Na topologia recuperada através das análises filogenéticas com o conjunto de dados contendo as morfoespécies (Figura 1), as linhagens de *Haemoproteus* isoladas dos hospedeiros das espécies *Geotrygon montana* (GEOMON03) posicionaram-se dentro do clado do subgênero *Haemoproteus* e não se associaram intimamente à nenhuma das linhagens de espécies válidas do parasito. A espécie de *Haemoproteus* mais próxima filogeneticamente as novas linhagens recuperadas foi *Haemoproteus paramultipigmentatus* (Figura 1).

Na topologia recuperada com o conjunto de dados contendo todas as linhagens de *Haemoproteus* disponíveis, as novas linhagens de *Haemoproteus* isoladas dos hospedeiros das espécies *Geotrygon montana* (GEOMON03) não se agruparam com linhagens relacionadas às espécies válidas do parasito. As novas linhagens agruparam-se com as linhagens da *Haemoproteus* ANACYA02, GEOMON01, ANAGEO04, GEOTRY01 e THASCH03 (Tabela 1).



**Figura 1.** Reconstrução Filogenética baseada em um fragmento de 478 pares de base do gene *cyt-b* de espécies do gênero *Haemoproteus*. O método de reconstrução filogenética foi o de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo GTR + G + I. O método de bootstrap com 799 pseudo-réplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. As sequências *Plasmodium gallinaceum* (GALLUS01) e *Plasmodium relictum* (SGS1) foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software RaxML. Barra representa 3 substituições por posições de 100 nucleotídeos.

**Tabela 1.** Informações sobre as linhagens filogeneticamente próximas à *Haemoproteus massardi* sp. nov. de acordo com a reconstrução filogenética realizada com o conjunto de dados contendo todas as sequências de *Haemoproteus* disponíveis no banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009).

Família e espécie do hospedeiro	Nome da linhagem (MalAvi)	Região	Bioma	Referência
<b>Columbidae</b>				
<i>Columba livia</i>	GEOMON01	Equador	Andes	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Columbina buckleyi</i>	GEOMON01	Equador	Andes	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Geotrygon montana</i>	GEOMON03	Brasil	Mata Atlântica	Presente estudo
<i>Geotrygon montana</i>	GEOTRY01	Equador	Andes	Moens e Perez-Tris, 2015
<i>Geotrygon montana</i>	GEOTRY01	Brasil	Amazônia	Fecchio et al., 2017a
<i>Geotrygon montana</i>	GEOTRY01	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<i>Leptotila plumbeiceps</i>	GEOMON01	México	Estepe	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Leptotila rufaxilla</i>	GEOMON01	Equador	Andes	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Leptotila verreauxi</i>	GEOMON01	Equador	Andes	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Zenaida galapagoensis</i>	GEOMON01	Galápagos	Insular	Santiago-Alarcon et al., 2010
<i>Zenaida macroura</i>	GEOMON01	México	Estepe	Santiago-Alarcon et al., 2010
<b>Trochilidae</b>				
<i>Phaethornis philippii</i>	GEOTRY01	Peru	Andes	McNew et al., 2021
<b>Anatidae</b>				
<i>Anas cyanoptera</i>	ANACYA02	Chile	Andes	Bell et al., 2020
<i>Anas georgica</i>	ANAGEO04	Chile	Andes	Bell et al., 2020
<b>Thamnophilidae</b>				
<i>Thamnophilus schistaceus</i>	THASCH03	Peru	Amazônia	Fecchio et al., 2017a

### 4.3.3 Descrição do parasito

#### Gametócitos jovens

Os gametócitos jovens foram registrados exclusivamente em eritrócitos maduros (Figura 8 - 1 e 13). A influência dos gametócitos jovens sobre a morfologia do eritrócito é pouco pronunciada sendo possível notar o deslocamento do núcleo da célula hospedeira somente nas formas mais desenvolvidas. A posição dos gametócitos jovens nas células hospedeiras é subpolar (Figura 8 - 1). Os gametócitos jovens apresentam formato alongado e ameboide ((Figura 8 - 1 e 13). No citoplasma dos gametócitos jovens é possível notar a presença de pequenos grânulos de pigmento hemozoínico em número

inferior ao gametócitos desenvolvidos. A presença de vacúolos é notada desde as formas mais jovens de desenvolvimento em número inferior aos gametócitos adultos.

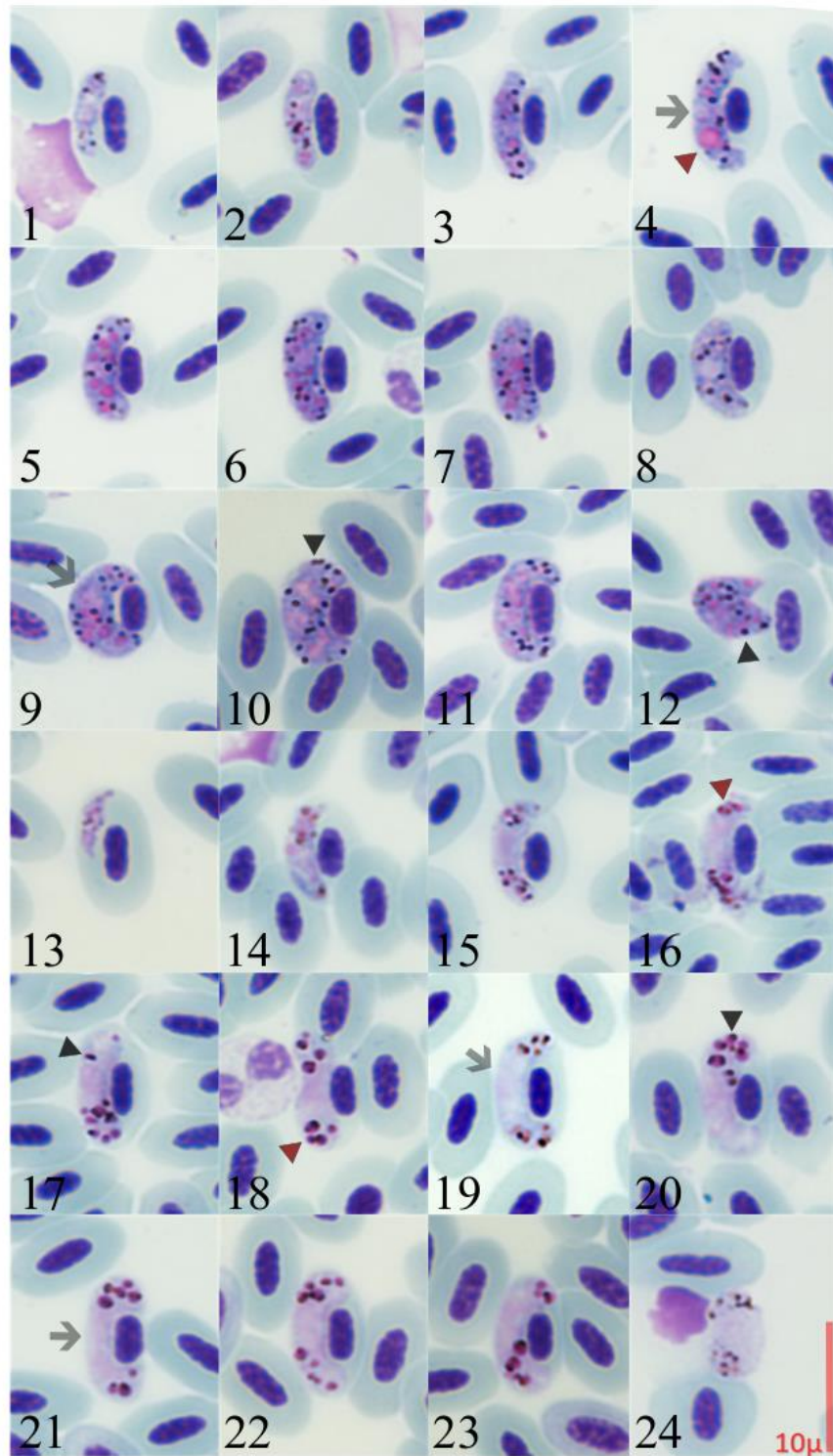
### **Macrogametócito**

Os macrogametócitos foram encontrados exclusivamente em eritrócitos maduros (Figura 2 - 1 à 12). A influência do macrogametócitos sobre a morfologia das células hospedeiras infectadas é altamente pronunciada sendo registrado grande deslocamento nos núcleos dos eritrócitos infectados (Tabela 2). Rompimento de eritrócitos infectados causado pelo macrogametócitos foram notados regularmente (Figura 2 - 12). Os macrogametócitos possuem formato alongado e desenvolve-se paralelamente aos núcleos dos eritrócitos infectados. O citoplasma dos macrogametócitos possui aparência homogênea e apresenta regularmente entre 6 e 9 vacúolos rosados de variados tamanhos (entre 0,33 $\mu$  e 1,1 $\mu$  de área) dispersos por todo corpo do parasito (Figura 2 – 4 à 11). O número de vacúolos aumenta de acordo com o desenvolvimento do parasito. A coloração dos vacúolos se torna mais intensa nas formas adultas. O número de grânulos de pigmento variou entre 15 e 18 (Tabela 2). Os grânulos apresentam tamanho máximo de 0,4 $\mu$ m nos macrogametócitos. O núcleo dos macrogametócitos apresenta formato ameboide e sua posição é variável no citoplasma do parasito (Figura 2 - 9). A coloração apresentada pelos macrogametócitos é roxo/azulada.

### **Microgametócito**

As características gerais de desenvolvimento dos microgametócitos são semelhantes aos macrogametócitos (Figura 2 – 13 à 24). As características dimórfico-sexuais comuns do gênero *Haemoproteus* foram notadas. O tamanho dos microgametócitos é inferior em relação aos macrogametócitos (Tabela 2). A coloração do microgametócitos é rosada (Figura 2 – 13 à 23). Nos microgametócitos, assim como nos macrogametócitos também são notados entre 6 e 10 vacúolos rosados que variam entre 0,8 $\mu$ m e 0,1 $\mu$ m de área. O número de grânulos de hemozoína é inferior ao macrogametócitos (Tabela 2). Os grânulos apresentam posicionamento polar e sempre estão associados aos vacúolos presente no citoplasma (Figura 2 - 18).





**Figura 2.** Gametócitos de *Haemoproteus massardi* sp. nov. (linhagem GEOMON03) em esfregaços sanguíneos de *Geotrygon montana* corados com Giemsa. Gametócitos jovens (1,2,13,14); Macrogametócitos (1-12); Microgametócitos (13-24). Setas simples indicam os núcleos dos parasitos, triângulos pretos indicam grânulos de pigmento hemozoínico e a triângulos vermelhos indicam os vacúolos. Barra de escala = 10 µm.

## Observações

Os caracteres morfológicos de *Haemoproteus massardi* foram consistentes entre as formas obtidas nos dois hospedeiros da espécie *Geotrygon montana* (Tabela 2) encontrados em diferentes locais (Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional do Itatiaia). A presença de grandes vacúolos corados nos macrogametócitos e microgametócitos é a característica que distingue *Haemoproteus massardi* de todas as outras espécies de *Haemoproteus* encontrados em Columbiformes (VALKIUNAS e IEZHOVA, 2022). A ocorrência de *Haemoproteus massardi* em Columbiformes indica que esta pertença ao subgênero *Haemoproteus*. As análises filogenéticas indicam proximidade genética de *Haemoproteus massardi* com as linhagens ANACYA02, GEOMON01, ANAGEO04, GEOTRY01 e THASCH03 (Tabela 1) restritas à América do Sul.

## Sumário taxonômico

Hospedeiro-tipo: *Geotrygon montana* (Columbiformes, Columbidae).

Sequências de DNA: linhagem *cyt-b* mitocondrial GEOMON/SEO39

Localidade-tipo: Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil (22° 22' 31" S, 44° 39' 44" W, 1500 metros acima do nível do mar).

Prevalência: A prevalência de *Haemoproteus massardi* na espécie de hospedeiro tipo foi de 66,6% (2/3).

Distribuição geográfica: Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional de Itatiaia.

Local de infecção: Eritrócitos maduros.

Espécimes tipo: Lâminas de esfregaços sanguíneos depositadas na Coleção do Laboratório de Protozoologia da UFJF. Número de tombo HP-1952.0, HP-1952.1, HP1953.0 e HP1953.1.

Etimologia: O nome da espécie presta homenagem ao Professor e Parasitologista brasileiro Carlos Luiz Massard.

**Tabela 2.** Morfometria de *Haemoproteus massardi* sp. nov. realizada em esfregaços sanguíneos de *Geotrygon montana*. Todas as medidas foram realizadas em micrometros ( $\mu$ ). São mostrados valores máximos, mínimos, média e desvio padrão. Foram mensuradas 30 fotomicrografias de cada forma de desenvolvimento do parasito.

<b>Característica</b>	<b>Medidas (<math>\mu</math>)</b>
Eritrócito não infectado	
Comprimento	8,61 - 8,33 (8,50 $\pm$ 0,41)
Largura	3,91 - 3,66 (3,76 $\pm$ 0,49)
Área	32,01 - 31,03 (31,74 $\pm$ 0,41)
Núcleo do eritrócito não infectado	
Comprimento	4,21 - 4,03 (4,09 $\pm$ 0,36)
Largura	2,07 - 1,98 (4,09 $\pm$ 0,48)
Área	6,81 - 6,66 (6,75 $\pm$ 0,36)
Macrogametócito	
Comprimento	8,02 - 7,44 (7,79 $\pm$ 0,22)
Largura	3,19 - 3,04 (3,10 $\pm$ 0,64)
Área	23,5 - 21,94 (22,53 $\pm$ 0,49)
Nº de granulos de pigmento	18 - 15 (15,8 $\pm$ 1,3)
NDR	0,64 - 0,85 (0,71 $\pm$ 0,46)
Núcleo do Macrogametócito	
Comprimento	2,74 - 2,09 (2,29 $\pm$ 0,26)
Largura	1,57 - 1,38 (1,47 $\pm$ 0,37)
Área	3,15 - 2,93 (3,06 $\pm$ 0,32)
Eritrócito infectado	
Comprimento	8,56 - 8,02 (8,55 $\pm$ 0,32)
Largura	5,91 - 5,34 (5,62 $\pm$ 0,22)
Área	38,03 - 36,31 (37,22 $\pm$ 0,49)
Núcleo do eritrócito infectado	
Comprimento	4,5 - 4,03 (4,22 $\pm$ 0,17)
Largura	1,48 - 1,29 (1,35 $\pm$ 0,78)
Área	6,08 - 5,24 (5,81 $\pm$ 0,34)
Microgametócito	
Comprimento	7,74 - 7,23 (7,51 $\pm$ 0,41)
Largura	2,19 - 1,88 (2,02 $\pm$ 0,35)
Área	21,53 - 20,56 (20,99 $\pm$ 0,35)
Nº de granulos de pigmento	7 - 5 (5,8 $\pm$ 0,83)
NDR	0,61 - 0,79 (0,73 $\pm$ 0,49)
Núcleo do Microgametócito	
Comprimento	2,44 - 2,09 (2,22 $\pm$ 0,14)
Largura	1,40 - 1,22 (1,31 $\pm$ 0,69)
Área	3,08 - 2,81 (2,97 $\pm$ 0,10)
Eritrócito infectado	
Comprimento	8,96 - 8,79 (8,84 $\pm$ 0,31)
Largura	4,53 - 4,32 (4,43 $\pm$ 0,36)
Área	35,01 - 34,02 (34,55 $\pm$ 0,45)
Núcleo do eritrócito infectado	
Comprimento	3,61 - 3,28 (3,43 $\pm$ 0,12)
Largura	1,78 - 1,59 (1,63 $\pm$ 0,46)
Área	5,29 - 5,01 (5,18 $\pm$ 0,46)

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Análises dos esfregaços sanguíneos

A prevalência de geral *Haemoproteus* spp. na população de aves amostrada nas montanhas da Mata Atlântica foi 4,35% (27/621) enquanto entre os Columbiformes amostrados a prevalência foi de 18,1% (2/11). De modo geral a prevalência de *Haemoproteus* em aves silvestres é regida por diversos fatores ecológicos e epidemiológicos intrínsecos de cada espécie de agente envolvido (ave, vetor e parasito) (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; DIMITROV et al., 2014), porém, a literatura sugere uma relação mais íntima entre parasito do gênero *Haemoproteus* e os Columbiformes. A maioria das espécies do subgênero *Haemoproteus* ocorre em aves da ordem Columbiformes, sendo vetorados por moscas da família Hippoboscidae (VALKIUNAS, 2005). Estes vetores encontram no modo de vida gregário, presente na maioria das espécies de Columbiformes (SICK, 1997), um meio que facilita sua dispersão entre indivíduos, facilitando também a dispersão de *Haemoproteus* entre as aves da população e aumentando a prevalência do parasito nesse grupo de aves em detrimento de outros (VALKIUNAS, 2005).

A parasitemia média observada também foi superior entre os Columbiformes em relação aos outros grupos de aves amostradas (0,38% vs. 0,21%), reforçando a relação epidemiológica específica entre *Haemoproteus* e este grupo de aves. Casos experimentais de infecção de *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *columbae* em hospedeiro Columbiformes da espécie *Columba livia* mostraram parasitemias de até 75% em indivíduos que não desenvolviam sintomas relacionados ao parasitismo (VALKIUNAS, 2005), sugerindo a capacidade das espécies de aves da Ordem Columbiformes de suportar altas cargas parasitárias de *Haemoproteus*. Nos dois hospedeiros parasitados por *Haemoproteus massardi* da espécie *Geotrygon montana* a maior parasitemia (0,42%) foi associada ao indivíduo jovem, SEO39. Maiores cargas parasitárias relacionadas aos indivíduos jovens da Ordem Columbiformes podem estar justificadas pela maior susceptibilidade natural desses indivíduos à infecções, dada a ausência de resposta imune específica para cada agente infeccioso, (GARNHAM, 1966) e a maior exposição aos vetores durante o período dos filhotes no ninho (VALIUNAS, 2005).

Segundo VALKIUNAS e IEZHOVA (2022) as espécies *Haemoproteus* que ocorrem em Columbiformes são *Haemoproteus columbae*, *Haemoproteus turtur*,

*Haemoproteus palumbis*, *Haemoproteus multivolutinus*, *Haemoproteus sacharovi*, *Haemoproteus multipigmentatus* e *Haemoproteus paramultipigmentatus*. Nos esfregaços sanguíneos dos hospedeiros de *Geotrygon montana* os gametócitos encontradas apresentaram características morfológicas diferentes das espécies de *Haemoproteus* que ocorrem em Columbiformes (Figura 1) sugerindo uma espécie ainda não caracterizada de parasito nesses hospedeiros.

#### 4.4.2 Análises filogenéticas

Neste estudo foi utilizada uma nested-PCR para a amplificação de 478 pares de base do gene *cyt-b* das amostras de *Haemoproteus* nos hospedeiros da espécie *Geotrygon montana*. As linhagens de *Haemoproteus massardi* obtidas desses hospedeiros afirmaram seu ineditismo nas análises filogenéticas em ambos os conjuntos de dados (Figura 1). Nas análises com o conjunto de dados contendo as morfoespécies de *Haemoproteus* (Figura 1), as linhagens de *Haemoproteus massardi* posicionaram-se internamente ao clado do subgênero *Haemoproteus* sugerindo que o novo parasito pertença a este subgênero. Segundo as análises, a espécie de *Haemoproteus* mais próxima filogeneticamente de *Haemoproteus massardi* é *Haemoproteus paramultipigmentatus*, apresentando um valor de suporte para o clado de 76 (Figura 1). *Haemoproteus paramultipigmentatus* foi descrito em *Columbina passerina* no México e tem sua ocorrência registrada em Columbiformes na Mata Atlântica brasileira (LACORTE et al., 2013; MATOSO et al., 2021). Apesar da ocorrência de *Haemoproteus paramultipigmentatus* em ambientes próximos à ocorrência de *Haemoproteus massardi*, a distância genética entre as duas espécies fica evidente nos resultados da análise filogenética utilizando todas as linhagens de *Haemoproteus* spp. disponíveis no MalAvi.

Nas análises filogenéticas com o conjunto total das linhagens de *Haemoproteus*, a topologia recuperada mostra que as novas linhagens de *Haemoproteus massardi* não se agruparam com linhagens de morfoespécies, reforçando a caracterização molecular inédita da espécie. As linhagens de *Haemoproteus* que se mostraram filogeneticamente mais próximas das linhagens de *Haemoproteus massardi* foram ANACYA02, GEOMON01, ANAGEO04, GEOTRY01 e THASCH03 (Tabela 1) formando um clado com valor de suporte elevado (96). Isso sugere que estas linhagens podem pertencer à espécie *Haemoproteus massardi* e alguns fatores reforçam esta possibilidade: duas das linhagens mais próximas filogeneticamente as linhagens de *Haemoproteus massardi* foram recuperadas de hospedeiros da mesma espécie do

hospedeiro-tipo da nova espécie (*Geotrygon montana* - GEOMON01 e GEOTRY01) e a distribuição geográfica de todas as linhagens próximas as da nova espécie é restrita à ambientes montanos da América do Sul, assim como *Haemoproteus massardi*. Contudo, como não houve caracterização morfológica dos parasitos nos estudos que descreveram estas linhagens não é possível afirmar que se trata da nova espécie, dependendo, portanto, de novos estudos nos locais e nos hospedeiros onde foram encontradas.

#### 4.4.2 Características de *Haemoproteus massardi*

Os caracteres morfológicos de *Haemoproteus massardi* foram consistentes (Tabela 2) nos dois hospedeiros amostrados da espécie *Geotrygon montana*, SEO39 e ITA243. A morfologia dos gametócitos de *Haemoproteus massardi* mostrou-se única entre os parasitos do gênero *Haemoproteus* já registrado em Columbiformes. Os grandes vacúolos rosados dispersos pelo citoplasma dos macros e microgametócitos de *Haemoproteus massardi* (Figura 2) são uma característica não registrada em nenhuma das espécies de *Haemoproteus* que parasitam este grupo de aves. Corroborando os estudos morfológicos, a distância genética entre as linhagens de *Haemoproteus massardi* e as linhagens de outras espécies de parasitos do gênero (Figura 17) permitem afirmar que *Haemoproteus massardi* possui características taxonômicas suficientes para se firmar como uma nova espécie do gênero *Haemoproteus*.

A espécie morfológicamente mais aparentada à *Haemoproteus massardi* é *Haemoproteus columbae*, espécie de parasito que pode ocorrer em diversas espécies de hospedeiros da ordem Columbiformes (VALKIUNAS, 2005). A similaridade entre as duas espécies se dá principalmente nos microgametócitos, onde os grânulos de pigmentos hemozoínico aparecem associados à grandes vacúolos polares (compare a Figura 8 com a figura 13 de VALKIUNAS e IEZHOVA (2022)). Porém, em *Haemoproteus massardi*, a coloração, o número e o tamanho dos grânulos nos microgametócitos é diferente em relação à *Haemoproteus columbae* (Tabela 3). Apesar da similaridade morfológica dos microgametócitos entre as duas espécies, a morfologia dos macrogametócitos e a distância genética entre as duas espécies recuperada através das análises filogenéticas permitem afirmar que são duas entidades taxonômicas distintas (Figura 1). A espécie filogeneticamente mais relacionada à *Haemoproteus massardi* foi *Haemoproteus paramultipgmentatus*, uma espécie de parasito que também tem sua ocorrência na Mata Atlântica (LACORTE et al., 2013; MATOSO et al., 2021). A relativa proximidade genética entre as espécies não se reflete na morfologia dos parasitos. Além das diferenças

morfométricas entre as duas espécies (Tabela 3), o formato dos gametócitos, o número de grânulos de pigmento e principalmente a presença vacúolos nos gametócitos diferem facilmente *Haemoproteus massardi* de *Haemoproteus paramultipgmentatus*.

**Tabela 3.** Comparações morfométricas entre *Haemoproteus massardi*, *Haemoproteus paramultipgmentatus* e *Haemoproteus columbae*.

	<i>Haemoproteus massardi</i>	<i>Haemoproteus paramultipgmentatus</i>	<i>Haemoproteus columbae</i>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Geotrygon montana</i>	<i>Columbina passerina</i>	<i>Columba livia</i>
<b>Referência</b>	Presente estudo	VALKIUNAS et al., 2013	BENNET e PIERCE, 1990
<b>Medidas (μ)</b>			
<b>Macrogametócito</b>	n= 30	n= 21	n = 55
Comprimento	8,02 - 7,44 (7,79 ± 0,22)	12,7 - 18,6 (15,2 ± 1,7)	13,4 - 16,7 (14,8 ± 0,6)
Largura	3,19 - 3,04 (3,10 ± 0,64)	2 - 3,3 (2,7 ± 0,3)	3,0 - 4,2 (3,4 ± 0,3)
Área	23,5 - 21,94 (22,53 ± 0,49)	32,7 - 44,5 (36,8 ± 2,9)	-
Nº de grânulos de pigmento	18 - 15 (15,8 ± 1,3)	24 - 32 (29 ± 2,4)	16 - 36 (37,8 ± 2,6)
NDR	0,64 - 0,85 (0,71 ± 0,46)	0,4 - 0,8 (0,6 ± 0,1)	0,2 - 0,9 (0,5 ± 0,2)
<b>Núcleo do Macrogametócito</b>			
Comprimento	2,74 - 2,09 (2,29 ± 0,26)	1,8 - 2,8 (2,3 ± 0,3)	2,1 - 3,6 (2,9 ± 0,1)
Largura	1,57 - 1,38 (1,47 ± 0,37)	1,2 - 2,3 (1,6 ± 0,3)	1,5 - 3,4 (2,3 ± 0,1)
Área	3,15 - 2,93 (3,06 ± 0,32)	2 - 4,2 (3 ± 0,7)	-
<b>Microgametócito</b>	n= 30	n= 21	n = 31
Comprimento	7,74 - 7,23 (7,51 ± 0,41)	11,8 - 13,7 (12,7 ± 0,6)	11,6 - 15,5 (13,3 ± 0,6)
Largura	2,19 - 1,88 (2,02 ± 0,35)	2,3 - 3,6 (2,8 ± 0,4)	2,6 - 4,3 (3,6 ± 0,2)
Área	21,53 - 20,56 (20,99 ± 0,35)	30,5 - 42,3 (36,8 ± 3,6)	-
Nº de grânulos de pigmento	7 - 5 (5,8 ± 0,83)	4 - 8 (6 ± 0,2)	5 - 18 (10,7 ± 1,8)
NDR	0,61 - 0,79 (0,73 ± 0,49)	0,4 - 0,7 (0,5 ± 0,1)	0,2 - 0,9 (0,5 ± 0,1)
<b>Núcleo do Microgametócito</b>			
Comprimento	2,44 - 2,09 (2,22 ± 0,14)	3,8 - 6,2 (5 ± 0,6)	6,9 - 8,01 (7,8 ± 0,3)
Largura	1,40 - 1,22 (1,31 ± 0,69)	2,1 - 3,6 (2,8 ± 0,4)	2,6 - 4,3 (3,6 ± 0,2)
Área	3,08 - 2,81 (2,97 ± 0,10)	8,7 - 15,6 (11,7 ± 1,7)	-

Das 1800 linhagens genéticas de *Haemoproteus* disponíveis no Banco de dados MalAvi (BENSCH et a., 2009) as mais próximas filogeneticamente de *Haemoproteus massardi* foram ANACYA02, GEOMON01, ANAGEO04, GEOTRY01 e THASCH03 (Tabela 4). Essas linhagens não possuem caracterização morfológica e dessa forma não são associadas a nenhuma morfoespécie de *Haemoproteus*. No futuro se os estudos morfológicos confirmem que estas linhagens pertençam a espécie *Haemoproteus massardi* a distribuição deste parasito pode ser ampliada aos ambientes da América do Sul, como os Andes, a Amazônia e a Mata Atlântica. Contudo, dada a distribuição do parasito encontrada no presente estudo, o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e o Parque Nacional de Itatiaia, podemos afirmar que *Haemoproteus massardi* têm a distribuição restrita a estes dois ambientes montanos da Mata Atlântica da região Sudeste do Brasil.

Em nossas amostragens foram contempladas 104 espécies de aves e outras espécies de Columbiformes (*Leptotila rufaxilla*, *Leptotila verreauxi* e *Patagioenas plumbea*) em 3 regiões montanas da Mata Atlântica Brasileira (Anexo 1). Neste estudo *Haemoproteus massardi* mostrou sua ocorrência restrita aos hospedeiros da espécie *Geotrygon montana*. Este fato somado as linhagens geneticamente próximas de *Haemoproteus massardi* encontradas na mesma espécie hospedeira (GEOMON01 e GEOTRY01) (Tabela 4), sugere uma possível relação dessa espécie de parasito com a espécie de hospedeiro. A espécie *Geotrygon montana* distribui-se desde a América Central até o sul do continente Sul-americano e, segundo o banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009), raramente amostrada em estudos com hemosporídeos aviários. Contudo, como em nossos estudos foram amostrados somente 3 indivíduos da espécie *Geotrygon montana*, e somente uma amostragem mais ampla dessa espécie de hospedeiro poderá confirmação a relação coespecífica de *Geotrygon montana* com *Haemoproteus massardi*.



## 4.5 CONCLUSÕES

Neste estudo é descrito *Haemoproteus (Haemoproteus) massardi*, uma nova espécie de parasito hemosporídeo da família Haemoproteidae, observado em hospedeiros Columbiformes da espécie *Geotrygon montana* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e o Parque Nacional de Itatiaia. Para a descrição da nova espécie foram utilizadas ferramentas morfológicas, moleculares e filogenéticas. As características morfológicas de *Haemoproteus massardi* mostraram-se consistentes e inéditas nos dois indivíduos amostrados assim como as características genéticas do parasito recuperadas através das análises filogenéticas, dando respaldo suficiente para a confirmação da nova espécie. A presença de grandes vacúolos corados nos macrogametócitos e microgametócitos é a característica que distingue *Haemoproteus massardi* de todas as outras espécies de *Haemoproteus* encontrados em Columbiformes

O presente estudo aumenta o conhecimento sobre a diversidade global de *Haemoproteus* e contribui também para o conhecimento das espécies de hemosporídeos que ocorrem na Mata Atlântica. Os resultados apresentados aqui permitem inferir uma forte influência do relevo sobre o endemismo de *Haemoproteus* na Mata Atlântica, dado o fato que *Haemoproteus massardi* foi encontrado restritamente em ambientes montanos da Mata Atlântica nos estudos realizados até o presente momento no bioma.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo utilizamos ferramentas morfológicas, moleculares e filogenéticas para a descrição de duas novas espécies des parasitos da malária aviária de regiões montanas da Mata Atlântica, *Plasmodium erikdaemoni* em hospedeiro da espécie *Rhopias gularis* no Parque Nacional do Itatiaia e *Haemoproteus massardi*, em hospedeiros da espécie *Geotrygon montana* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos. As características morfológicas de *Plasmodium erikdaemoni* mostraram-se consistentes e inéditas assim como as características genéticas da nova linhagem recuperada, confirmando a nova espécie. Através dos resultados obtidos enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade global de *Plasmodium* e das espécies da Mata Atlântica, um bioma altamente ameaçado que tem o potencial de abrigar muitas espécies de parasitos da malária aviária ainda não conhecidos pela ciência, dada sua grande biodiversidade e a pouca amostragem já realizada. As características morfológicas de ambas as novas espécies mostraram-se consistentes e inéditas nos dois assim como as características genéticas dos parasitos recuperadas através de análises filogenéticas com dois bancos de dados distintos, dando respaldo suficiente para a confirmação das novas espécies. O presente estudo aumenta o conhecimento sobre a diversidade global dos hemosporídeos aviários e contribui também para o conhecimento das espécies que ocorrem na Mata Atlântica. Os resultados encontrados neste estudo permitem afirmar a influência do relevo sobre o endemismo dos parasitos hemosporídeos aviários na Mata Atlântica, dado o fato que tanto *Plasmodium erikdaemoni* quanto *Haemoproteus massardi* foram encontrados restritamente em ambientes montanos da Mata Atlântica.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALTIZER, S.; FOUFOPOULOS, J.; GAGER, A. Diseases and conservation. Encyclopedia of Biodiversity. **Academic Press**, v. 2, p. 10–126, 2001.
- ANJOS, C.; CHAGAS, C.; FECCHIO, A.; SCHUNCK, F.; COSTA-NASCIMENTO, M.; MONTEIRO, E.; MATHIAS, B.; BELL, J.; VALKIUNAS, G.; KIRCHGATTER, K. Avian Malaria and Related Parasites from Resident and Migratory Birds in the Brazilian Atlantic Forest, with Description of a New Haemoproteus Species. **Pathogens**, v. 10(2), p. 103–110, 2021.
- ATKINSON, C.T. & VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. Birdparasite interactions. Oxford, **Oxford University Press**, p. 19–48, 1991.
- ATKINSON, C.T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. Parasitic Diseases of Wild Birds. **John Wiley & Sons**, 2008. 608p.
- ATKINSON, C.T.; WOODS, R.J.; DUSEK, L.S. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology**, v. 11, p. 59–69, 1995.
- BARBARÁ, T.; MARTINELLI, G.; FAY, M.F.; MAYO, S.J.; LEXER, C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude "inselbergs" *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1981–1992, 2007.
- BARINO, G.; ROSSI, M.; OLIVEIRA, L.; REIS, J.; D´AGOSTO, M.; DIAS, R. *Haemoproteus syrnii* (Haemosporida: Haemoproteidae) in owls from Brazil: morphological and molecular characterization, potential cryptic species, and exo-erythrocytic stages. **Parasitology Research**, v. 120(1), p. 243–255, 2021.
- BELL, J.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; TKACH, V. "Haemosporidian Parasites of Chilean Ducks: the Importance of Biogeography and Nonpasserine Hosts," **Journal of Parasitology**, v. 106(2), p. 211-220, 2020.
- 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(3), e17654, 2011.

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. & LOPES, O. S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 117–134, 1980.

BENNETT, G.; PIERCE, M. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). **J Nat Hist**, v. 24, p. 311–325, 1990.

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.

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.

BRAGA, E.M.; BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T. **Técnicas para estudos de hemoparasitos em aves. Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, p. 395–412, 2010.

BUSH, A.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al., revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83(4), p. 575–583, 1997.

CAMPBELL, T.W. **Avian haematology and cytology**. Ames: Iowa State University Press, p. 104, 1995.

CEDROLA, F.; MARTINELE, I.; SENRA, M.; FURTADO, E.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. Rediscovery of *Plasmodium* (*Huffia*) *huffi* (Apicomplexa, Haemosporida): a lost lineage from toucans. **Parasitology Research**, v. 120, p. 3287–3296, 2021.

CHAGAS, C.R.F.; GUIMARÃES, L.O.; MONTEIRO, E.F.; VALKIŪNAS, G.; KATAYAMA, M.V.; SANTOS, S.V.; GUIDA, F.J.V.; SIMÕES, R.F.; KIRCHGATTER, K. Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. **Parasitology Research**, v. 115(4), p. 1443–1452, 2015.

CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; GUIMARÃES, L.O.; MONTEIRO, E. F.; GUIDA, F.J.; SIMÕES, R.F; RODRIGUES, P.T.; LUNA, E.J.A.; KIRCHGATTER, K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria Journal**, v. 16(83), p. 1–20, 2017.

CHATHURANGA, W.; KARUNARATNE, S.; FERNANDO, B.; DE SILVA, W.P.P. Diversity, distribution, abundance, and feeding pattern of tropical ornithophilic mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 43, p. 158–167, 2018.

CHAVES, A.V.; FREITAS, G.H.S.; VASCONCELOS, M.F.; SANTOS, F.R. Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountaintops: a review. **Systematics and Biodiversity**, v. 13, p. 1–16, 2015.

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(5), p. 329–338, 2014.

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.

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.

EJIRI, H.; SATO, Y.; KIM, K.S.; TSUDA, Y.; MURATA, K.; SAITO, K.; WATANABE, Y.; SHIMURA, Y.; YUKAWA, M. Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro Wetland, a subarctic zone of Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 48(4), p. 904–908, 2011.

FECCHIO, A.; BELL, J.A.; BOSHOLN, M.; VAUGHAN, J.A.; TKACH, V.V. et al. An inverse latitudinal gradient in infection probability and phylogenetic diversity for *Leucocytozoon* blood parasites in New World birds. **Journal of Animal Ecology**, v. 89(2), p. 423–435, 2019.

FECCHIO, A.; 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, 2017.

FECCHIO, A.; CHAGAS, C.R.F.; BELL, J.A.; KIRCHGATTER, K. Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. **Acta Tropica**, v. 204, e105364, 2020.

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.; 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.

FERRAGUTI, M.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; BENSCH, S.; ROIZ, D.; RUIZ, S.; VIANA, D.S.; SORIGUER, R.C.; FIGUEROLA, J.; DUNN, J. Ecological determinants of avian malaria infections: An integrative analysis at landscape, mosquito and vertebrate community levels. **Journal of Animal Ecology**, v. 87, p. 727–740, 2018.

FILION, A.; DESCHAMPS, L.; NIEBUHR, C.N.; POULIN, R. Anthropogenic landscape alteration promotes higher disease risk in wild New Zealand avian communities. **PLoS ONE**, v. 17(3), e0265568, 2022.

GARAMSZEGI, L.Z.; ZAGALSKA-NEUBAUER, M.; CANAL, D.; MARKÓ, G.; SZÁSZ, E.; ZSEBŐK, S.; SZÖLLŐSI, E.; HERCZEG, G.; TÖRÖK, J. Malaria parasites, immune challenge, MHC variability, and predator avoidance in a passerine bird, **Behavioral Ecology**, v. 26(5), p. 1292–1302, 2015.

GARCIA-LONGORIA, L.; HELLGREN, O.; BENSCH, S.; DE LOPE, F.; MARZAL, A. Detecting transmission areas of malaria parasites in a migratory bird species. **Parasitology**, v. 142(9), p. 1215–1220, 2015.

GARCIA-LONGORIA, L.; MØLLER, A.P.; BALBONTÍN, J.; DE LOPE, F.; MARZAL, A. Do malaria parasites manipulate the escape behaviour of their avian hosts? An experimental study. **Parasitology research**, v. 114(2), p. 4493–4501, 2015.

GARNHAM, P.C. **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 1132, 1966.

GIL-VARGAS, D.L. & SEDANO-CRUZ, R.E. Genetic variation of avian malaria in the tropical Andes: a relationship with the spatial distribution of hosts. **Malaria Journal**, v. 18(129), p. 1–9, 2019.

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.; DAVIES, R.G.; RICHARDSON, D.S. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. **Journal of Animal Ecology**, v. 83, p. 1091–1102, 2014.

GRAHAM, C.H.; CARNAVAL, A.C.; CADENA, C.D.; ZAMUDIO, K.R.; ROBERTS, T.E.; PARRA, J.L.; MCCAIN, C.M.; BOWIE, R.C.K.; MORITZ, C.; BAINES, S.B.; SCHNEIDER, C.J.; VANDERWAL, J.; RAHBEEK, C.; KOZAK, K.H.; SANDERS, N.J. The origin and maintenance of montane diversity: integrating evolutionary and ecological processes. **Ecography**, v. 37, p. 711–719, 2014.

HAFFER, J. Avian species richness in tropical South America. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 25(3), p. 157–183, 1990.

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

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.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Relevo Região Sudeste do Brasil**, 2006. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/geomorfologia/15827-unidades-de-relevo.html?=&t=acesso-ao-produto>.

Acesso em: 29 nov. 2022.

INGS, K. & DENK, D. Avian Malaria in Penguins: Diagnostics and Future Direction in the Context of Climate Change. **Animals**, v. 12(600), p. 1–11, 2022.

INPE, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Sistema de Informações Espaciais – SIE. Monitoramento das temperaturas do Sudeste Brasileiro: **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, 2021.

ISAKSSON, C.; SEPIL, I.; BARAMIDZE, V.; SHELDON, B.C. Explaining variance of avian malaria infection in the wild: the importance of host density, habitat, individual life-history and oxidative stress. **BMC Ecology**, v. 13(15), p. 1–11, 2013.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20(4), p. 1160–1166, 2019.

KITAYAMA, K. Patterns of species diversity on an oceanic versus a continental island mountain: a hypothesis on species diversification. **Journal of Vegetation Science**, v. 7, p. 879–888, 1996.

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

KORNER, C. & SPEHN, E.M. **Mountain biodiversity: a global assessment**. London: Routledge, 2002. 350 p.

KRIZANAUSKIENE, 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.

KUECKER, Z.; SOBERANES, C.; RODRÍGUEZ-FLORES, C.; ARIZMENDI, M.; JOHNSON, T. Ruddy Quail-Dove (*Geotrygon montana*). **Birds of the World**. 10.2173/bow.ruqdov.01. 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.



LACOMBE, S.; BICHET, C.; CORNET, S.; FAIVRE, B.; SORCI, G. Food availability and competition do not modulate the costs of Plasmodium infection in dominant male canaries. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 708–714, 2013.

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.

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

LIAO, W.; ATKINSON, C.T.; LAPOINTE, D.A.; SAMUEL, M.D. Mitigating Future Avian Malaria Threats to Hawaiian Forest Birds from Climate Change. **PLoS ONE**, v. 12(1), e0168880, 2017.

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

MACARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. **The theory of island biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 1967. 224 p.

MANDAL, F.B. Hurdle in taxonomy: A case of malaria parasites and other Haemosporidia. **Open Veterinary Science**, v. 2(1), p. 40–54, 2021.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ, A.D.; VALKIŪNAS, G. et al. 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, 2013.

MARTINSEN, E.; PAPERNA, I.; SCHALL, J. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: An exploration of three species concepts. **Parasitology**, v. 133(3), p. 279–288, 2006.

MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MOLLER, A.P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, v. 142, p. 541–545, 2005.

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

MATOSO, R.; CEDROLA, F.; BARINO, G.; DIAS, R.; ROSSI, M.; D'AGOSTO, M.. New morphological and molecular data for *Haemoproteus* (H.) *paramultipigmentatus* in the Atlantic Forest of Brazil. **Parasitology international**, v. 84, p. 102375, 2021.

MCNEW, S.; BARROW, L.; WILLIAMSON, J.; GALEN, S.; SKEEN, H.; DUBAY, S.; GAFFNEY, A.; JOHNSON, A.; BAUTISTA, E.; ORDOÑEZ, P.; WITT, C. Contrasting drivers of diversity in hosts and parasites across the tropical Andes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 23, p. 118(12):e2010714118, 2021.

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

MIRANDA PAEZ, A.; CHALKOWSKI, K.; ZOHDY, S. et al. Management of avian malaria in populations of high conservation concern. **Parasites Vectors**, v. 15(208), p. 1–6, 2022.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. 2022. Disponível em <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 29 nov. 2022.

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.

MUKHIN, A.; PALINAUSKAS, V.; PLATONOVA, E.; KOBYLKOVA, D.; VAKOLIUK, I; VALKIŪNAS, G. The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. **PLoS ONE**, v. 11(7), e0159216, 2016

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA G.A.B.; KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NJABO, K.Y.; CORNEL, A.J.; SEHGAL, R. N. M.; LOISEAU, C.; BUERMANN, W.; HARRIGAN, R.J.; POLLINGER, J.; VALKIŪNAS, G.; SMITH, T.B. Coquillettidia (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. **Malaria Journal**, v. 8(193), p. 1–12, 2009.

OLIVEIRA, L.; BARINO, G.T.M.; ROSSI, M.F.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R.J.P.; SANTOS, H.A. Morphological and molecular characterization of *Haemoproteus coatneyi* and *Haemoproteus erythrogravidus* (Haemosporida: Haemoproteidae) in Passeriformes in Brazil's Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29(4), e011520, 2020.

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.

OMS, Organização Mundial da Saúde. ONU - Organização das Nações Unidas. **Relatório Mundial da Malária**, 2022.

OUTLAW, D. & RICKLEFS, R. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): How to move forward in the molecular era. **Parasitology**, v. 141(10), p. 1223–1232, 2014.

PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee—second Edition. **Ornithology Research**, v. 29, p. 94–105, 2021.

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.

POREMBSKI, S.; MARTINELLI, G.; OHLEMÜLLER, R.; BARTHLOTT, W. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. **Diversity and Distributions**, v. 4, p. 107–119, 1998.

PRATES, I.; MELO-SAMPAIO, P.R.; DRUMMOND, L.D.O.; RODRIGUES, M.T.; CARNAVAL, A.C. Biogeographic links between southern Atlantic Forest and western

South America: Rediscovery, re-description, and phylogenetic relationships of two rare montane anole lizards from Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 113, p. 49–58, 2017.

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. & SHELDON, K.S. Malaria prevalence and white blood cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. **The Auk**, v. 124(4), p. 1254–1266, 2007.

ROLDÁN-ZURABIÁN, F.; JOSÉ RUIZ-LÓPEZ, M.; DE LA PUENTE, J.M. et al. Apparent absence of avian malaria and malaria-like parasites in northern blue-footed boobies breeding on Isla Isabel. *Scientific Reports*, v. 12(6892), p. 1–6, 2022.

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

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisas em Medicina Veterinária, 2002. 265p.

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.

SCHOENLE, L. A.; KERNBACH, M.; HAUSSMANN, M. F.; BONIER, F.; MOORE I. T. An experimental test of the physiological consequences of avian malaria infection. **Journal Animal Ecology**. v.86(6), p.1483-1496, 2017.

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.

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.

SEHGAL, R. N. 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.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**. v. 30(9), p. 1312–1313, 2014.

STARKLOFF, N. C.; KIRCHMAN, J. J.; JONES, A. W.; et al. Drivers of community turnover differ between avian hemoparasite genera along a North American latitudinal gradient. **Ecology Evolution**. v.10, p. 5402– 5415, 2020.

SVENSSON-COELHO, M.; BLAKE, J. G.; LOISELLE, B. A.; PENROSE, A. S.; PARKER, P. G.; & RICKLEFS, R. E. Diversity, prevalence, and host specificity of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a western Amazon assemblage. **Ornithological Monographs**, 76(1), 1-47, 2013.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**. v. 56, p. 564-577, 2007.

TAVARÉ, S. "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences". Lectures on Mathematics in the Life Sciences. **American Mathematical Society**. v. 17, p. 57–86. 1986.

TOSTES, R.; DIAS, R. J.; DAEMON, E. P.; D'AGOSTO, M. Malária em aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais mantidas em cativeiro: diagnóstico parasitológico e

molecular, e caracterização bioquímica e histopatológica. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Seropédica. v. 25: p. 7-15. 2015.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. CRC Press Boca Raton, Florida, 2005. 947p.

VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; KRIZANAUSKIENĖ, 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. & IEZHOVA, T. A. Keys to the avian malaria parasites. **Malaria Journal**. v.17, p. 212, 2018.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian *Haemoproteus* parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). **Malarian Journal**, v. 21, p. 269, 2022.

VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C.T.; SEED, T.M. **Plasmodia of birds**. In: Kreier, J.P. & San Diego, C.A. (eds.), Parasitic protozoa. Academic Press, p. 73-140, 1994,

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. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; BHERING, R. C. C.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; JUNIOR, F. C. F.; BRAGA, E. M.; & CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. **Veterinary Research**. v.46, p. 30, 2015.

VASCONCELOS, M. e RODRIGUES, M. “Patterns of geographic distribution and conservation of the open-habitat avifauna of southeastern Brazilian mountaintops (campos rupestres and campos de altitude)”. **Papéis Avulsos de Zoologia**. v.50, p. 1-29, 2010.

WALTHER, E. L.; VALKIUNAS, G.; GONZÁLEZ, A. D.; MATTA, N. E.; RICKLEFS R. E.; CORNEL, A.; SEHGAL, R. N. Description, molecular characterization, and patterns of distribution of a widespread New World avian malaria parasite (Haemosporida: Plasmodiidae), *Plasmodium* (*Novyella*) *homopolare* sp. nov. **Parasitology Research**, v.67, p 37-75, 2014.

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(4), p. 515-526, 1989.

YANG Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p. 568-573, 1998.

**ANEXO A – RELAÇÃO DAS ESPÉCIES DE AVES AMOSTRADAS NOS  
LOCAIS DO PRESENTE ESTUDO**

Classificação	Amostragem				Endemismo (CBRO 2021)		
Ordem/Família/Espécie	CAP	SEO	ITA	Total	Brasil	Mata Atlântica	Montanhas Mata Atlântica
<b>Galliformes</b>							
<b>Cracidae</b>							
<i>Penelope obscura</i>	-	-	1	1	Não	Não	Não
<b>Columbiformes</b>							
<b>Columbidae</b>							
<i>Geotrygon montana</i>		2	1	3	Não	Não	Não
<i>Leptotila rufaxilla</i>	2	3	-	3	Não	Não	Não
<i>Leptotila verreauxi</i>	1	-	-	1	Não	Não	Não
<i>Patagioenas plumbea</i>	1		1	2	Não	Não	Não
<b>Psittaciformes</b>							
<b>Psittacidae</b>							
<i>Psittacara leucophthalmus</i>			1	1	Não	Não	Não
<b>Strigiformes</b>							
<b>Strigidae</b>							
<i>Asio clamator</i>	1			1	Não	Não	Não
<b>Apodiformes</b>							
<b>Trochilidae</b>							
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	1			1	Não	Não	Não
<i>Heliodoxa rubricauda</i>			4	4	Sim	Sim	Sim
<i>Leucochloris albicollis</i>	6	1		7	Não	Não	Não
<i>Phaethornis eurynome</i>			2	2	Não	Sim	Não
<i>Stephanoxis lalandi</i>	5		2	7	Sim	Sim	Sim
<b>Piciformes</b>							
<b>Ramphastidae</b>							
<i>Ramphastos dicolorus</i>			2	2	Sim	Sim	Não
<b>Picidae</b>							
<i>Picumnus cirratus</i>	-	-	2	2	Não	Não	Não
<i>Veniliornis maculifrons</i>	1	-	-	1	Sim	Sim	Não
<b>Coraciiformes</b>							
<b>Alcedinidae</b>							
<i>Chloroceryle americana</i>	-	-	1	1	Não	Não	Não
<b>Passeriformes</b>							
<b>Dendrocolaptidae</b>							
<i>Dendrocincla turdina</i>	-	3	4	7	Não	Não	Não
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	1	-	-	1	Não	Não	Não
<i>Lepidocolaptes falcinellus</i>	-	-	1	1	Sim	Sim	Sim
<i>Lepidocolaptes squamatus</i>	-	3	-	3	Não	Não	Não
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	6	9	6	21	Não	Não	Não

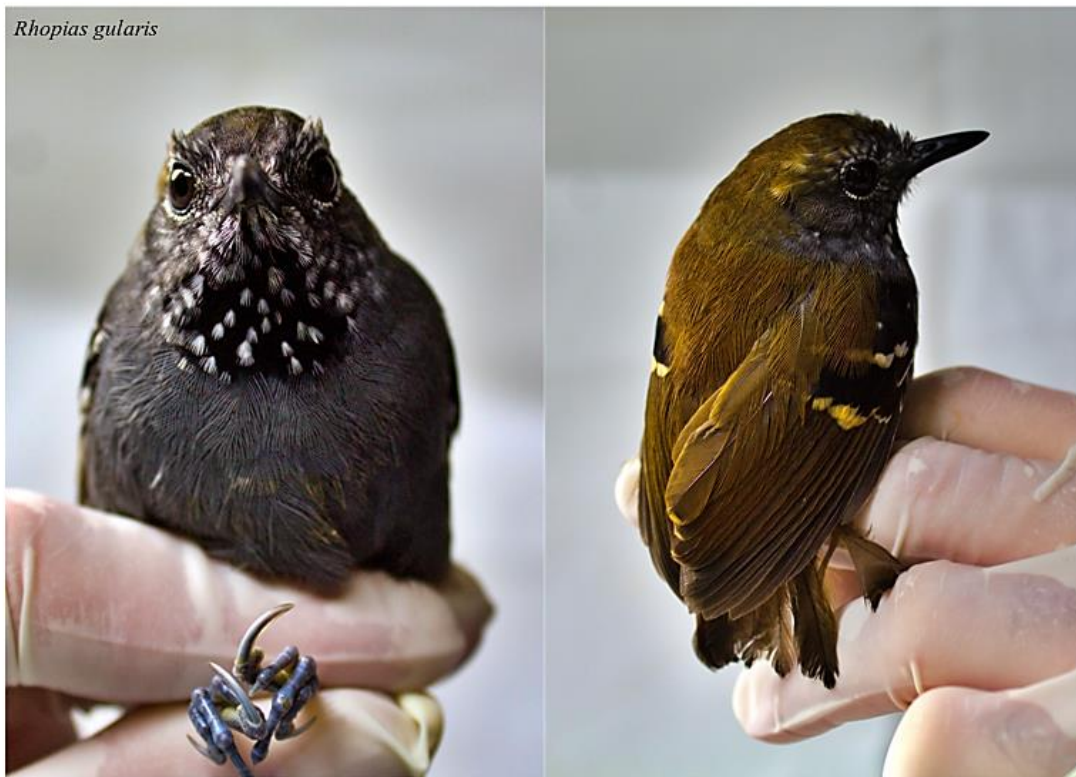


<i>Xiphocolaptes albicollis</i>	-	2	-	2	Não	Não	Não
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	6	9	18	33	Não	Não	Não
<b>Furnariidae</b>							
<i>Anabazenops fuscus</i>	1	2		3	Sim	Sim	Não
<i>Asthenes moreirae</i>	-	-	8	8	Sim	Sim	Sim
<i>Cranioleuca pallida</i>	-	-	3	3	Sim	Sim	Não
<i>Lochmias nematura</i>	-	-	3	3	Não	Não	Não
<i>Philydor rufum</i>	-	1		1	Não	Não	Não
<i>Phylidor atricapillus</i>	-	-	2	2	Não	Não	Não
<i>Synallaxis cinerascens</i>	5	-		5	Não	Não	Não
<i>Synallaxis ruficapila</i>	5	-	4	9	Sim	Sim	Não
<i>Synallaxis spixi</i>	2	-	-	2	Sim	Sim	Sim
<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	-	1	-	1	Não	Não	Não
<b>Xenopidae</b>							
<i>Xenops minutus</i>	-	1	-	1	Sim	Não	Não
<b>Scleruridae</b>							
<i>Sclerurus scansor</i>		9		9	Sim	Não	Não
<b>Thamnophilidae</b>							
<i>Drymophila genei</i>			4	4	Sim	Sim	Sim
<i>Drymophila ochropyga</i>	1			1	Sim	Sim	Sim
<i>Dysithamnus mentalis</i>		4	3	7	Sim	Sim	Sim
<i>Mackenziaena leachii</i>			1	1	Sim	Sim	Sim
<i>Mackenziaena severa</i>	1			1	Sim	Sim	Sim
<i>Myrmoderus loricatus</i>		1		1	Sim	Sim	Sim
<i>Pyriglena leucoptera</i>	19	4	1	24	Não	Não	Não
<i>Rhopias gularis</i>		8	4	12	Sim	Sim	Sim
<i>Thamnophilus caerulescens</i>	3		1	4	Sim	Não	Não
<i>Thamnophilus ruficapillus</i>			2	2	Não	Não	Não
<b>Grallaridae</b>							
<i>Grallaria varia</i>		1		1	Sim	Não	Não
<b>Conopophagidae</b>							
<i>Conopophaga lineata</i>	7	4	3	14	Não	Não	Não
<i>Conopophaga melanops</i>		2	2	4	Sim	Sim	Sim
<b>Tyranidae</b>							
<i>Elaenia chiriquensis</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Elaenia mesoleuca</i>	1		3	4	Não	Não	Não
<i>Elaenia obscura</i>			2	2	Não	Não	Não
<i>Elaenia parvirostris</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Knipolegus cyanirostris</i>	2		3	5	Sim	Sim	Sim
<i>Knipolegus nigerrimus</i>	2		2	4	Sim	Não	Não
<i>Lathrotriccus euleri</i>	4	1		5	Não	Não	Não
<i>Megarynchus pitangua</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Myiarchus swainsoni</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Myiophobus fasciatus</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Phyllomyias fasciatus</i>			1	1	Sim	Sim	Não

<b>Platyrinchidae</b>							
<i>Platyrinchus mystaceus</i>	8	11	7	26	Sim	Sim	Não
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>			6	6	Sim	Sim	Não
<b>Rhynchocyclidae</b>							
<i>Corythopsis delalandi</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Hemitriccus diops</i>	1		3	4	Sim	Sim	Sim
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	6		1	7	Não	Não	Não
<i>Mionectes rufiventris</i>	2	1	2	5	Sim	Sim	Não
<i>Myiornis auricularis</i>			1	1	Sim	Sim	Não
<i>Phylloscartes difficilis</i>			2	2	Sim	Sim	Não
<i>Todirostrum poliocephalum</i>			2	2	Sim	Sim	Não
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	2			2	Não	Não	Não
<b>Onychorhynchidae</b>							
<i>Myiobius atricaudus</i>	2		1	3	Sim	Sim	Não
<b>Tytiridae</b>							
<i>Pachyrampus castaneus</i>			1	1	Não	Não	Não
<b>Vireonidae</b>							
<i>Hylophilus poicilotis</i>		2		2	Não	Sim	Não
<b>Pipridae</b>							
<i>Chiroxiphia caudata</i>	2	6	13	21	Não	Não	Não
<i>Ilicura militaris</i>	4	6	1	11	Sim	Sim	Não
<i>Manacus manacus</i>			2	2	Não	Não	Não
<i>Neopelma chrysolophum</i>			2	2	Sim	Sim	Não
<i>Schiffornis virescens</i>			5	5	Não	Não	Não
<b>Troglodytidae</b>							
<i>Troglodytes musculus</i>	3		3	6	Não	Não	Não
<b>Turdidae</b>							
<i>Turdus albicollis</i>	2	3		5	Não	Não	Não
<i>Turdus amaurochalinus</i>	2			2	Não	Não	Não
<i>Turdus flavipes</i>		3	3	6	Sim	Sim	Não
<i>Turdus leucomelas</i>	3			3	Não	Não	Não
<i>Turdus rufiventris</i>	12	3	3	18	Não	Não	Não
<i>Turdus subalaris</i>			1	1	Não	Não	Não
<b>Parulidae</b>							
<i>Basileuterus culicivorus</i>	17	6	9	32	Não	Não	Não
<i>Myiothlypis leucoblephara</i>		12	6	18	Sim	Não	Não
<b>Thraupidae</b>							
<i>Coereba flaveola</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Embernagra platensis</i>			2	2	Não	Não	Não
<i>Haplospiza unicolor</i>	2		4	6	Sim	Sim	Sim
<i>Microspingus lateralis</i>	7		6	13	Sim	Sim	Sim
<i>Poospiza thoracica</i>			3	3	Sim	Sim	Sim
<i>Saltator similis</i>	5		1	6	Não	Não	Não
<i>Stephanophorus diadematus</i>	6		6	12	Sim	Sim	Sim
<i>Tachyphonus coronatus</i>	3		9	12	Sim	Sim	Não

<i>Tangara desmaresti</i>	2	8	14	24	Sim	Sim	Sim
<i>Tangara ornata</i>			3	3	Sim	Sim	Não
<i>Tangara seledon</i>			5	5	Sim	Sim	Não
<i>Trichothraupis melanops</i>	15		15	30	Não	Não	Não
<b>Cardinalidae</b>							
<i>Cyanoloxia brissonii</i>			1	1	Não	Não	Não
<i>Habia rubica</i>		9		9	Não	Não	Não
<i>Spinus magellanicus</i>			7	7	Não	Não	Não
<b>Fringillidae</b>							
<i>Euphonia pectoralis</i>			6	6	Sim	Sim	Não
<b>Passerellidae</b>							
<i>Arremon semitorquatus</i>	2			2	Sim	Sim	Não
<i>Zonotrichia capensis</i>	11		17	28	Não	Não	Não

**ANEXO B – INDIVÍDUOS DE *Rhopias gularis* E *Geotrygon montana*  
AMOSTRADOS NO PRESENTE ESTUDO**



**ANEXO C - MANUSCRITO EXTRA PREPARADO COM RESULTADOS SECUNDÁRIOS DA AMOSTRAGEM DA TESE SUBMETIDO EM JULHO DE 2022 À REVISTA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (ISSN 2236-2886).**

**Climbing for survive? A new altitudinal limit from Black-cheeked Gnateater (*Conopophaga melanops*) in Atlantic Forest**

**ABSTRACT**

The Brazilian Atlantic Forest, despite being one of the most threatened environments in the world, is still one of the great hotspots of world richness and endemism of birds. In this scenario, relief is one of the factors influencing the large number of endemic species of birds. Endemic to the Atlantic Forest, the Black-cheeked Gnateater *Conopophaga melanops*, occurs in lowland forests on the east coast of Brazil, from sea level to 800m altitude above sea level. Its high sensitivity to ecological disturbances makes it an excellent bioindicator of environmental quality. Here, during a field sampling in Parque Nacional da Serra dos Órgãos, 2 individuals of *C. melanops* were captured, at 1287 and 1409m of altitude. Fragmentation and environment loss have historically threatened bird species in the Atlantic Forest, and anthropogenic changes, such as global warming, have driven populations of organisms into movements never noticed before by science putting its conservation at risk. To try to explain the new record, we get up two hypotheses, the absence of sampling in the highest regions of the Atlantic Forest and the possibility of bird populations moving to more preserved places. The second draws attention to its implication in the conservation of Black-cheeked Gnateater. Since this species depends on preserved environments for its occurrence, we can question whether deforestation in its historical area of occurrence could be the cause of the new record.

**KEYWORDS:** PARNASO; mountain biodiversity; deforestation; global warming; conservation.

**INTRODUCTION**

The Brazilian Atlantic Forest, despite being one of the most threatened environments in the world (Myers et al. 2000), is still one of the great centres of world richness and endemism of birds (Jenkins et al. 2015). In this scenario, relief is one of the factors influencing the large number of endemic species of birds (Vasconcelos & Rodrigues, 2010; Chaves et al. 2015), with 223 species occurring exclusively in the

Atlantic Forest (Vale et al. 2018). The only species of genus *Conopophaga* endemic to the Brazilian Atlantic Forest, the Black-cheeked Gnatcatcher *Conopophaga melanops* (Vieillot 1818) is a passerine belonging to the Conopophagidae family. Current literature suggests that Black-cheeked Gnatcatcher occurs in lowland forests on the east coast of Brazil, but can occasionally be found on mountain slopes, being recorded from sea level to 800m altitude (Parker III et al. 1996; Sick 1997; Mallet-Rodrigues 2010). One of the possible factors for the limit of the altitudinal distribution of *C. melanops* would be the competition for the same ecological niche with the congener *Conopophaga lineata* (Wied 1831), which replaces *C. melanops* at altitudes above 800m in the mountainous regions of eastern Brazil (Sick 1997).

Living inside of dense forests, Black-cheeked Gnatcatcher uses the low stratum for foraging on the ground or at low height (Alves & Duarte 1996), a fact that makes it difficult to be observed. Due to its behavioural characteristics, Black-cheeked Gnatcatcher is classified as a of sedentary species bird that is dependent on the interior of forests (Sick 1997). Its high sensitivity to ecological disturbances makes it an excellent bioindicator of environmental quality, since it only occurs in mature forests and Atlantic Forest fragments with considerable extensions (Machado & Fonseca 2000; Piratelli 2008; Manhães & Loures-Ribeiro 2011; Melo et al. 2018). Fragmentation and environment loss have historically threatened bird species in the Atlantic Forest (Brooks & Balmford 1996; Pizo & Tonetti 2020), and anthropogenic changes, such as global warming, have driven populations of organisms into movements never noticed before by science (Chen et al. 2011; Tingley et al. 2012), putting its conservation at risk. Therefore, supported by these justifications, we present a new record on the altitudinal distribution of *C. melanops* in Serra dos Órgãos National Park.

## **MATERIAL AND METHODS**

The Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO); (Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil), located in the Atlantic Forest biome, has 20.024ha of protected areas that present a wide variety of environments, from lowland forests to the coastal region (below 400m), to montane forests (up to 1.500m) and “Campos de altitude” (above 1.800m) (Veloso et al. 1991). The complex geography of the region is represented by exposed rock peaks covered by grassland vegetation and valleys with dense forests (Fig.1 - G). On the slopes of the peaks grows an ombrophilous forest rich in large trees, tangles of vines and epiphytes (Fig.1 C/D/E). In this environment, ornithological nets between 1200 and

1500m above sea level were extended (O 22 26 48.597, S 43 0 31.041) (Fig.1 - F). The ornithological nets (12m long by 3m high and with 36mm of mesh) were arranged alone and in linear sets of 3 nets totalling 200m long transects, being extended from before sunrise to the middle of the day and checked every 15 minutes. After capture, the birds were identified using the field guide Sigrist (2014). All procedures were approved by the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) of the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio), under authorization number. 68906-1/2019 and approved by the Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, under protocol No. 042/2012.

## **RESULTS**

During a field sampling in November of 2020 in PARNASO, 2 individuals of *C. melanops* were captured (Fig.1 – A/B), at 1287 and 1409m of altitude. Until the present moment, it was believed that the limit of the altitudinal distribution of the species in the Atlantic Forest occurred around 800m of altitude (Straube 1989; Alves and Duarte 1996; Sick 1997; Machado and Fonseca 2000; Alves 2002; Lopes et al. 2005; Lunardi et al. 2007; Piratelli 2008; Souza 2008; Lima and Ropper 2009; Mallet-Rodrigues 2010; Manhães and Loures-Ribeiro 2011; Lima 2013; Melo et al. 2018). However, the records presented in this work allow us to reflect on the altitudinal limit of occurrence of the species.

## **DISCUSSION**

Historically, the understanding of the distribution of a species is based on compiled reports made by several studies over time. In this context, a great problem for understanding the distribution of taxa are the regions poorly sampled by science, such as the highest altitudes of the mountains of the Atlantic Forest. For these regions, which are most often isolated and difficult to access, ornithological studies, even taking place over more than a century, are still few and far between (Vasconcelos & Pacheco 2012;

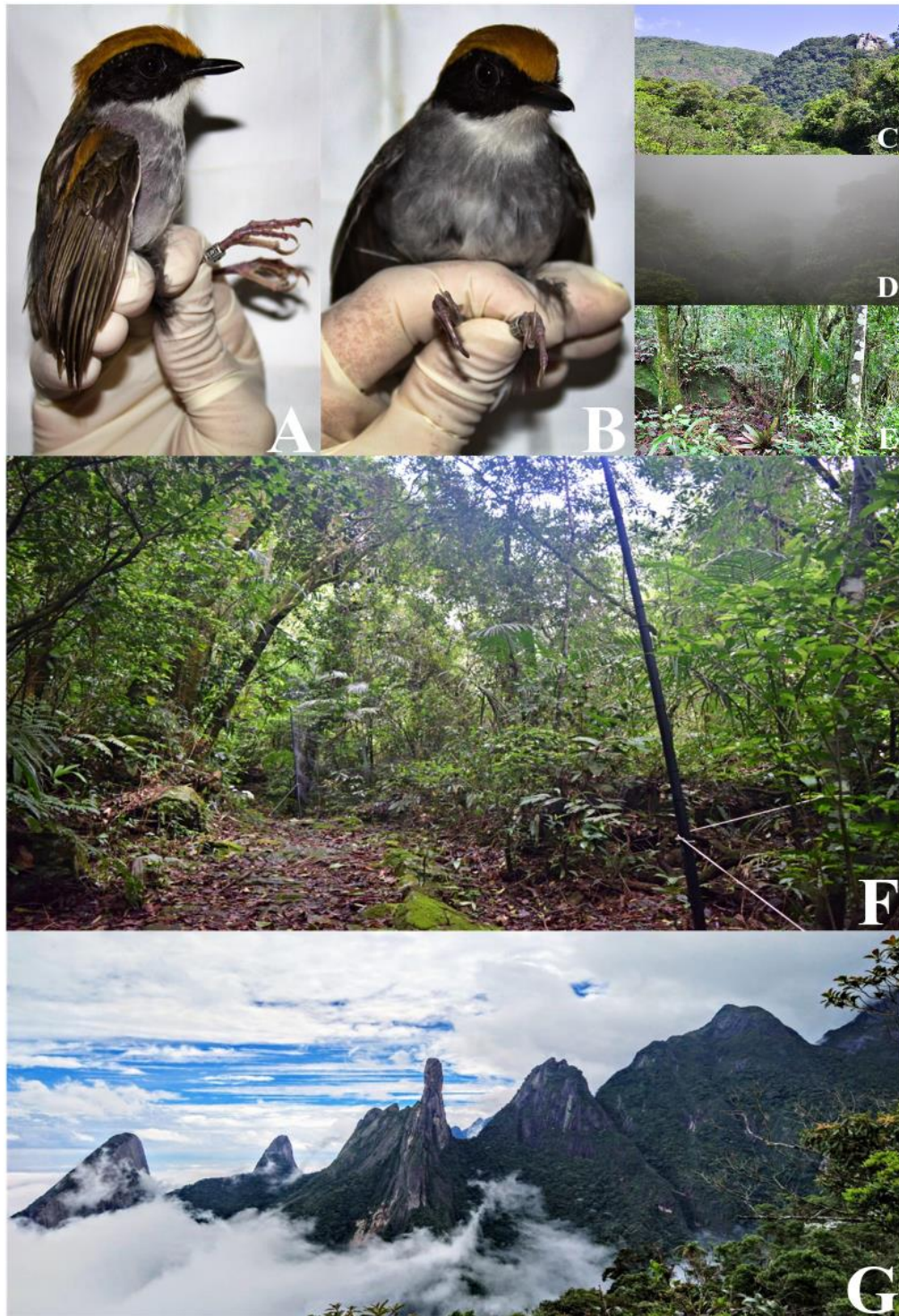


Figure - 1: A/B *Conopophaga melanops*; C/D/E – Environments of Serra dos Órgãos National Park; F – Ornithological nest at the specimen sampling site; G - Forest on the slopes of the peaks.



Chaves et al. 2015). Thus, we believe that the lack of sampling may be a factor that has masked the altitudinal distribution limit of Black-cheeked Gnatcatcher over the years.

In the region where the PARNASO is located, Black-cheeked Gnatcatcher has occurred below 800m of altitude (Cory & Hellmayr 1924; Naumburg 1937; Pinto & Camargo 1961; Scott & Brooke 1985; Mallet -Rodrigues & Noronha 2003a; Mallet-Rodrigues & Noronha 2003b; Mallet-Rodrigues 2005) and according to Mallet-Rodrigues (2007) it is historically a “reasonably common” species found in more than 50% of the lists. However, the species Black-cheeked Gnatcatcher has a high sensitivity to environmental disturbances, being dependent on preserved areas for its survival (Machado & Fonseca 2000; Piratelli 2008; Manhães & Loures-Ribeiro 2011; Melo et al. 2018), environments that are not so abundant in the region today (SOS Mata Atlântica /INPE 2020).

The places where the new registrations were made are in a Federal Conservation Unit, where there is a large area covered by preserved forests. The lowland areas of the Atlantic Forest around PARNASO, typical environments for the distribution of the species (Sick 1997), have historically harmed from a great loss of *habitat* and biodiversity (Collar et al. 1992; Alves et al. 2000; Lima et al. 2020), making it unlikely that maintenance of large populations of *C. melanops* (Melo et al. 2018). Thus, another possible explanation for the new record would be the displacement of Black-cheeked Gnatcatcher populations to higher altitudes, where the environment is more suited to their needs (Lunardi et al. 2008; Souza et al. 2011; Freeman et al. 2018).

## CONCLUSION

Among the two hypotheses raised to try to explain the new record, that is, the absence of sampling in the highest regions of the Atlantic Forest and the possibility of bird populations moving to more preserved places, the second draws attention to its implication in the conservation of Black-cheeked Gnatcatcher. Knowing that this species depends on preserved environments for its occurrence, including being considered a bioindicator of *habitat* quality in the Atlantic Forest (Piratelli 2008), we can believe that deforestation around PARNASO may be the cause of the new record. This hypothesis becomes more acceptable when based on the studies by Lunardi et al. (2008) & Melo et

al. (2018), which elucidate the vulnerability of Black-cheeked Gnatcatcher populations in the small fragments of forest remaining in their historical area of occurrence.

However, to confirm this hypothesis, we encourage more detailed studies with populations of Black-cheeked Gnatcatcher, mainly in the PARNASO region. We also hope, with this new record and with the issues raised, to stimulate more research on the mountain tops of Brazil, under-sampled areas, rich in biodiversity and increasingly threatened in a changing planet (WWF 2020). Finally, given the new records of *C. melanops* in the Serra dos Órgãos National Park, we propose the expansion of the altitudinal distribution limit of this species to 1500m of altitude.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank for Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

## REFERENCES

- Alves MAS, Duarte MF. Táticas de forrageamento de *Conopophaga melanops* (Passeriformes: Formicariidae) na área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. Ararajuba, 4:110-112, 1996.
- Alves MAS, Pacheco JF, Gonzaga LAP, Cavalcanti RB, Raposo MA, Yamashita C, Maciel MC, Castanheira M. 2000. Aves. In: Bergallo HG, Rocha CFD, Alves MAS, Van Sluys M (orgs.). A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro, edUERJ, Rio de Janeiro, pp 113-124.
- Alves MAS, Rocha CFD, Van Sluys M, Vecchi MB. Nest, eggs and effort partitioning in incubation and rearing by a pair of the Black-cheeked gnatcatcher, *Conopophaga melanops* (Passeriformes, Conopophagidae), in an Atlantic Rainforest area of Rio de Janeiro, Brazil. Ararajuba, 10: 67-71, 2002.
- Brooks T, Balmford, A (1996) Atlantic forest extinctions. Nature 380p.
- Chaves AV, Freitas GHS, Vasconcelos MF, Santos FR. Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountaintops: a review. Systematics and Biodiversity, 13:1-16, 2015.

- Chen I-C, Hill JK, Ohlemüller R, Roy DB, Thomas CD. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science*, 333:1024–1026, 2011.
- Collar NJ (1992) *Threatened birds of the Americas: The ICBP/IUCN Red Data Book*. Smithsonian Institution Press, Cambridge, 558p.
- Cory, C. B. & C. E. Hellmayr (1924-1927) *Catalogue of birds of the Americas and the adjacent islands*. Field Mus. Nat. Hist., Zool, Chicago.
- Freeman BG, Scholer MN, Gutierrez VR, Fitzpatrick JW. Climate change causes upslope shifts and mountaintop extirpations in a tropical Bird community. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 115:11882-11887, 2018.
- Jenkins CN, Alves MAS, Uezu A, Vale MM. Patterns of vertebrate diversity and protection in Brazil. *PLoS ONE*, 10:1-13, 2015.
- Lima AMXD, Roper JJ. Population dynamics of the black-cheeked gnateater (*Conopophaga melanops*, Conopophagidae) in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 25:605-613, 2009
- Lima AMXD, Roper JJ. Early singing onset in the black-cheeked gnateater (*Conopophaga melanops*). *Revista Brasileira de Ornitologia*, 21: 5-9, 2013.
- Lima RAF, et al., The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Nature Communications*, 11: 1-16, (2020).
- Lopes LE, Fernandes AM, Marini MA. Diet of some Atlantic Forest birds. *Ararajuba*, 13: 95-103, 2005.
- Lunardi VO, Francisco MR, Galletti Jr. PM. Population structuring of the endemic black-cheeked gnateater, *Conopophaga melanops melanops* (Vieillot, 1818) (Aves, Conopophagidae), in the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*, 67:867-872, 2007.
- Machado RB, Fonseca GBD. The Avifauna of Rio Doce Valley, Southeastern Brazil, a Highly. *Biotropica*, 32:914-924, 2000.
- Mallet-Rodrigues F. Molt-breeding cycle in passerines from a foothill forest in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 13:155-160, 2005.

- Mallet-Rodrigues F. The avifauna of low elevations in the Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro state, south-east Brazil. *Cotinga*, 20: 51-56, 2003a.
- Mallet-Rodrigues F. Variação na taxa de captura de passeriformes em um trecho de mata atlântica de encosta, no sudeste do Brasil. *Ararajuba*, 11: 111-118, 2003b.
- Mallet-Rodrigues F, Parrini R, Pimentel LMS, Bessa R. Altitudinal distribution of birds in a mountainous region in southeastern Brazil. *Zoologia*, 27:503-522, 2010.
- Manhães MA, Loures-Ribeiro A. Avifauna da Reserva Biológica Municipal Poço D'Anta, Juiz de Fora, MG. *Biota Neotropical*, 11:275-286, 2011.
- Melo DDC, Ferreira AP, Loures-Ribeiro A. Structure of understory bird communities in Atlantic Forest Remnants in Northeastern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 40:1-7, 2018.
- Myers N, Mittermaier RA, Mittermaier CG, Da Fonseca GAB, Kente J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853–858, 2000.
- Naumburg EMB. Studies of birds from eastern Brazil and Paraguay, based on a collection made by Emil Kaempfer. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 74:139-205, 1937.
- Parker III TA, Stotz FD, Fitzpatrick J (1996) *Ecological and Distributional Databases for Neotropical Birds*. University of Chicago Press, Chicago. 315p.
- Piacentini VQ, et al., Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Rev. Bras. Ornitol.*, 23:91–298, 2015.
- Pinto OMO, Camargo EA. Resultados ornitológicos de quatro recentes expedições do Departamento de Zoologia ao Nordeste do Brasil, com a descrição de seis novas subespécies. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 11:193-284, 1961.
- Piratelli A, Sousa SD, Corrêa JS, Andrade VA, Ribeiro RY, Avelar LH, Oliveira EF. Searching for bioindicators of forest fragmentation: passerine birds in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Brazilian Journal Biology*, 68:259-268, 2008.
- Pizo MA, Tonetti VR. Living in a fragmented world: Birds in the Atlantic Forest. *The Condor*, 122:1-14, 2020.

Projeto RADAMBRASIL (1983) Folhas SF. 23/24, Rio de Janeiro/Vitoria: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação, uso potencial da terra / Projeto RADAMBRASIL [v. 32]. O Projeto, Rio de Janeiro.

Scott DA, Brooke ML. (1985) The endangered avifauna of Southeastern Brazil: a report on the BOU/WWF expeditions of 1980/81 and 1981/82. In: Diamond AW, Lovejoy TE (Eds.) Conservation of Tropical Forest Birds. Cambridge: ICBP (Techn.Publ. 4). Princeton Univ Pr, Cambridge, pp 115-139.

Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 726p.

Sigrist T (2014) Avifauna Brasileira – Guia de Campo Avis Brasilis. Avis Brasilis, Vinhedo. 289p.

Silva JMC, Sousa MC, Castelletti CHM. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest, South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13:85–92, 2004.

Fundação SOS Mata Atlântica/INPE Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) (2020) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. Publishing SOSMA. [https://cms.sosma.org.br/wp-content/uploads/2021/05/SOSMA\\_Atlas-da-Mata-Atlantica\\_2019-2020.pdf](https://cms.sosma.org.br/wp-content/uploads/2021/05/SOSMA_Atlas-da-Mata-Atlantica_2019-2020.pdf) Accessed 19 February 2022.

Souza TV, Lorini ML, Alves MAS, Cordeiro P, Vale MM. Redistribution of threatened and endemic Atlantic Forest birds under climate change. *Natureza Conservação*, 9:214-218, 2011.

Souza LMD (2008) ECOLOGIA TRÓFICA DE *Conopophaga lineata* (WIED, 1831) E *Conopophaga melanops* (VIEILLOT, 1818) (AVES CONOPOPHAGIDAE): ASPECTOS DA RELAÇÃO DE NICHOS E SELEÇÃO DE PRESAS. Dissertation, Universidade Federal de Juiz de Fora. <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/5873>

Stattersfield AJ, Crosby MJ, Long AJ, Wege DC, Rayner AP (1998) Endemic bird areas of the world: priorities for biodiversity conservation. BirdLife Conservation Series, Cambridge.

Straube FC. Notas bionômicas sobre *Conopophaga melanops* (vieillot, 1818) no estado do paraná. *Biotemas*, 2: 91-95, 1989.

Tingley MW, Koo MS, Moritz C, Rush AC, Beissinger SR. The push and pull of climate change causes heterogeneous shifts in avian elevational ranges. *Global Change Biology*, 18:3279–3290, 2012.

Vale MM, Tourinho L, Lorini ML, Rajão H, Figueiredo MSL. Endemic birds of the Atlantic Forest: traits, conservation status, and patterns of biodiversity. *J. Field Ornithol.*, 89:193–206, 2018

Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Monography, IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia). <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/classificacaovegetal.pdf>

Vasconcelos MF, Pacheco JF. The historical contribution of scientific collecting activities in the nineteenth and twentieth centuries to the knowledge of the avifauna of the campos rupestres and campos de altitude eastern Brazil. *Atualidades Ornitológicas*, 168: 52-65, 2012.

Vasconcelos MF, Rodrigues M. Patterns of biogeographic, distribution and conservation of the open-*habitat* avifauna of southeastern Brazilian mountaintops (campos rupestres and campos de altitude). *Papeis Avulsos de Zoologia*, 50:1-29, 2010.

Studer A, Sousa MCD, Barcena B. Breeding biology and nesting success of the endemic Black-cheeked Gnatcatcher (*Conopophaga melanops*). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 54:157-162, 2019.

World Wildlife Fund (WWF) (2020) Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. Publishing Living Planet: <https://livingplanet.panda.org> Accessed 19 February 2022