

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

**TESE**

**COCCÍDIOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PASSERIFORMES DO  
SUDESTE BRASILEIRO: TAXONOMIA E ECOLOGIA**

**LIDIANE MARIA DA SILVA DE CARVALHO**

**Seropédica, RJ**

**2020**



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

**COCCÍDIOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PASSERIFORMES DO SUDESTE  
BRASILEIRO: TAXONOMIA E ECOLOGIA**

**LIDIANE MARIA DA SILVA DE CARVALHO**

*Sob a orientação do Professor*

**Dr. Bruno Pereira Berto**

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

**Seropédica, RJ**  
**Fevereiro de 2020**

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

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

C331c Carvalho, Lidiane Maria da Silva de, 1987-  
Coccídios de Diferentes Espécies de Passeriformes  
do Sudeste Brasileiro: Taxonomia e Ecologia /  
Lidiane Maria da Silva de Carvalho. - Rio de Janeiro,  
2020.  
206 f.

Orientador: Bruno Pereira Berto.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, 2020.


1. Parasitologia Veterinária. 2. Coccídio. 3.  
Isospora. 4. Pássaro. 5. Parque Nacional do Itatiaia.  
I. Berto, Bruno Pereira, 1984-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III.  
Título.

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

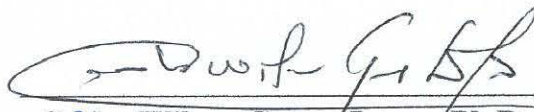
**LIDIANE MARIA DA SILVA DE CARVALHO**

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

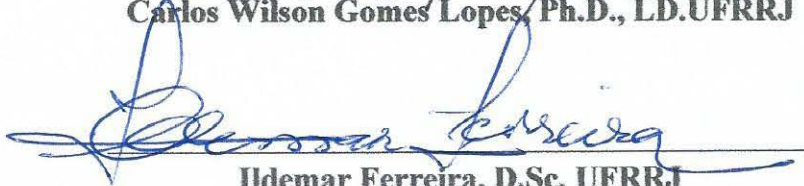
**TESE APROVADA EM 06/02/2020**



**Bruno Pereira Berto, D.Sc. UFRRJ**  
**(Orientador)**



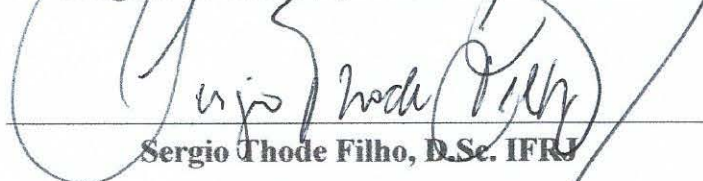
**Carlos Wilson Gomes Lopes, Ph.D., LD.UFRRJ**



**Idemar Ferreira, D.Sc. UFRRJ**



**Sergian V. Cardozo, D.Sc. UNIGRANRIO**



**Sergio Thode Filho, D.Sc. IFRJ**



**Viviane Moreira de Lima, D.Sc. UFRRJ**

## DEDICATÓRIA

*A Deus, por tudo que tem realizado na minha vida, e mesmo quando me senti desacreditada  
Ele estava ali me dando força e me empurrando para o caminho da vitória.*

*Aos meus pais, José Paulo da Silva e Lídia de Oliveira Silva, por todos os ensinamentos, pela  
confiança, por todo apoio, amor e carinho.*

*Ao meu esposo, Roger Martins de Carvalho, pelo companheirismo, cumplicidade, dedicação,  
por todo apoio, principalmente nos momentos difíceis pelos quais passei até chegar aqui.*

*À minha sogra, Márcia de Souza Martins de Carvalho, pelo carinho, por não me deixar  
desanimar e sempre me aconselhar a seguir em frente.*

*Aos meus familiares e amigos pelo incentivo, amizade e atenção.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte da conclusão deste trabalho.

Em especial, ao Professor Dr. Bruno Pereira Berto (Laboratório de Biologia de Coccídios, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por sua amizade, dedicação, confiança, ensinamentos, orientação, pelo suporte acadêmico e muitas das vezes emocional, pelas suas correções, colocações e incentivos.

Aos Professores Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes (Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia, Anexo 1 do Instituto de Veterinária, UFRRJ), Dr. Ildemar Ferreira, Dr.<sup>a</sup> Viviane Moreira de Lima, Dr.<sup>a</sup> Marília de Carvalho Brasil Sato, Dr.<sup>o</sup> Hécio Resende Borba, todos do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFRRJ, por suas recomendações, sugestões e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Coccídios, ICBS, UFRRJ, por todo companheirismo, compreensão, auxílio e resignação, em especial as discentes Mariana Borges Rodrigues e Mariana de Souza Oliveira, pela amizade, carinho, compreensão, ajuda e paciência.

A equipe das atividades de campo, por todos os momentos de convivência, ensinamentos, assessoria e parceria.

Aos funcionários do Parque Nacional do Itatiaia (PNI), em especial o Dr. Léo Nascimento, por conceder a entrada no PNI para realização das atividades de campo.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, seu corpo docente, direção e administração que propiciaram a janela que hoje vislumbro um horizonte maior.

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

## BIOGRAFIA

**LIDIANE MARIA DA SILVA DE CARVALHO**, filha de José Paulo da Silva e Lídia de Oliveira Silva, brasileira, nasceu aos 18 de julho de 1987 no município do Recife, Pernambuco. Estudou na Escola Municipal Baltazar Lisboa onde cursou o Ensino Fundamental 1, cursou o Ensino Fundamental 2 na Escola Municipal Charles Peguy e no Colégio Estadual Professor Fernando Antônio Raja Gabaglia cursou o Ensino Médio, completando sua formação no ensino básico. Iniciou sua formação profissional em 2010, ingressando no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Castelo Branco (UCB), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ. Foi estagiária no Laboratório de Biologia de Coccídios do Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Pereira Berto no 1º semestre de 2014. Em julho de 2014, graduou-se como Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, no qual defendeu o TCC intitulado **“Entomologia Forense: a ocorrência da espécie *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), em produtos estocados examinados no Estado do Rio de Janeiro”**, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Janyra Oliveira Costa. Ingressou em agosto de 2014 no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) em nível de mestrado na UFRRJ, desenvolvendo como tema de Dissertação o projeto intitulado **“Espécies de Coccídios de *Thamnophilidae* (Aves: Passeriformes) no Parque Nacional do Itatiaia, RJ: Morfologia e Taxonomia”** sob a orientação do Prof. Bruno Pereira Berto. Recebeu o título de Mestre em Ciências em fevereiro de 2016. No mês seguinte, ingressou no PPGCV, da mesma Instituição em nível de doutorado.

*"O coração do homem propõe o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos."*

*Provérbios, cap.16. v. 9, Bíblia Sagrada.*



## RESUMO

SILVA-CARVALHO, Lidiane Maria. **Coccídios de Diferentes Espécies de Passeriformes do Sudeste Brasileiro: Taxonomia e Ecologia**. 2020. 206p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

As famílias da ordem Passeriformes, podem ser parasitadas por diversas espécies de coccídios, principalmente dos gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo identificar, caracterizar e quantificar espécies de coccídios parasitos das famílias Thamnophilidae, Tyrannidae, Conopophagidae e Icteridae no Parque Nacional do Itatiaia (PNI) principalmente. Foram realizadas dezenove expedições ao PNI, e outras três expedições, em duas localidades distintas: Cacaria e Barra Mansa. As aves foram capturadas com o auxílio de redes de neblina, ao todo foram capturados 204 espécimes de aves sendo: 100 taminofilídeos, 89 tiranídeos, 7 conopofagídeos e 8 icterídeos, após o processamento das amostras observou-se coccídios do gênero *Isospora* ou *Eimeria* presentes nas quatro famílias abordadas neste estudo. Desta forma, este trabalho apresenta uma revisão da literatura científica nos temas de ecologia e taxonomia de coccídios de Thamnophilidae, Tyrannidae, Conopophagidae e Icteridae, e, como resultados, cinco artigos científicos apresentado em ordem cronológica descrevendo um novo hospedeiro *Cacicus haemorrhous* (Linnaeus, 1766) e localidade (PNI) para *Isospora bellicosa* Upton, Stamper e Whitaker, 1995, e uma nova espécie *Isospora guaxi* Silva & Berto, 2017 parasitando *C. haemorrhous* na família Icteridae; uma nova espécie *Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018, a partir do *Platyrinchus mystaceus* Vieillot, 1818 no PNI na família Tyrannidae; um novo hospedeiro *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818) e localidade (PNI) para *Isospora sagittulae* McQuiston e Capparella, 1992 na família Thamnophilidae; uma nova espécie *Isospora borbai* Silva-Carvalho et Berto, 2019 parasitando dois hospedeiros distintos, *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818), e *Conopophaga lineata* (Wied, 1831) na família Conopophagidae; e por último um novo hospedeiro *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823) para *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015 na família Thamnophilidae no PNI.

**Palavras chave:** oocistos, coccídio, *Isospora*, *Eimeria*, Passeriformes.

## ABSTRACT

SILVA-CARVALHO, Lidiane Maria. **Coccidia of Different Passerine Species in Southeast Brazil: Taxonomy and Ecology**. 2020. 206p. Thesis (Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The families of the order Passeriformes can be parasitized by several coccidian species, mainly of the genera *Isospora* Schneider, 1881 and *Eimeria* Schneider, 1875. In this context, the current work aimed to identify, characterize and quantify species of coccidian parasites of the families Thamnophilidae, Tyrannidae, Conopophagidae and Icteridae in Itatiaia National Park (PNI) mainly. Nineteen expeditions were carried out at the PNI, and three other expeditions were carried out in two different locations: Cacaria and Barra Mansa. Birds were captured with mist nets. From all 204 bird specimens were captured: 100 taminophilidae, 89 tyrannids, 7 conopophagids and 8 icterids, after processing the samples, observed to be coccidians of the genera *Isospora* or *Eimeria* from four families addressed in this study. Thus, the current work presents a review of the scientific literature on the themes of ecology and taxonomy of coccidia of Thamnophilidae, Tyrannidae, Conopophagidae and Icteridae, and, as a result, five scientific articles in chronological order describing a new host *Cacicus haemorrhous* (Linnaeus, 1766) and locality (PNI) for *Isospora bellicosa* Upton, Stamper and Whitaker, 1995, and a new species *Isospora guaxi* Silva & Berto, 2017 parasitizing *C. haemorrhous* in the family Icteridae; a new species *Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018, from *Platyrrinchus mystaceus* Vieillot, 1818 at PNI in the Tyrannidae family; a new host *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818) and locality (PNI) for *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992 in the Thamnophilidae family; a new species *Isospora borbai* Silva-Carvalho et Berto, 2019 parasitizing two distinct hosts, *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818), and *Conopophaga lineata* (Wied, 1831) in the Conopophagidae family; and finally a new host *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823) for *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015 in the Thamnophilidae family in PNI.

**Keywords:** oocysts, coccidia, *Isospora*, *Eimeria*, Passeriformes.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Prevalência de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* em aves silvestres capturadas no PNI.....56
- Tabela 2.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de *Thamnophilidae* em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.....59
- Tabela 3.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de *Tyrannidae* em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.....64
- Tabela 4.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de *Conopophagidae* em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.....70
- Tabela 5.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de *Icteridae* em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.....71
- Tabela 6.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isospora* recuperado a partir de pássaros da família *Icteridae*.....79
- Tabela 7.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isospora* recuperado a partir de pássaros tiranídeos do Novo Mundo (*Tyrannidae*).....86
- Tabela 8.** Morfometria de oocistos de *Isospora sagittulae* recuperados de taminofilídeos (*Thamnophilidae*).....95
- Tabela 9.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isospora* recuperado a partir da parvorder *Thamnophilida*.....107

**Tabela 10.** Comparação morfológica de espécies do gênero *Isohora* descritas de Thamnophilidae no Novo Mundo.....115

**Tabela 11.** Morfometria de oocistos de *Isohora parnaitatiaiensis* recuperados de Thamnophilidae do sudeste do Brasil.....116

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização do Parque Nacional do Itatiaia. De acordo com Tomzhinski et al. (2012).....05
- Figura 2.** Principais características morfológicas observadas no oocisto. Capuz polar (mc); micrópola na camada interna (mil) e externa (mol); parede exterior áspera (row) ou lisa (sow); largura do oocisto (ow); comprimento do oocisto (ol); grânulo polar (pg); resíduo do oocisto (or); largura do esporocisto (sw); comprimento do esporocisto (sl); corpo de Stieda (sb); corpo sub Stieda (ssb); corpo de parasita (psb); resíduo do esporocisto compacto (csr) ou difuso (dsr); esporozoíto (sp); corpo refrátil anterior (arb) e posterior (prb) do esporozoíto; núcleo do esporozoíto (n); e estrias do esporozoíto (str). De acordo com Berto et al. (2014b).....38
- Figura 3.** Desenhos em linha compostos de oocistos esporulados de *Isoospora guaxi* (A) e *Isoospora bellicosa* (B) de *Cacicus haemorrhous*. Barra de escala: 10 µm.....76
- Figura 4.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isoospora guaxi* (A – C) e *Isoospora bellicosa* (D – F) de *Cacicus haemorrhous*. Barra de escala: 10 µm.....76
- Figura 5.** Distribuição geográfica de várias espécies dos gêneros *Cacicus* e *Sturnella* na América do Sul [adaptado DE LAS CASAS et al. (2004); BIRDLIFE INTERNATIONAL (2015); IUCN (2015)]. Os hospedeiros de *Isoospora bellicosa* são *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosa*) e *Cacicus haemorrhous*; *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosa*) é alopátrica de *Cacicus haemorrhous*, além de ser separada pelos Andes (A); *Cacicus cela* (B), *Cacicus uropygialis* (C) e *Leistes militaris* (syn. *Sturnella militaris*) (D) são exemplos de aves icterídeos trans e cis-andinos que são simpátricos à *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosa*) e (ou) *Cacicus haemorrhous*. O asterisco indica a localização aproximada do ponto de coleta do estudo atual.....78
- Figura 6.** Desenho de linha composto do oocisto esporulado de *Isoospora lopesi* de *Platyrrinchus mystaceus*. Barra de escala: 1µm.....84

**Figura 7.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isoospora lopesi* de *Platyrrinchus mystaceus*. Abreviaturas: pg, grânulo polar; sb, corpo de Stieda; ssb, corpo sub-Stieda; sr, resíduo de esporocisto; rb, corpo refrátil; n, núcleo. Tudo para a mesma escala. Barra de escala: 10 µm.....85

**Figura 8.** Árvore de ML estimada a partir das seqüências COI. Os números nos representam o suporte de bootstrap (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para NJ, ML e MP, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....88

**Figura 9.** Árvore de ML estimada a partir do conjunto de dados de sequenciamento COI de 215 pb para *Isoospora* spp. Números nos representam suporte a Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados] para NJ, ML e MP, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....89

**Figura 10.** Fotomicrografias de *Isoospora sagittulae* recuperado de mãe-de-taoca-de-cauda-barrada *Oneillornis salvini* (a), rendadinho *Willisornis poecilinotus* (b) e papa-taoca-do-sul *Pyriglena leucoptera* (c, d). Barra de escala: 10 µm.....93

**Figura 11.** Regressões lineares comparativas de oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isoospora sagittulae* recuperada de *Oneillornis salvini* e *Willisornis poecilinotus* na Amazônia (preto) e *Pyriglema leucoptera* na Mata Atlântica (cinza).....98

**Figura 12.** Árvore de ML estimada a partir das seqüências do gene COI de *Isoospora* spp. Números em nós representam suporte a Bootstrap para 1000 réplicas (> 50%) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por site.....99

**Figura 13.** Distribuição geográfica dos hospedeiros taminofilídeos de *Isoospora sagittulae* na região Neotropical (com base nos dados da BirdLife International 2016). Apenas *Oneillornis salvini* e *Willisornis poecilinotus* são simpátricos uns com os outros na Amazônia. *Hylophylax naevioides* é separado pelos Andes. O novo hospedeiro *Pyriglema leucoptera* tem distribuição

geográfica na Floresta Atlântica no sudeste do Brasil, e está separado das populações dos hospedeiros amazônicos pelo bioma do Cerrado.....101

**Figura 14.** Desenho de linha composto do oocisto esporulado de *Isospora borbai* de *Conopophaga* spp. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .....105

**Figura 15.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora borbai* de *Conopophaga* spp. Abreviaturas: camadas interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto; micrópula (m); grânulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); esporozoítio (sz); corpo refrátil (rb). Tudo para a mesma escala. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .....106

**Figura 16.** Árvore de ML estimada a partir das sequências COI. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....109

**Figura 17.** Árvore de ML estimada a partir do conjunto de dados de sequenciamento COI de 215 pares de base para espécies do gênero *Isospora*. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....110

**Figura 18.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora parnaitatiaiensis* recuperados de *Pyriglena leucoptera* (A-D) e *Dysithamnus mentalis* (E-H). Escala = 10  $\mu\text{m}$ .....113

**Figura 19.** Regressão linear comparativa das dimensões dos oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isospora parnaitatiaiensis* recuperados de dois hospedeiros distintos: *Pyriglena leucoptera* (preto) e *Dysithamnus mentalis* (cinza).....117

**Figura 20.** Árvore de ML estimada a partir das sequências COI. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML,

respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....118



## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Autorização para atividades com finalidades científica SISBIO.....	143
<b>Anexo B.</b> Autorização para atividades com finalidades científica SISBIO.....	147
<b>Anexo C.</b> Autorização para atividades com finalidades científica SISBIO.....	151
<b>Anexo D.</b> Declaração de aprovação da CEUA.....	154
<b>Anexo E.</b> Certificado de aprovação da CEUA.....	155
<b>Anexo F.</b> Certificado de aprovação da CEUA.....	156
<b>Anexo G.</b> Some remarks on the distribution and dispersion of Coccidia from icterid birds in South America: <i>Isospora guaxi</i> n. sp. and <i>Isospora bellicosa</i> Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique <i>Cacicus haemorrhous</i> (L.) (Passeriformes: Icteridae) in southeastern Brazil.....	158
<b>Anexo H.</b> <i>Isospora lopesi</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill <i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America.....	165
<b>Anexo I.</b> <i>Isospora sagittulae</i> McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region.....	174
<b>ANEXO J.</b> <i>Isospora borbai</i> n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnateaters <i>Conopophaga</i> spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America.....	181
<b>ANEXO L.</b> Polymorphism and genetic diversity of <i>Isospora parnaitatiaiensis</i> Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil.....	189

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>04</b>
<b>2.1. O PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA (PNI)</b> .....	<b>04</b>
<b>2.1.1. Localização</b> .....	<b>04</b>
<b>2.1.2. Paisagens, biomas e estratificações</b> .....	<b>05</b>
<b>2.1.3. Biodiversidade</b> .....	<b>07</b>
<b>2.2. AS AVES</b> .....	<b>09</b>
<b>2.2.1. Classificação</b> .....	<b>09</b>
<b>2.2.2. Sistemática</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.3. Anatomia e Fisiologia</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.4. Ecologia</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.5. Distribuição geográfica</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.6. Principais espécies de taminofilídeos, conopofagídeos, tiranídeos e icterídeos capturadas no PNI</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.6.1. <i>Thanmophilidae</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.6.1.1. <i>Drymophila ferruginea</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.6.1.2. <i>Dysithamnus mentalis</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.6.1.3. <i>Mackenziaena leachii</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.6.1.4. <i>Mackenziaena severa</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.6.1.5. <i>Myrmoderus loricatus</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.6.1.6. <i>Pyriglena leucoptera</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.6.1.7. <i>Rhopias gularis</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.6.2. <i>Conopophagidae</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.6.2.1. <i>Conopophaga lineata</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.6.2.2. <i>Conopophaga melanops</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.6.3. <i>Tyrannidae</i></b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.6.3.1. <i>Attila rufus</i></b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.6.3.2. <i>Capsiempis flaveola</i></b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.6.3.3. <i>Colonia colonus</i></b> .....	<b>26</b>

2.2.6.3.4. <i>Corythopsis delalandi</i> .....	26
2.2.6.3.5. <i>Elaenia parvirostris</i> .....	27
2.2.6.3.6. <i>Knipolegus cyanirostris</i> .....	27
2.2.6.3.7. <i>Knipolegus nigerrimus</i> .....	28
2.2.6.3.8. <i>Lathrotriccus euleri</i> .....	28
2.2.6.3.9. <i>Leptopogon amaurocephalus</i> .....	28
2.2.6.3.10. <i>Mionectes rufiventris</i> .....	29
2.2.6.3.11. <i>Myiarchus ferox</i> .....	29
2.2.6.3.12. <i>Myiarchus swainsoni</i> .....	30
2.2.6.3.13. <i>Phyllomyias griseocapilla</i> .....	30
2.2.6.3.14. <i>Phylloscartes difficilis</i> .....	30
2.2.6.3.15. <i>Pitangus sulphuratus</i> .....	31
2.2.6.3.16. <i>Platyrinchus mystaceus</i> .....	31
2.2.6.3.17. <i>Ramphotrigon megacephalum</i> .....	32
2.2.6.3.18. <i>Serpophaga nigricans</i> .....	32
2.2.6.3.19. <i>Tolmomyias poliocephalus</i> .....	33
2.2.6.3.20. <i>Tolmomyias sulphurescens</i> .....	33
2.2.6.4. <i>Icteridae</i> .....	34
2.2.6.4.1. <i>Cacicus haemorrhous</i> .....	34
2.3. OS COCCÍDIOS.....	34
2.3.1. Classificação.....	34
2.3.2. Diversidade.....	35
2.3.3. Identificação.....	37
2.3.4. Ecologia.....	41
2.3.4.1. Transmissão e dispersão.....	41
2.3.4.2. Especificidade ao hospedeiro.....	44
2.3.4.3. Dinâmica de eliminação de oocistos.....	45
2.3.4.4. Fatores associados a densidade e morfologia dos oocistos.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	48
3.2. LOCAL DE ESTUDO.....	48

3.3. PONTOS DE CAPTURA DE AVES E COLETA DE AMOSTRAS.....	49
3.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	50
3.5. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DEPOSITADAS NO LABICOC/UFRRJ.....	50
3.6. ESTUDO DOS OOCISTOS.....	51
3.6.1. Visualização e fotomicrografia dos oocistos.....	51
3.6.2. Quantificação dos oocistos.....	51
3.6.3. Identificação das espécies.....	51
3.6.4. Identificação de novos hospedeiros.....	52
3.6.5. Desenho dos oocistos.....	52
3.7. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	52
3.7.1. Análise de variância (ANOVA) .....	52
3.7.2. Regressão linear.....	53
3.8. AVALIAÇÃO MOLECULAR.....	53
3.8.1 Análises moleculares.....	53
3.8.2. Análises das sequências.....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
4.1. AVES CAPTURADAS E AMOSTRAS EXAMINADAS.....	55
4.2. DISTRIBUIÇÃO DOS COCCÍDIOS NAS FAMÍLIAS DE AVES.....	55
4.2.1. Família <i>Thamnophilidae</i> .....	57
4.2.2. Família <i>Tyrannidae</i> .....	63
4.2.3. Família <i>Conopophagidae</i> .....	70
4.2.4. Família <i>Icteridae</i> .....	71
4.3. DENSIDADES DE COCCÍDIOS E PERIODICIDADE DE ELIMINAÇÃO DOS OOCISTOS.....	72
4.4. ALGUMAS OBSERVAÇÕES SOBRE A DISTRIBUIÇÃO E DISPERSÃO DE COCCÍDIOS DE PÁSSAROS ICTERÍDEOS NA AMÉRICA DO SUL: <i>Isospora guaxi</i> E <i>Isospora bellicosa</i> (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO GUAXE <i>Cacicus haemorrhous</i>	

(PASSERIFORMES: ICTERIDAE) NO SUDESTE DO BRASIL.....	73
<b>4.4.1 Morfologia de <i>Isohora guaxi</i> e <i>Isohora bellicosa</i> no sudeste brasileiro.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4.2. Caraterização morfológica e morfométrica dos oocistos dos Guaxes.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5. <i>Isohora lopesi</i> (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) A PARTIR DO PATINHO <i>Platyrinchus mystaceus</i> (PASSERIFORMES: TYRANNI: TYRANNIDAE) NA AMÉRICA DO SUL.....</b>	<b>81</b>
<b>4.5.1. Morfologia de <i>Isohora lopesi</i>.....</b>	<b>82</b>
<b>4.5.2. Caraterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de <i>Isohora lopesi</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>4.6. <i>Isohora sagittulae</i> (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DE PAPA-FORMIGAS (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE) NA AMAZÔNIA E NA MATA ATLÂNTICA DO BRASIL: COM OBSERVAÇÕES SOBRE SUA DISTRIBUIÇÃO E DISPERSÃO NA REGIÃO NEOTROPICAL.....</b>	<b>91</b>
<b>4.6.1. Morfologia de <i>Isohora sagittulae</i> no sudeste brasileiro.....</b>	<b>92</b>
<b>4.6.2. Material depositado.....</b>	<b>93</b>
<b>4.6.3. Morfometria Comparativa.....</b>	<b>94</b>
<b>4.6.4. Sequenciamento.....</b>	<b>94</b>
<b>4.6.5. Análise filogenética.....</b>	<b>94</b>
<b>4.6.6. Caracterização morfológica e morfométrica dos oocistos da Amazônia e Mata Atlântica.....</b>	<b>96</b>
<b>4.6.7. Identificação molecular e delimitação de espécies.....</b>	<b>96</b>
<b>4.6.8. Análise filogenética.....</b>	<b>97</b>
<b>4.6.9. Distribuição e dispersão de <i>Isohora sagittulae</i> na região Neotropical.....</b>	<b>99</b>
<b>4.7. <i>Isohora borhai</i> (CHROMISTA: APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO CHUPA-DENTES <i>Conopophaga</i> SPP. (PASSERIFORMES: TYRANNI: CONOPOPHAGIDAE) NA AMÉRICA DO SUL.....</b>	<b>102</b>
<b>4.7.1. Análise morfológica, morfométrica, molecular e filogenética de <i>Isohora borhai</i> no sudeste do Brasil.....</b>	<b>102</b>

<b>4.7.2. Caraterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de <i>Isospora borbai</i></b> .....	<b>110</b>
4.8. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Isospora parnaitatiaiensis</i> (CHROMISTA: MIOZOA: EIMERIIDAE) DO PAPA-TAOCA-DO-SUL <i>Pyriglena leucoptera</i> E DA CHOQUINHA-LISA <i>Dysithamnus mentalis</i> (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE) NA AMÉRICA DO SUL.....	<b>111</b>
<b>4.8.1. Prevalência e identificação de <i>Isospora parnaitatiaiensis</i></b> .....	<b>112</b>
<b>4.8.2. Resumo Taxonômico</b> .....	<b>112</b>
<b>4.8.3. Observações</b> .....	<b>114</b>
<b>4.8.4. Análise filogenética</b> .....	<b>117</b>
<b>4.8.5. Caraterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de <i>Isospora parnaitatiaiensis</i></b> .....	<b>118</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>122</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>123</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>142</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade trata a diversidade de vida em todos os ecossistemas existentes, seja do mais profundo oceano até o topo das mais altas montanhas. Engloba as plantas, os animais, os microrganismos e os processos ecológicos em uma unidade funcional. Entre os países com maior biodiversidade, o Brasil ocupa posição de destaque por abrigar alguns dos biomas com a maior riqueza de espécies da fauna mundial e, também, com a mais alta taxa de endemismo em seis biomas diferentes. A variedade de biomas como Cerrado, Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal, Pampa reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileira: o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Esta abundante variedade de vida – que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra – eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (ou de maior biodiversidade). Dentre os principais biomas brasileiros estão a Mata Atlântica e o Cerrado, sendo relacionados na lista dos 25 *hotspots* da Terra. Em particular, a Mata Atlântica está entre as cinco primeiras colocadas na lista dos *hotspots* mundiais, pois, sua área remanescente é inferior a 8% da sua extensão original (SIMON et al., 2008; BERTO; LUZ, 2016; MMA, 2019).

As Unidades de Conservação (UC) são áreas prioritárias para preservação da Mata Atlântica, dentre elas destacam-se o Parque Nacional do Itatiaia (PNI) que é uma área de proteção integral e que faz parte da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, segundo a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), além de estar classificado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) como área de prioridade extremamente alta para a conservação da biodiversidade. O PNI, está localizado na Serra da Mantiqueira na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. O relevo é caracterizado por montanhas e elevações rochosas, variando em altitude, o ponto culminante é o Pico das Agulhas Negras, com 2.791 m de altitude (ICMBIO, 2019).

O PNI representa uma “ilha de conservação” da biodiversidade com um elevado grau de vulnerabilidade, abrangendo inúmeras espécies de insetos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, muitos endêmicos ou ameaçados. As aves têm grande importância para o PNI, tanto sob o ponto de vista ecológico, quanto pelo seu potencial turístico. O PNI é considerado um dos melhores locais do mundo para a prática do “birdwatching” ou observação de aves. Segundo Honkala e Niiranen (2010), pelo menos 384 espécies são relatadas para o PNI, sendo 51 consideradas endêmicas e 42 vivendo em altitudes elevadas. Além da diversidade de aspectos físicos e comportamentais, as aves podem desempenhar papéis de grande

importância no meio ambiente, tais como, polinização das plantas, dispersão de sementes, coleta e reciclagem de matéria orgânica, formação do solo, controle biológico de pragas, roedores, serpentes, moluscos e outros. Além de serem consideradas reguladoras tanto da fauna como da flora, também são consideradas com bioindicadoras de condições ambientais. As espécies que se alimentam de néctar auxiliam na polinização de diversas plantas. As espécies frugívoras são consideradas grandes dispersoras, pois a retirada dos frutos representa a primeira etapa na dispersão de sementes, possibilitando uma nova germinação longe do local de origem. Os insetívoros exercem um importante papel no controle biológico de pragas, alimentando-se de insetos e outros animais de pequeno porte que podem prejudicar a agricultura e pastagens (SICK, 1997).

A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as grandes ameaças à biodiversidade da Mata Atlântica, além dos impactos diretos à fauna, flora e microbiota, favorecendo indiretamente a transmissão e susceptibilidade dos animais silvestres aos parasitos. As aves são hospedeiras de uma imensa variedade de parasitos; os mesmos têm um sofisticado modo adaptativo de vida e podem causar doenças sérias com impacto na reprodução e sobrevivência, podendo afetar vários aspectos de vida do hospedeiro (NORRIS; EVANS, 2000; MARTÍNEZ-PADILLA; MILLÁN, 2007; DOLNIK et al., 2010). Os parasitos podem interferir na morfologia, comportamento e saúde das aves, mesmo em infecções sub-letais, desempenhando importante pressão ecológica e evolucionária; desse modo, a identificação e quantificação dos parasitos são essenciais para o entendimento das implicações ecológicas e evolucionárias nos hospedeiros e, portanto, no ecossistema (MASELLO et al., 2006). No entanto, as aves têm comportamentos antiparasitários, fisiológicos ou defesas imunológicas. Alguns fatores que influenciam na intensidade de infecção na natureza incluem: a genética, defesa imunológica, estação do ano, migração, idade, tamanho, sexo, estado hormonal, etc. (MASELLO et al., 2006). Dentre os diversos grupos de parasitos em Aves, podem-se destacar os coccídios, os quais são protozoários parasitos intra-celulares obrigatórios, em sua maioria intestinais, que podem ser identificados em amostras fecais. As aves podem ser parasitadas por diversos coccídios, principalmente dos gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875. Desde os primórdios da parasitologia as espécies de coccídios de *Isospora* e *Eimeria* têm sido descritas com base no oocisto, pois o mesmo possui características morfológicas significativas para identificação. Estas descrições propiciaram que inúmeras espécies sejam reconhecidas como parasitos de



Passeriformes e, frequentemente, novos coccídios são descritos (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al. 2011a).

Neste contexto, este estudo teve por objetivo principal identificar, caracterizar e quantificar espécies de coccídios parasitos de pássaros das famílias Thamnophilidae, Conopophagidae, Tyrannidae e Icteridae no PNI. Os objetivos específicos foram: (1) Analisar a morfologia e morfometria dos oocistos recuperados das diferentes espécies de pássaros; (2) Identificar e classificar as espécies coccidianas, descrevendo novas espécies e/ou novos hospedeiros; (3) Quantificar os oocistos por OoPD (oocistos por defecação) conferindo as densidades; (4) Avaliar a distribuição das espécies coccidianas nas famílias de Passeriformes de forma qualitativa e quantitativa, estabelecendo as maiores prevalências e densidades por espécie e família.

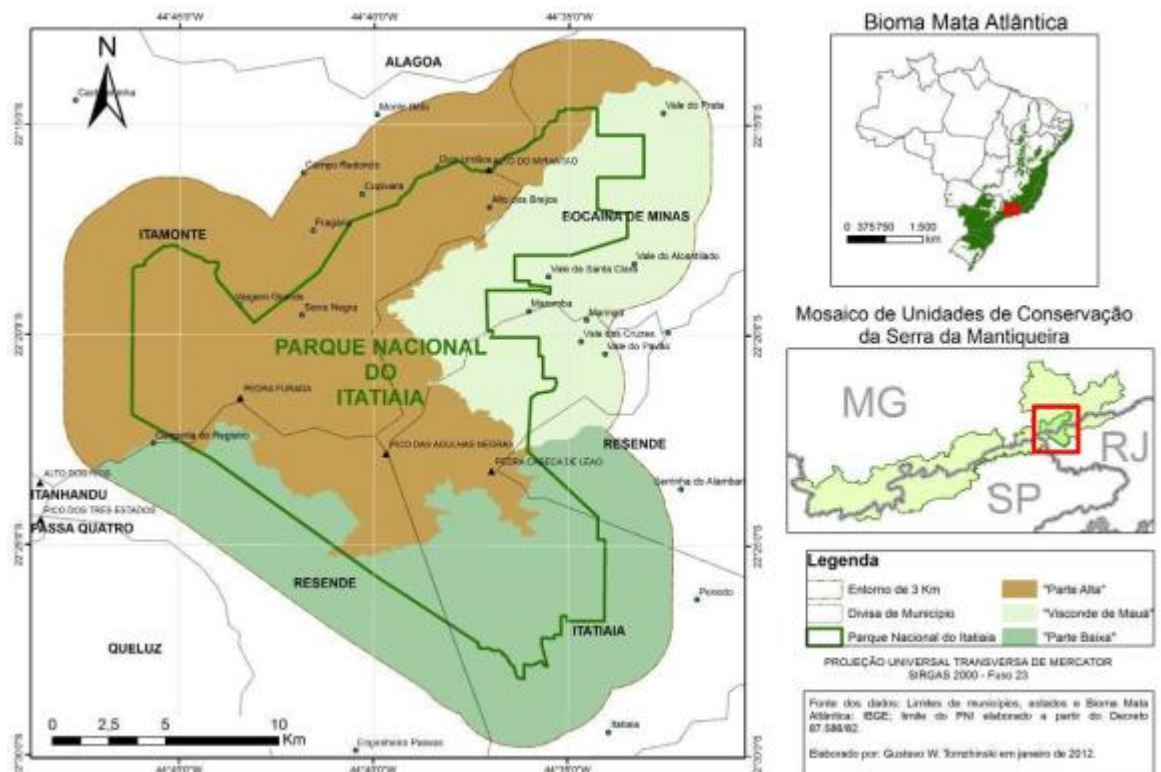
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA (PNI)

#### 2.1.1. Localização

O PNI localiza-se na Serra da Mantiqueira, entre os Estados Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ), próximo da fronteira com o Estado de São Paulo. Seus limites alcançam parte dos municípios de Itatiaia e Resende, no Rio de Janeiro, e de Itamonte e Bocaina de Minas, em Minas Gerais (Figura 1). A sede do PNI localiza-se no município de Itatiaia no Rio de Janeiro. Atualmente a entrada ao PNI é feita por dois acessos principais, o primeiro pela Parte Baixa, caracterizada pela região de Itatiaia, e o segundo pela Parte Alta na região da Garganta do Registro entre os Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. A Rodovia Presidente Dutra (BR-116) é principal via de acesso para visitantes vindos do Rio de Janeiro e São Paulo. O acesso ao PNI, saindo da capital do Estado do Rio de Janeiro é feito pela BR-116 até a saída para a BR-485 (Estrada do Parque Nacional) em Itatiaia. Na BR-485 o visitante percorre cerca de 8,5 km até a sede da Unidade de Conservação. Num total de 2 horas e meia é percorrida a distância total da capital do Rio de Janeiro até Itatiaia de 181 km. Outra opção é partir da capital do Estado de São Paulo seguindo pela BR-116 até o acesso à cidade de Itatiaia. Em Itatiaia o visitante deve ingressar à BR-485 onde percorrerá cerca de 8,5 km até a sede da Unidade de Conservação, num total de 273 km percorrido em cerca de 3 horas (BARRETO et al., 2013).

O PNI é uma unidade de conservação criada a partir do Decreto nº 1.713 assinado pelo presidente Getúlio Vargas em 14 de junho de 1937. Foi o primeiro Parque Nacional do Brasil, de suma importância para a conservação reconhecido pela UNESCO e considerado prioritário pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2004; ICMBIO, 2018a). Está localizado na Serra da Mantiqueira na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, onde ficam aproximadamente 60% de seu território, o PNI está próximo à Rodovia Presidente Dutra, a qual liga as cidades de Rio de Janeiro e São Paulo, uma área protegida com um alto grau de vulnerabilidade, considerado uma "ilha de conservação" da biodiversidade. (ICMBIO, 2019).



**Figura 1.** Localização do Parque Nacional do Itatiaia. De acordo com Tomzhinski et al. (2012).

### 2.1.2. Paisagens, biomas e estratificações

O PNI está inserido numa importante classificação ambiental, o *Hotspot* da Floresta Atlântica, um conceito aplicado a regiões do planeta que possuem simultaneamente altos níveis de biodiversidade e elevado grau de ameaça. Entre os *Hotspot* existentes, a Mata Atlântica configura-se como um dos mais importantes em decorrência da altíssima biodiversidade observada em seus limites e por ser um dos biomas mais ameaçados no Brasil. A inserção do PNI nesse *Hotspot* proporciona uma excelente possibilidade de inclusão de suas demandas dentro dessas ações e projetos, contribuindo de forma importante para a conservação dos recursos naturais. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), o PNI está inserido no Bioma da Mata Atlântica e é considerado como sendo extremamente alta sua prioridade para conservação da biodiversidade, com base no estudo de áreas prioritárias realizado pelo MMA no ano de 2007 (BARRETO et al., 2013).

A pressão atmosférica (ventos e massas de ar), a umidade (chuvas) e as temperaturas são os elementos que combinados determinam os climas do Brasil. A orografia e a posição

latitudinal são fatores determinantes do clima no PNI. Segundo a classificação internacional de Köppen o domínio climático do PNI é o mesotérmico com verão brando e estação chuvosa no verão (*Cwb*) e mesotérmico com verão brando sem estação seca (*Cpb*). De acordo com a classificação do IBGE (2011) no PNI predominam três domínios climáticos: mesotérmico brando úmido, mesotérmico mediano e a maior parte da unidade de conservação está sob o domínio do subquente úmido. O clima predominante no PNI é o subquente úmido com médias variando entre 15 °C e 18 °C e podendo ocorrer de um a três meses secos por ano. Esse tipo ocorre acima das altitudes de 1.600 m, tendo como exemplo os abrigos Lamengo, Macieira, a Pedra do Sino e as Prateleiras. Conforme Köppen a condição *Cwb* ocorre nas partes elevadas da montanha, geralmente acima de 1.600 m de altitude e o *Cpb* nas partes baixa das encostas (BARRETO et al., 2013).

O Parque localiza-se sobre rochas do Maciço Alcalino do Itatiaia, e, um contexto geológico raro, com o maciço alcalino alçado a grandes altitudes, contrastando com os gnaisses por ser mais resistente ao intemperismo. Forma um relevo exuberante com grande destaque para suas rochas, que são o principal condicionante para a formação do relevo e do cenário exótico da área (BARRETO et al., 2013). O PNI é caracterizado por montanhas e terreno rochoso com elevação variando de 600 a 2.791 m no pico das Agulhas Negras, o ponto culminante do Estado do Rio de Janeiro e o sétimo mais alto do Brasil. No Planalto do Itatiaia, numa região conhecida como Parte Alta, localiza-se os campos de altitude e as nascentes de diversos rios, assim o PNI engloba 12 nascentes de bacias hidrográficas regionais importantíssimas, que alimentam as bacias do rio Grande, afluente do rio Paraná e a do rio Paraíba do Sul, muito importante para o Estado do Rio de Janeiro. A parte baixa é definida pela vegetação deslumbrante e abundantes cursos d'água; no entanto, há regiões com vegetação secundária e transição de floresta, área de borda de floresta com transição de vegetação densa e pastagens ocasionadas pela ação antrópica em sua maioria. O Parque é uma unidade de conservação que visa à preservação de ecossistemas naturais, o desenvolvimento de pesquisas científicas, atividades de educação ambiental, de recreação e de turismo ecológico (BRANDÃO, 2017; ICMBIO, 2019). Possui vários atrativos naturais que fazem com que a região tenha uma grande demanda de visitantes. A Cachoeira do Escorrega (localizada no limite do PNI, próximo ao Maromba), picos como o Pico das Agulhas Negras (localizado no Planalto do Itatiaia), serras como a Serra do Papagaio (localizada na parte noroeste do PNI), são os principais atrativos da região (BARRETO et al., 2013).

### 2.1.3. Biodiversidade

Houve uma época em que a área atual do PNI, teve grande interferência humana em sua flora pré-colonial, principalmente durante a época em que existiu uma colônia agrícola, no período de 1908 a 1918. As florestas foram desmatadas e queimadas para implantação de culturas agrícolas e extração de madeira para a construção de dormentes de estradas de ferro (IBAMA, 1994). O PNI tem sua vegetação predominante pertencente ao bioma Mata Atlântica, caracterizada pela existência elevada da diversidade de espécies vegetais. O acentuado gradiente altitudinal e a variação climática proporcionam a ocorrência de diversos ecossistemas do bioma Mata Atlântica no PNI, é marcante a variação da vegetação na medida em que se sobe de 540 m no limite sul do Parque em direção aos 2.000 m do Planalto, ainda segundo Barros (1955), é sensível à diferença de composição florística entre os lados norte e sul dessa parte da Mantiqueira, em função das diferenças climáticas relacionadas à orientação das vertentes, continentalidade e altitude. A flora do bioma da Mata Atlântica observada no PNI pertence às tipologias diferentes, dentre elas: Floresta Ombrófila Densa até a altitude de 1.500 m, Floresta Ombrófila Mista Montana (vegetação com seu estrato superior dominado pela Araucária), Floresta Estacional Semi Decidual Montana, entre 400 e 1500 m de altitude, Sistema de Transição ou Tensão Ecológica e Refúgio Vegetacional (Campos de Altitude) acima de 2.000 m de altitude (BARRETO et al., 2013).

A entomofauna constitui o grupo mais representativo do PNI; sendo registrados mais de 50.000 espécies de artrópodes de ocorrência no Parque, com no mínimo, 90 são exclusivas da “Parte Alta”. Desta forma, dezenas de milhares de espécies distribuídas entre Lepidópteros, Coleópteros, Ortópteros, Dípteros, Homópteros, Hymenópteros entre outros, formam o grupo mais estudado no PNI. (IBAMA, 1994). Embora a riqueza hídrica do PNI seja esplendida, suas águas não têm abundância de plâncton e microrganismos e por isso são relatadas apenas 5 espécies de peixes (BARTH, 1957).

Os anfíbios, por outro lado, constituem uma fauna abundante e variada, com mais de 60 espécies de anuros, sendo que pelo menos 24 ocorrem no Planalto. A espécie mais conhecida é certamente o sapo flamenguinho *Melanophryniscus moreirae* (Miranda-Ribeiro, 1920), símbolo do Parque (AXIMOFF, 2011). A herpetofauna do PNI é representada por 87 espécies identificadas no levantamento, no plano de manejo e na literatura, sendo 62 espécies de anfíbios de 13 famílias distintas, 16 espécies de serpentes de três famílias, oito espécies de lagartos de cinco famílias, e uma espécie de jacaré (BARRETO et al., 2013).

As aves têm grande importância para a unidade, tanto sob o ponto de vista ecológico, quanto pelo seu potencial turístico. Atualmente pelo menos 357 espécies são relatadas para o PNI, sendo 51 consideradas endêmicas (HONKALA & NIIRANEN, 2010) e 42 vivendo em altitudes elevadas (IBAMA, 1994). Num estudo recente da avifauna do Parque, segundo um levantamento realizado por Barreto et al. (2013), foram registradas 319 espécies pertencentes à 21 Ordens, distribuídas em 54 Famílias. Nesse estudo a Ordem dos Passeriformes foi a mais representativa, seguida por Apodiformes (beija-flores e andorinhões com 18 spp.), Piciformes (pica-paus, tucanos e araçarís, 19 spp.), Psittaciformes (papagaios, periquitos e maritacas, 14 spp.) e Accipitriformes (14 spp. de gaviões). Dentre as famílias, destacam-se Tyrannidae (35 spp. entre guaracavas, piolhinhos, bem-te-vis, marias-pretas), Thraupidae (sanhaços, saís, saíras e tiês, 27 spp.), Trochilidae (beija-flores), Furnariidae (limpa-folhas, joões-de-barro) e Rhynchocyclidae (papa-moscas, bicos-chatos, entre outros) com 16 spp. cada, seguidos de Psittacidae (papagaios, periquitos e maritacas, 14 spp.) e Accipitridae (gaviões, 14 spp.). No entanto, os autores salientam que a lista de espécies de aves registrada representa parte da riqueza local, já que para registrar uma lista mais completa e bem próxima da listagem total que ocorre na região, é necessário abranger as amostragens em diferentes estações climáticas do ano, principalmente para cobrir períodos de deslocamentos migratórios de algumas aves.

Segundo Barth (1957) existem 50 espécies de mamíferos no PNI; já o Plano de Ação Emergencial do Parque refere-se a 67 (IBAMA, 1994) e estudos recentes para a renovação do Plano de Manejo apontam mais de uma centena. Estes números mostram a rica e ainda pouco conhecida fauna do Parque. Dentre os primatas, são relatados quatro espécies, enquanto de felinos, outras cinco, inclusive espécies raras e ameaçadas, como o macaco muriqui *Brachyteles arachnoides* (É. Geoffroy, 1806) e a suçuarana *Puma concolor* (Linnaeus, 1771). De acordo com o levantamento realizado por Barreto et al. (2013), foram registradas 111 espécies de mamíferos silvestres, mais o registro de quatro espécies domésticas, representadas por 10 ordens e 24 famílias. A ordem mais representativa foi a dos quirópteros, com 36 espécies, seguida por roedores com 23 espécies, marsupiais e carnívoros com 15 e 14 espécies, respectivamente. A grande devastação que houve na região ao longo dos séculos passados, especialmente em função das grandes plantações de café e laranja, associada à crescente urbanização das últimas décadas, criaram um cenário, no qual o PNI representa um dos últimos refúgios para a grande maioria das espécies que ocorriam originalmente na região. A fauna local é caracterizada por comunidades de alta riqueza, composta por diversas espécies ameaçadas e raras, especialmente para os grupos da vegetação, avifauna e

mastofauna. Ainda, por dispor de ecossistemas mais restritos, quase exclusivos do PNI considerando o contexto regional, como os refúgios vegetacionais, que condicionam a existência de diversos endemismos, é possível afirmar que a fauna local é muito dependente da proteção aferida ao PNI, o que pode ser atestado pela composição faunística existente dentro dos limites dessa unidade de conservação (BARRETO et al., 2013).

## 2.2. AS AVES

### 2.2.1. Classificação

Segundo os dados apresentados pelo estudo de Piacentini et al. (2015), as famílias da ordem Passeriformes de interesse neste trabalho podem ser classificadas da seguinte forma:

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Filo: Chordata Bateson, 1885

Classe: Aves Linnaeus, 1758

Ordem: Passeriformes Linnaeus, 1758

Subordem: Tyranni Wetmore, Miller, 1926

Infraordem Furnariides Sibley, Ahlquist & Monroe, 1988

Parvordem: Thamnophilida Patterson, 1987

Família: Thamnophilidae Swainson, 1824

Família: Conopophagidae Sclater, Salvin,  
1873

Infraordem Tyrannides Wetmore & Miller, 1926

Parvordem: Tyrannida Wetmore, Miller, 1926

Família: Tyrannidae Vigors, 1825

Subordem: Passeri Linnaeus, 1758

Parvordem: Passerida Linnaeus, 1758

Família: Icteridae Vigors, 1825

### 2.2.2. Sistemática

O mundo inteiro apresenta 9.895 espécies de aves (DEL HOYO *et al.*, 2010), dentre elas, a ordem dos Passeriformes é a mais representativa, com mais da metade da riqueza de espécies atuais (SIBLEY; MONROE, 1990). Segundo Piacentini *et al.* (2015) o Brasil possui atualmente 1919 espécies de aves, sendo um dos três países do mundo mais rico em aves. Os Passeriformes são divididos em dois grandes grupos: os Oscines, numericamente dominantes e distribuídos mundialmente, e os Suboscines, com poucas espécies no Velho Mundo e maior diversidade na América do Sul segundo Sick (1997).

O Neotrópico é a região zoogeográfica do mundo com mais representantes de aves, abrigando cerca de 3700 espécies (STOTZ *et al.*, 1996). Entre elas, os suboscines do Novo Mundo (com 1200 espécies) são responsáveis por mais de 10% da avifauna global e mais de 30% da diversidade de aves neotropicais (CHESSER, 2004; TOBIAS *et al.*, 2012). Os suboscines do Novo Mundo incluem dois subclados monofiléticos: os Tyrannídeos (502 espécies) e os Furnariídeos (651 espécies) (REMSEN *et al.*, 2017), ambos endêmicos da região Neotropical. Apesar de a avifauna neotropical ser a mais conhecida táxon de vertebrados em termos de conhecimento científico (por exemplo, taxonomia, ecologia), pouco se sabe sobre sua história evolutiva (BRUMFIELD, 2012; FJELDSÅ, 2012). Esse conhecimento pode ajudar a descrever e explicar padrões de diversidade sob uma perspectiva evolutiva. Isto pode ser conseguido aplicando uma estrutura filogenética para estudar tais padrões (BRUMFIELD, 2012).

Dentro dos suboscines do Novo Mundo, a infraordem Furnariídeos compreende 51% das espécies e 11% de todas as espécies de Passeriformes (CLARAMUNT, 2010; REMSEN *et al.*, 2017). Este clado apresenta os mais altos níveis de adaptações ecomorfológicas e diversidade ecológica, e é distribuído em quase todos os habitats terrestres dentro do Neotrópico (STOTZ *et al.*, 1996; DEL HOYO *et al.*, 2003; CLARAMUNT, 2010). Além disso, as espécies de Furnariídeos estão associadas à distribuição dos principais tipos de habitat (STOTZ *et al.*, 1996; PINTO-LEDEZMA *et al.*, 2016), onde a concentração de espécies de Furnariídeos é encontrada na Amazônia e na Mata Atlântica ecorregiões e alguns picos no nordeste do Cerrado e na região tropical dos Andes. Por outro lado, a concentração mais baixa pode ser encontrada principalmente em tipos de vegetação aberta como nos desertos andinos e patagônicos e nos lhanos da Venezuela e da Colômbia no norte América do Sul (PINTO-LEDEZMA *et al.*, 2016). Sugere-se que os Furnariídeos adaptem-se a uma grande variedade de



habitats visto que resultado o clado pode diversificar principalmente em habitats florestais, embora ainda possuam algumas espécies que colonizaram e diversificaram em habitats abertos (FJELDSÅ et al., 2005). No entanto, evidências recentes sugerem que as taxas de especiação e extinção são mais altas em habitats abertos, quando comparados as florestais (PINTO-LEDEZMA et al., 2016).

Os Tyrannides são frequentemente chamados de suboscines do Novo Mundo, e seus descendentes sofreram uma incrível radiação, com quase 1200 espécies vivas (MOYLE et al., 2009, OHLSON et al., 2013, TELLO et al., 2009). No entanto, apesar da magnitude de sua diversidade, os tiranídeos são ecologicamente restritos e são principalmente pássaros insetívoros que habitam florestas tropicais da América Central e do Sul (DEL HOYO et al., 1992). De fato, apenas seis gêneros existentes (quatro linhagens da família Tyrannidae) estenderam sua distribuição original para a América do Norte (DEL HOYO et al., 1992). Além disso, a única evidência paleontológica para o grupo, um espécime não identificado dos primeiros depósitos miocênicos da Patagônia Argentina (NORIEGA; CHIAPPE, 1993), não estende a faixa geográfica dos tiranídeos. A infraordem Tyrannides é dividida na parvordem Tyrannida segundo Piacentini et al. (2015), por sua vez a parvordem Tyrannidae compreende as superfamílias Cotingoidea Bonaparte, 1849 e Tyrannoidea Vigors, 1825. A maioria dos Tyrannides habita em áreas abertas, como savanas e bordas de florestas (WILLIS, 1976). Sabendo-se que a fauna entomológica sofreu um grave declínio durante épocas frias de temperatura (SINCLAIR et al., 2003, WILLIS, 1976). É provável que o período de glaciação no início do Oligoceno (ZACHOS et al., 2001) pode ter confinado o Furnariides (WILLIS, 1976) estritamente insetívoro, a ambientes mais quentes, como florestas tropicais, onde a abundância de insetos pode ter permanecido alta. Isso permitiria que os furnariídeos diversificassem, apesar do clima mais frio durante o início ao meio do Oligoceno. Posteriormente, a elevação andina na segunda metade do Oligoceno (HOORN et al., 2010) contribuiu para o aumento da temperatura nos Neotrópicos (ZACHOS et al., 2001) e intensificou o processo de desertificação (HOORN et al., 2010), resultando na expansão dos habitats de savana ocupados por Tyrannida (OHLSON et al., 2008, WILLIS, 1976). As temperaturas mais altas também teriam impulsionado a irrigação de plantas frutíferas e insetos para as áreas de cerrado, abrindo mais nichos para a alimentação mais generalista de Tyrannida. Esse cenário se ajusta bem ao nosso tempo estimado para a diversificação dos Tyrannides.

No princípio, no hemisfério norte alguns naturalistas compararam espécies de papa-formigas a outras espécies daquele hemisfério e encontraram semelhanças morfológicas entre elas. Um dos primeiros autores a sugerir novas divisões taxonômicas nesta família foi Swainson (1824), principalmente na família Laniidae Rafinesque, 1815. Os Laniidae eram representados por espécies de pássaros do mundo inteiro que tinham bicos largos e extremidade em forma de gancho. Swainson (1824) descreveu Lanianae Swainson, 1824 e Thamnophilinae Swainson, 1824 sendo as subfamílias de Laniidae, diferenciadas pela característica exclusiva da forma prolongada do bico forte e reto, e inserindo ainda, três gêneros válidos atualmente em Thamnophilinae: *Formicivora* Swainson, 1824, *Thamnophilus* Vieillot, 1816, e *Drymophila* Swainson, 1824.

A família Thamnophilidae em classificações tradicionais se mantem entre Passeriformes Suboscines Furnariida, formando um clado junto com Dendrocolaptidae, Formicariidae, Furnariidae, Conopophagidae e Rhinocryptidae (RIDGELY; TUDOR, 1994). Com o advento das técnicas de sequenciamento genético, ocorreu uma grande reclassificação taxonômica dentro da família. Segundo as resoluções mais recentes do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (PIACENTINI et al., 2015), a família se encontra dividida nas subfamílias Euchrepomidinae; Myrmornithinae e Thamnophilinae, e está inserida entre os Passeriformes Suboscines Tyranni Thamnophilida juntamente com as famílias Melanopareiidae Ericson, Olson, Irested, Alvarenga e Fjeldså, 2010 e Conopophagidae Sclater e Salvin, 1873, grupo irmão e basal em relação aos Furnariida, clado que abrange Grallariidae Sclater e Salvin, 1873; Rhinocryptidae Wetmore, 1926 (1837); Formicariidae; Scleruridae Swainson, 1827; Dendrocolaptidae Gray, 1840; Xenopidae Bonaparte, 1854 e Furnariidae Gray, 1840. Os principais gêneros da família são: *Thamnophilus*, *Dysithamnus* Cabanis, 1847, *Thamnomanes* Cabanis, 1847, *Myrmotherula* Sclater, 1858, *Herpsilochmus* Cabanis, 1847, *Formicivora*, *Drymophila*, *Terenura* Cabanis e Heine, 1859, *Cercomacra* Sclater, 1858, e *Pyriglena* Cabanis, 1847, *Rhegmatorhina* Ridgway, 1888, *Myrmoborus* Cabanis e Heine, 1859 e *Myrmeciza* Gray, 1841 (SIGRIST, 2014).

A família Conopophagidae (chupa-dentes e cuspidores), é composta pelo gênero *Conopophaga* Vieillot, 1816, com sete espécies no Brasil, é tradicionalmente considerada um grupo próximo aos macuquinhos e entufados (Rhinocryptidae), das tovocas e formigueiros (Formicariidae) (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Recentemente estudos com seu DNA indicaram uma maior afinidade com os Furnariidae (SIBLEY; MONROE, 1990). Este

acontecimento é suportado por dados morfológicos e moleculares recentes, no entanto, o *status* como uma família separada das demais é bem controverso (WHITNEY, 2003).

A família Tyrannidae é amplamente distribuída ao longo do continente americano, tendo se originado nas florestas pluviais da América do Sul (OHLSON et al. 2008); sendo uma das maiores famílias de aves do hemisfério ocidental e também do Brasil (REMSSEN et al. 2017). Posteriormente se diversificou-se para ambientes abertos, habitando os mais variados nichos ecológicos, como campos abertos, áreas alagadas e grandes centros urbanos até savanas e florestas densas. No entanto, a maioria habita florestas, onde exploram todos os estratos, desde o chão, forrageando na serrapilheira à procura de pequenos artrópodes, até acima do dossel, onde algumas espécies podem ser encontradas capturando insetos em voo, como *Colonia colonus* (Vieillot, 1818) (SICK 1997). Se o tipo de habitat for uma característica conservada nesse grupo, o porte da vegetação florestal seria uma variável importante influenciando a distribuição das espécies. Isso faz com que apresentem enorme heterogeneidade morfológica, ecológica e comportamental (SICK 1997; FITZPATRICK 2004; RIDGELY; TUDOR 2004). Os principais gêneros da família são: *Phyllomyias* Cabanis e Heine, 1859, *Myiopagis* Salvin e Godman, 1888, *Elaenia* Sundevall, 1836, *Xolmis* Boie, 1826, *Pseudocolopteryx* Lillo, 1905, *Contopus* Cabanis, 1855, *Knipolegus* Boie, 1826, *Tyrannus* Lacépède, 1799 e *Myarchus* Cabanis, 1844 (SIGRIST, 2014).

A classificação de nível superior dos icterídeos do Novo Mundo manteve-se relativamente estável quase meio século, com a maioria das classificações usadas atualmente (SIBLEY; MONROE 1990; JARAMILLO; BURKE 1999; FRAGA 2011; REMSEN et al. 2017) seguindo a delimitação de Blake (1968) e sequência de gêneros na Lista de verificação da série aves do Novo Mundo. Em particular, a família Icteridae tem origem nas Américas e é restrita ao Novo Mundo. No Brasil, a família é composta por 19 gêneros e 41 espécies, das quais 19 ocorrem no Rio Grande do Sul (BENCKE et al., 2010, PIACENTINI et al., 2015). Poucos grupos de aves foram também estudados por ecologistas evolucionistas como os melros do mundo (Icteridae). Icterídeos exibem ampla gama de comportamentos (parasitismo de ninhada, colonialidade, poliginia, monogamia, reprodução retardada, mímica vocal, migração de longa distância), morfologias (dicromatismo sexual, dimorfismo de tamanho, maturação tardia da plumagem) e ecologias (variedade de dietas e habitats) (BROOKS; MCLENNAN 1991, HARVEY; PAGEL 1991).

### 2.2.3. Anatomia e Fisiologia

Os taminofilídeos são insetívoros de bico proporcionalmente grande e forte. Sua maxila possui entalhe subterminal tomial, adaptação que ajuda a segurar e esmagar o exoesqueleto quitinoso de artrópodes. Normalmente, apresentam asas curtas e elípticas, adaptadas para movimentação nos ambientes de vegetação densa. Em sua maioria, possui pés e pernas fortes, relativamente grandes, muitos possuem modificações dos artelhos e solas dos pés facilitando a fixação em galhos (ZIMMER; ISLER, 2003). A forte musculatura coxal os auxilia na locomoção, saltando e pulando. As espécies semiterrícolas possuem grande variação no desenvolvimento do tarso e dos dedos. As pernas podem ser altas e grossas, os dedos longos e fortes e as unhas grandes e afiadas (SICK, 1997). O tamanho da cauda e o formato variam bastante nesta família: *Myrmotherula brachyura* Hermann, 1783 possui a cauda curta, em contraste com a cauda longa das espécies de *Dryophila*, *Cercomacra*, *Pyriglena* e *Mackenziaena* Chubb, 1918. A plumagem dos taminofilídeos é bem macia, especialmente no dorso e flancos (ZIMMER; ISLER, 2003).

Diversos taminofilídeos têm áreas desprovidas de penas, principalmente ao redor dos olhos; isto é observado entre os seguidores de formigas de correição. O gênero *Rhegmatorhina* apresenta essas “manchas” periorbitais evidentes, Willis (1969) inferiu que estes “olhos” funcionam como uma grande íris, espantando predadores ou competidores. Esta família apresenta um padrão de plumagem pouco colorido e modesto. Seus representantes possuem tons de preto, branco, vários tons de ferrugem, castanho ou amarelo. Existe dimorfismo sexual externo na maioria das espécies. Normalmente os machos possuem combinações de cinza, preto e branco, enquanto que as fêmeas tendem para castanho e ferrugem, porém nem todos os taminofilídeos possuem forte dimorfismo sexual externo (ZIMMER; ISLER, 2003). De acordo com Sigrist (2009), ao explorar determinados biótopos do sub-bosque, rico em poleiros verticais e pobres em poleiros horizontais, muitas espécies desenvolveram dedos com estrutura sindáctila, ou seja, o segundo e o terceiro dedo são unidos na base, tornando o conjunto mais reforçado, auxiliando as espécies a capturarem presas.

Os representantes da família Conopophagidae formam um grupo morfológicamente conservado, mostrando pouca variação na forma básica e característica. São pequenos, com cauda curta e asas curtas e arredondadas, eles têm pernas proporcionalmente longas e pés fortes, permitindo empoleirar-se em galhos horizontais e verticais, próximo à serapilheira, e bico achatado com um gancho sutil na ponta. Apresentam olhos enormes e são fotófobos; a

maioria apresenta uma listra pós-ocular branca e conspícua (WHITNEY, 2003; SIGRIST, 2014).

A família Tyrannidae pode apresentar diferenças morfológicas perceptíveis na forma do bico, constantemente providos de vibrissas ou bigodes e também na cauda, com exceção de alguns gêneros, como *Alectrurus* spp., com caudas longas ou extravagantes. Possuem bicos com achatamentos diversos, às vezes com dente na ponta da maxila terminada em gancho, auxiliando na captura de insetos (SIGRIST, 2014).

Os icterídeos são representados por espécies do porte de um pardal até espécies grandes, do porte de certos cotingídeos ou de corvídeos. A plumagem em muitas espécies desta família combina padrões coloridos com marcas pretas contrastantes. Existem também espécies com grande dimorfismo sexual e outras com plumagens semelhantes em ambos os sexos, sendo diferenciado pelo tamanho, onde os machos são normalmente maiores que as fêmeas. Seu bico afilado serve para capturar insetos, artrópodes e pequenos vertebrados ou para roubar o néctar ao perfurar a base das grandes flores ou ainda para bicar frutos (SIGRIST, 2014).

#### **2.2.4. Ecologia**

A sazonalidade climática, tais como pluviosidade, temperatura e evapotranspiração tem grande influência na riqueza e comportamento dos animais, e são conhecidas por determinar padrões de distribuição de espécies em escalas amplas (HAWKINS et al. 2003), pois muitos ciclos populacionais de aves neotropicais são correlacionados a essa área, mostrando como as populações variam entre anos (SICK, 1997). Em contrapartida, outras variáveis tais como a história evolutiva das linhagens e a heterogeneidade de habitats, são importantes na determinação de gradientes geográficos de diversidade (KISSLING et al. 2007). Em geral, espécies que tem uma forte relação filogenética entre si, estão propensas a compartilhar suas características, e assim, compartilhariam seus nichos (WIENS; GRAHAM, 2005). Dessa maneira, como os fatores ambientais (climáticos e de hábitat) desempenham um papel importante na montagem do conjunto de espécies habitantes de uma área, espécies mais aparentadas tendem a ocupar áreas com os mesmos fatores ambientais.

Os pássaros da família Thamnophilidae são aves de pequeno porte, que se abrigam e capturam artrópodes em meio à vegetação densa (WIENS, 1989), constituída por espécies

basicamente insetívoras (SKUTCH, 1996). Não é raro ser a família mais representada em inventários avifaunísticos de florestas neotropicais mais próximas da linha do Equador (BIERREGAARD; STOUFFER, 1997), região considerada como centro de evolução da família (ZIMMER; ISLER, 2003). A grande maioria dos membros da família é arborícola, porém existem alguns terrícolas como no gênero *Myrmeciza*, habitando praticamente todos os nichos que uma floresta pode oferecer a um pássaro insetívoro, desde o sub-bosque até as copas. No entanto, isto só é possível, em virtude da ampla biodiversidade das florestas brasileiras (ZIMMER; ISLER, 2003; SIGRIST, 2009).

A família Conopophagidae é representada por pássaros insetívoros; seu nome popular chupa-dentes está intimamente correlacionado a sua vocalização, pois assemelha-se ao som produzido pela rápida sucção de ar entre os lábios e os dentes de uma pessoa. São aves territoriais, reagindo agressivamente quando seu canto é imitado pelo método acima descrito ou pela reprodução via *playback* da gravação de seu chamado. Quando excitados, permanecem empoleirados com as asas entreabertas e a curta cauda aberta em leque. Acompanha bandos mistos pelo sub-bosque, mas quando se afastam de seu território logo os abandonam; têm o hábito de viver em casais e nidificam sobre amontoados de folhas na serapilheira; seus ninhos têm forma de tigela; chocam em média dois ovos pintalgados. São aves muito curiosas e se aproximam de qualquer intruso que invada seu território, podendo produzir ruídos com as asas, providas de penas primárias modificadas para tal função, como por exemplo, na espécie *Conopophaga lineata* (Wied, 1831) (SIGRIST, 2014).

Os representantes da família Tyrannidae alimentam-se normalmente de insetos; algumas espécies como o bem-te-vi *Pitangus sulphuratus* (Linnaeus, 1766), capturam todo tipo de artrópodes; até mesmo pequenos caranguejos na orla marítima e nos manguezais fazem parte de sua dieta. No entanto, algumas espécies têm dieta mistas de insetos e frutos, sendo grande dispersoras de sementes; outras são granívoras e carnívoras. As aves insetívoras obtiveram maior êxito, devido à grande diversidade de nichos ecológicos e fauna entomológica neotropical. Há poucos estudos sobre aves insetívoras no Brasil, a maioria desses trabalhos são voltados para aves frugívoras e granívoras. Algumas espécies acompanham bandos mistos, e várias espécies da família Tyrannidae apresentam comportamentos de forrageio semelhantes, o que pode gerar um processo de competição entre os representantes da família. Possuem vocalizações simples, porém fortes nas espécies campestres, mais singelas e francas nas espécies florestais, mas há exceções; seus ninhos são construções elaboradas, podendo nidificar em cavidades naturais; o casal constrói o ninho e

cuidam da prole juntos. Há muita variação no formato dos ovos, podendo ser coloridos ou brancos, pintalgados ou manchados com cores fortes como o marrom, preto ou castanho, dependendo do gênero pertencente a ave (MARINI 1992, SICK 2001; SIGRIST, 2014).

A família Icteridae tem representantes arborícolas e terrestres; alguns são florestais enquanto outros vivem em áreas abertas ou palustres. A maioria das espécies desta família desenvolveu o hábito de “espaçar”, no qual o pássaro insere seu bico pontiagudo fechado nas cascas das árvores ou no esterco seco do gado, por exemplo, e abre o bico nessa cavidade ampliando-a, e assim desalojando presas como larvas e ovos de insetos. A vocalização dessas aves é bem diversificada; alguns gêneros podem desenvolver repertórios vocais dos mais estranhos e muitas espécies executam *displays* curiosos quando cantam e ainda podem imitar cantos de outros pássaros. Os hábitos reprodutivos são diferenciados; algumas aves nidificam em colônias sobre árvores isoladas, outras nidificam em colônias nos brejos e taboais, outras nidificam solitárias; seus ovos são brancos ou coloridos, podendo ser maculados de pintas ou apresentando vermiculações em tons de marrom, preto, cinza ou vermelho (SIGRIST, 2014).

### **2.2.5. Distribuição geográfica**

As aves são territoriais ao menos em alguma etapa de seu ciclo anual (YAMAGISHI; UEDA, 1986), esse comportamento pode estar associado à defesa de recursos necessários para sua sobrevivência ou sucesso reprodutivo (DUCA et al., 2006). Segundo Brown (1964) ao defender seu território, o defensor terá acesso a recursos de maior qualidade, entretanto as aves apenas defendem territórios se os benefícios de defesa equivalerem aos custos-tempo, energia ou riscos de confrontos diretos (BROWN, 1969). A quantidade de recursos alimentares nos territórios pode ser demonstrada através da relação entre tamanho dos territórios e a massa corporal das espécies. Estudos demonstram que o tamanho dos territórios é correlacionado à massa corporal (DUCA et al., 2006). Yamagishi e Ueda (1986) observaram que os limites implícitos nos territórios são avaliados como fixos ao longo do tempo, porém estes limites territoriais evidenciaram variações, possivelmente devido ao período de procriação, sazonalidade e disponibilidade de recursos alimentares. Durante o ciclo anual de uma espécie os dados sobre o tamanho do território, área de vida, comportamento territorial e suas consequências para as populações são importantes para um melhor entendimento da biologia das espécies; além disso, fornecem informações importantes para execução de planos

de conservação. Algumas evidências mostram que pequenos fragmentos florestais toleram somente parte do total de espécies originais do local, carecendo aquelas espécies mais afetadas pelas modificações do ambiente; pequenos fragmentos suportam aquelas mais comuns localmente, que se adaptam bem em habitats alterados; desse modo, a sobrevivência de várias espécies em fragmentos pode ser prejudicada, pois suas populações podem ser muito pequenas a ponto de serem extintas em longo prazo (GIMENES; ANJOS, 2003).

A avifauna brasileira com 1919 espécies, sendo 269 endêmicas, possui quase um quinto das espécies de aves do mundo, porém o Brasil também possui o maior número de espécies ameaçadas no Novo Mundo, aproximadamente 126. Apenas na região sudeste do país são 141 espécies endêmicas ao Brasil, e 105 quase endêmicas, com distribuição no Brasil, mas com alguma ocorrência no país vizinho, e 83 espécies ameaçadas de extinção segundo Ridgely et al. (2015).

A família *Thamnophilidae* é endêmica da região Neotropical. A floresta que ocorre na costa Atlântica e na Amazônia são duas importantes regiões de distribuição desta família (ZIMMER; ISLER, 2003). Sendo uma das famílias mais importantes na composição da avifauna Neotropical; os representantes desta família estão distribuídos nas planícies e florestas de altitude mais baixas da região neotropical, e podendo ser encontrados do sul do México (19° N) ao norte da Argentina (27° S). Os taminofilídeos estão limitados à América Central e ao continente Sul-Americano e ilhas adjacentes (SKUTCH, 1996); estão ausentes em parte da Argentina e em todo o Chile (RIDGELY; TUDOR, 1994). Conforme se distancia ao norte e ao sul da linha do equador a riqueza de espécies desta família diminui (SKUTCH, 1996). A maioria dos taminofilídeos está intimamente associada a capões ou a formações distintas de florestas (SICK, 1997), e são afetadas por fragmentação florestal e destruição da restinga, o que afeta sua abundância e ocorrência (WILLIS, 1979). Segundo Zimmer e Isler (2003) a maior parte habita as planícies de florestas úmidas, e alcança sua maior diversidade na bacia amazônica, porém essa diversidade diminui logo que há um aumento da altitude nas regiões montanhosas; os taminofilídeos possuem maior diversidade em florestas tropicais e matas de baixada, no entanto muitas espécies da Mata Atlântica, e dos Andes, podem ser encontradas acima dos 2.000 m de altitude. Algumas espécies habitam ambientes abertos, como savanas e campos, e não são encontrados nas altas elevações e latitudes, como por exemplo, nos altos Andes ou na Patagônia (ZIMMER; ISLER, 2003). Quase todas as espécies da América Central são também encontradas na América do Sul (SKUTCH, 1996).



A família Conopophagidae é um grupo endêmico da América do Sul; seus representantes são encontrados em florestas úmidas e matas secundárias densas. Todos são habitantes de sub-bosque e são vistos voando próximos ou no chão para capturar insetos. Também, empoleiram em galhos horizontais, cipós e troncos. São insetívoros terrestres que vivem nas florestas tropicais e temperadas da Colômbia, Suriname, Brasil, sul e nordeste da Argentina, sul do Paraguai, Bolívia e Peru (SICK, 1997; WHITNEY, 2003; SIBLEY; AHLQUIST 1990). Os conopofagídeos são aves do sub-bosque da floresta, estandes de bambu e o chão da floresta. Os membros do gênero *Conopophaga* são encontrados nas bacias do Amazonas e Orinoco, nas encostas leste e central dos Andes, na Mata Atlântica e regiões próximas, enquanto os membros do gênero *Pittasoma* Cassin, 1860 são encontrados no Chocó, no Panamá e na Costa Rica. Algumas espécies vivem em matas impenetráveis; outros moram em florestas mais abertas. A maioria está totalmente restrita a habitats úmidos, mas várias espécies se estendem para regiões mais secas no leste do Brasil. Os membros do gênero *Conopophaga* sempre são encontrados perto do chão da floresta, raramente subindo mais de 1,5 m acima do solo, eles também raramente viajam ou passam muito tempo no chão (embora alimentem se no chão). Os membros do gênero *Pittasoma* são mais comumente vistos pulando no chão (WHITNEY, 2003).

A riqueza de espécies de Tyrannidae, quando comparada ao habitat, é altamente variável, embora a maioria dos habitats nas Américas possuam pelo menos algumas dessas aves. Os habitats de floresta tropical de várzea e de floresta perene de montanha têm a maior diversidade de espécies isoladas, enquanto muitos habitats incluem rios, floresta de palmeiras, floresta de areia branca, floresta tropical decídua, floresta temperada do Sul, floresta temperada do Sul, semi-úmida/úmida; matagal de montanha, e pastagens temperadas do Norte, tendo a menor diversidade de espécies únicas. Isto pode ser devido em parte ao menor número de nichos encontrados em certas áreas e, portanto, menos lugares para a espécie ocupar. A especialização dos tiranídeos entre os habitats é muito forte nas florestas de várzeas e nas florestas de altitude. Esses tipos de habitats, portanto, exibem a maior especialização (DEL HOYO, 2004; BIRD, 2004). A família Tyrannidae é a maior dentre os pássaros suboscines das Américas e maior do Brasil; habitam todos os tipos de ambientes, desde florestas e cerrados, até ambientes abertos, lacustres e montanhosos. A maioria das espécies vive na borda de matas e possui grande capacidade de voo, permitindo o deslocamento de uma mata de capoeira para outra, ou migrar para longas distâncias em algumas épocas do ano de acordo com as estações, o que não ocorre com outros suboscines de hábitos mais

residentes. Algumas espécies migram para a Amazônia durante o inverno e voltam para as regiões do Sudeste durante a primavera, onde nidificam, como *Myiozetes* spp. Há outras espécies como *Elaenia* spp., que realizam migrações locais à procura de frutos e insetos. E outros gêneros como *Contopus*, *Tyrannus* e *Empidonax* Cabanis, 1855, que migram dos Estados Unidos das Américas e do Canadá para o Brasil e outras partes da América do Sul, fugindo do inverno boreal (SIGRIST, 2014).

A família Icteridae concentra a maior parte das suas espécies no Noroeste do continente, com 23 espécies. Há um outro centro nas regiões campestres e paludícolas do Rio Grande do Sul e Uruguai: 17 a 18 espécies. No Rio de Janeiro são registradas 7 espécies (SICK, 1997).

#### **2.2.6. Principais espécies de taminofilídeos, conopofagídeos, tiranídeos e icterídeos capturadas no PNI**

Devido à explosão de conhecimento sobre as aves que resultou na publicação de uma infinidade de artigos científicos, a taxonomia e nomenclatura das aves é considerada desafiadora para muitos autores. O Bird Life International e o CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos) não possuem idênticos sistemas de classificação; portanto, neste trabalho optou-se utilizar a classificação do Bird Life International, a qual tem sido amplamente aceita na literatura científica mundial.

##### *2.2.6.1. Thamnophilidae*

###### *2.2.6.1.1. Drymophila ferrugínea* (Temminck, 1822)

Esta espécie é conhecida popularmente por trovoadas, possui tamanho aproximado de 14 cm, ampla distribuição em sub-bosque de mata, capoeira de baixada e encosta, em geral até 1.200 m de altitude. Apresenta uma coloração das partes superiores alvinegras tendo o dorso bastante branco brilhante oculto, uropígio castanho; as partes inferiores são ferrugíneas vivas e uniformes. A fêmea é semelhante, porém com a coloração mais pálida. Seu canto

característico: um “di, tchi-uí?” simples, podendo ter notas extras no fim. Habita frequentemente a copa das árvores associada a outros pássaros; chamando muito a atenção pelo piar bissilábico; ocorre da Bahia a Santa Catarina, no Espírito Santo e Rio de Janeiro apenas nas serras, e na região metropolitana, no maciço da Pedra Branca (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.1.2. *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823)

Esta espécie é conhecida popularmente por choquinha-lisa, possui tamanho aproximado de 12 cm, ampla distribuição em sub-bosque de mata e capoeira e encosta, mata de araucária, e às vezes mata de planalto, em geral até 1.600 m de altitude. Estima-se que o período reprodutivo seja entre o final de setembro e começo de abril. Semelhante ao relatado na literatura para espécies florestais, o início do período reprodutivo das espécies florestais é relacionado ao final do inverno ou início do período chuvoso, com intensa atividade em outubro. A espécie apresenta forte dimorfismo sexual, observado nas diferenças da coloração da plumagem; o macho apresenta uma coloração oliva por cima, cabeça e pescoço cinzentos, garganta branca e barriga amarelada; já as fêmeas são oliva por cima, coroa canela contrastante, face cinza, asa e cauda de orlas ferrugíneas. É uma espécie que vocaliza muito, canta uma série curta e simples de assobios aflautados, um “wu-ri-ri-ri-ri?” rápido e ascendente. Ocorre do México à Bolívia, Brasil (do sul da Bahia ao Rio de Janeiro e Minas Gerais), Paraguai e Argentina (Misiones) (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.1.3. *Mackenziaena leachii* (Such, 1825)

Esta espécie é conhecida popularmente por borralhara-assobiadora, possui tamanho aproximado de 26,5 cm; uma espécie pouco abundante; habitando em sub-bosque denso de mata serrana e de araucária, capoeira e borda, em geral de 500 m a 2100 m de altitude. Apresenta uma notável cauda longa que toma metade do tamanho total; plumagem negra salpicada de branco (macho) ou amarelada (fêmea); a mesma tem sua plumagem canela e parda. Uma espécie muito mais ouvida que vista; seu canto é uma série rápida de assobios

finos e penetrantes, cujo timbre vai subindo antes de cair na parte final; um chamado anasalado e áspero “skiii”. Habita as brenhas densas; ocorre do Espírito Santo e Minas Gerais, Rio de Janeiro, ao Rio Grande do Sul, Paraguai e Argentina; no Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro nas montanhas, inclusive frequentando os campos de altitudes acima da linha das florestas (p. ex. no alto da Serra de Caparaó na divisa de Minas Gerais com o Espírito Santo) (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.1.4. *Mackenziaena severa* (Lichtenstein, 1823)

Esta espécie é conhecida popularmente por borralhara-de-topete, possui tamanho aproximado de 24 cm, habita o sub-bosque denso de mata e em bordas, com preferências por taquarais, em geral até 1500 m de altitude, às vezes em 1850 m em Itatiaia. Possui olhos ferrugíneos, crista bem visível; o macho apresenta uma plumagem de cor cinza-fuliginosa-escura, uniforme, com a cabeça negra; a fêmea toda barrada acanelada, topete ferrugíneo uniforme e cauda enegrecida. Uma ave arredia e discreta; vive em casal, quase nunca sai dos taquarais sendo raro juntar-se a bandos mistos; seu canto é de longo alcance, um “fuí-fuí-fuí-fuí-fuí-fuí” intenso. Escondido na ramagem densa de mata e capoeira, ocorre do sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, ao Rio Grande do Sul, Paraguai e Argentina (Misiones) (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.1.5. *Myrmoderus loricatus* (Lichtenstein, 1823)

Esta espécie é popularmente conhecida como formigueiro-assobiador, possui tamanho aproximado de 15 cm, encontrado no chão ou a baixa altura, em mata e capoeira, em geral de 200 m até 1350 m de altitude. Espécie terrícola de pés esbranquiçados, cauda comprida sem branco algum, mas com área dorsal branca oculta; marrom é a cor predominante do seu dorso, com sobrelha branca longa e larga, coberteiras da asa pretas com faixas de pintas acaneladas e brancas. Vive sozinho ou em casal, saltita pelo chão revirando folhas com o bico, raramente se junta a bandos mistos. Seu canto é uma série rápida de assobios duplos e agudos “uisí, uisí, uisí, uisí, uisí, uisí” que desce aos poucos. Ocorre da Bahia, Minas Gerais e

Espírito Santo a São Paulo; no Espírito Santo e Bahia é observado nas montanhas. (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.1.6. *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818)

Esta espécie é popularmente conhecida como papa-taoca-do-sul; possui tamanho aproximado de 18 cm, ampla distribuição em sub-bosque de mata, capoeira e mata de araucária, em geral até 1.250 m de altitude. Seu olho é vermelho-vivo; o macho apresenta duas barras alvas sobre a asa e com área dorsal branca oculta, a qual falta na fêmea, que é marrom. Seu canto frequente é um “pir-pir-pir-pir-pir-pir!” penetrante, algo descendente; o chamado é um “kiip” repetido e costuma ser a vocalização mais penetrante que se pode ouvir em qualquer mata fechada do sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais (Rio Doce) até Rio Grande do Sul, Argentina (Misiones) e Paraguai. Vive em casal e não costuma juntar-se em bandos mistos; porém vários casais podem ser vistos juntos ao obter grande parte de seu alimento capturando formigas de correições (SICK, 1997; WILLIS; ONIKI 1992; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015;).

#### 2.2.6.1.7. *Rhopias gularis* (Spix, 1825)

Esta espécie é conhecida também por choquinha-de-garganta-pintada, possui tamanho aproximado de 9,5 cm, habita o sub-bosque de mata e capoeira, em geral até 1500 m de altitude. É uma espécie restrita ao sudeste do país; distinta pela garganta salpicada de branco, em ambos os sexos, e pela cor marrom-acanelada; e asa preta com duas faixas caneladas; branco oculto na base da asa. Voa em casal; não se junta a bandos mistos, vive em grotas perto de riachos e é mais terrícola, sendo seu canto descendente áspero anasalado, um “tcht-tcht-tcht” rápido. Ocorre de Minas Gerais e Espírito Santo ao Rio Grande do Sul; também no Rio de Janeiro (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.2. *Conopophagidae*

##### 2.2.6.2.1. *Conopophaga lineata*

Esta espécie é conhecida também por chupa-dente, possui tamanho aproximado de 12,5 cm, ampla distribuição no sub-bosque e borda de mata, inclusive de araucária, e de capoeiras, em geral de 500 a 2400 m de altitude. Ambos os sexos são bem parecidos, de plumagem marrom-ferrugínea, um tufo pós-ocular branco no macho e cinza na fêmea, mandíbula amarelada, alaranjada na parte inferior e o meio da barriga branco. Vive sozinho ou em casal, normalmente em baixa altura, mas é raro vê-lo no chão; pousa em talos verticais; geralmente é visto sozinho, mas pode ser avistado às vezes em bandos mistos de sub-bosque. O canto do macho é uma série de 8-10 assobios agudos, “tchiff” abrupto, som parecido com o chupar os dentes que originou o nome popular. Ampla ocorrência do Ceará ao Rio Grande Sul, Goiás, passando pelo leste de Mato Grosso, Paraguai e Argentina (Misiones). Em Itatiaia alcança os campos de altitude (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

##### 2.2.6.2.2. *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818)

Esta espécie é conhecida também por cuspidor-de-máscara-preta, possui tamanho aproximado de 11 cm, encontrado no sub-bosque de mata de baixada e de encosta, em geral até 1000 m de altitude. O macho, muito distinguível da fêmea pelo contraste do boné ferrugíneo-alaranjado-vivo, com os lados da cabeça pretos e garganta branca, dorso marrom e cinza por baixo; já na plumagem da fêmea predomina o marrom-ferrugíneo, com sobrancelhas e tufo pós-ocular branco-sujo; bico preto. Vive na mata fechada a pouca altura do solo e prefere áreas úmidas próximo a riachos e pequenas corredeiras. O canto é um trinado agudo que pode durar de 8-10 segundos, “tchuit” agudo. Ocorre da Paraíba a Santa Catarina; nas regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

### 2.2.6.3. Tyrannidae

#### 2.2.6.3.1. *Attila rufus* (Vieillot, 1819)

Esta espécie é conhecida popularmente por capitão-de-saíra, possui tamanho aproximado de 20 cm; de ocorrência ampla a meia altura e logo abaixo do dossel de mata; endêmico da Serra do Mar e da Mata Atlântica, até 1500 m de altitude, mas em geral abaixo de 1100 m. De coloração ferrugínea uniforme, com a cabeça cinza e garganta rajada de branco. Vive sozinho ou em casal, oculto no sub-bosque e no estrato baixo em soqueiras de samambaias ou em taquarais, bastante visto na borda de mata; captura insetos em voos curtos ou consome pequenos frutos. Seu canto é uma série de 6-9 notas “vi”, ascendente meio lenta até ir diminuindo, e também um uí-titititu, rápido e suave. Ocorre do sudeste da Bahia e Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.2. *Capsiempis flaveola* (Lichtenstein, 1823)

Esta espécie é conhecida por marianinha-amarela, possui tamanho aproximado de 11,5 cm, de ocorrência ampla a baixa e média altura em mata, com maior frequência onde há taquarais e também mata de araucária, em bordas e clareiras de florestas úmidas e restingas, até 1200 m de altitude. Sua plumagem é oliva-amarelada por cima, asas e cauda mais escuras, cauda longa, amarela-viva por baixo. Vive em casal ou em grupo familiares de 3 a 4 indivíduos, e não se junta a bandos mistos; perseguem insetos em voos espalhafatosos pelo subdossel e pelo estrato médio; seu ninho tem forma de taça aberta, feito com gramíneas e musgos em meio à vegetação. Seu canto é um trinado curto e seco “tr-r-r-r-r-r-r”; um gorjeio agradável que pode ser dado em dueto pelo casal. Encontrado à beira de mata, cafezal, restinga, desde a Nicarágua à Bolívia e Paraguai, além de todas as regiões do Brasil até o Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.3. *Colonia colonus*

Esta espécie é conhecida popularmente por viuvinha, possui tamanho aproximado de 23-25 cm para macho e 18-20 cm para fêmea. Encontrada em borda de mata, também de araucária, às vezes em árvores em áreas abertas vizinhas, e em geral pousada em poleiros elevados, bem expostos e visíveis, até 1500 m de altitude. Morfologia inconfundível; bico preto curto; preta com testa e sobrancelha brancas, coroa e nuca acinzentadas, par de penas centrais da cauda muito longo. Vive em casal, às vezes em grupos familiares, exceto em bando misto, pousada em galhos ou troncos mortos; move a cauda e dá voos curtos e acrobáticos atrás de insetos, ou os capturam em pleno ar. Pode permanecer imóvel por longos períodos; após voos longos costuma voltar ao mesmo poleiro ou algum bem próximo; é considerada sedentária por sempre usar os mesmos poleiros. Nidifica em ocos de pica-paus e cavidade naturais nas árvores. Seu canto é um “uiu?” delicado e também um “suii, tititu” rápido. É em parte migratório. Ocorre das Guianas e Equador até Bolívia e Paraguai, localmente na Amazônia brasileira, Brasil central e oriental, do Maranhão ao Rio Grande do Sul, no Espírito Santo e Rio de Janeiro; mais nas montanhas (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.4. *Corythopsis delalandi* (Lesson, 1831)

Esta espécie é conhecida popularmente por estalador, possuindo tamanho aproximado de 14 cm; encontrado perto do chão ou no mesmo, no interior de mata e capoeira, preferindo áreas úmidas ao longo de riachos, até 1000 m de altitude. Sua plumagem é marrom-olivácea por cima, ao redor dos olhos branco, e por baixo branco; peito com estrias pretas, pernas altas e esbranquiçadas, asas grandes e cauda relativamente longa. Vive sozinho, mas pode ser visto em casal às vezes; habita no sub-bosque onde caminha pelo chão, movendo a cabeça e a cauda; pousa em troncos e galhos caídos, dali do chão voa para cima, e captura insetos na parte inferior da folha. Facilmente identificado pelo estalo forte que dá com o bico, dando origem ao seu nome vulgar. Nidifica próximo ao solo; seu ninho é esférico com entrada pelo lado e os ovos pardacentos são análogos ao de outros tiranídeos. Defende um território de aproximadamente 200m de extensão linear. Seu canto é um assobio agudo, “pii-purruí, pi-



purruit”. Ocorre do Nordeste ao Rio Grande do Sul, através de Goiás e Mato Grosso à Bolívia, Paraguai e Argentina (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.5. *Elaenia parvirostris* Pelzeln, 1868

Esta espécie é conhecida popularmente por guaracava-de-bico-curto; possui tamanho aproximado de 13 cm; um pássaro migratório encontrado em capoeira borda de mata e áreas abertas com árvores, em até 1500 m de altitude. Sua coloração é oliva no dorso, cabeça com fina estria visível na coroa, anel ocular branco, asas escuras com 2-3 faixas brancas, seu ventre é cinza claro. Vive sozinho em bordas de matas, capoeiras, parques, cerrados e áreas semi-abertas; alimenta-se de frutos e pequenos insetos. Reproduz-se no Sul em novembro e migra posteriormente para o Sudeste e o Centro-Oeste até a Amazônia. Seu canto um “uíú”, mas normalmente não vocaliza muito. Ocorre na Bolívia, Argentina, Rio Grande do Sul até o norte do continente (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.6. *Knipolegus cyanirostris* (Vieillot, 1818)

Esta espécie é conhecida popularmente por maria-preta-de-bico-azulado; possui tamanho aproximado de 15 cm; encontrada no sub-bosque de mata, mata de araucária e capoeira, entre 500 a 2200 m de altitude; migratória entre as serras do Sudeste e Sul. O macho tem o bico azul-claro e olho vermelho, todo preto, e a fêmea tem o bico mais escuro e olho alaranjado, sendo marrom-acanelada no dorso, asa enegrecida com duas faixas pardas visíveis; seu ventre é branco-sujo rajado de marrom. Vive em casal, mantém-se entre as folhagens, em geral a baixa altura, é um pouco arisca; na época da reprodução o macho exibe-se para a fêmea; eleva-se no ar uns 5-10 m, e cai em seguida como uma pedra nas folhagens; seu ninho tem forma de taça. Ocorre do Espírito Santo e Minas Gerais ao Rio Grande do Sul e Mato Grosso, Argentina, Paraguai e Uruguai, no norte em regiões serranas (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.7. *Knipolegus nigerrimus* (Vieillot, 1818)

Está espécie é conhecida popularmente por maria-preta-de-garganta-vermelha. Possui tamanho aproximado de 18 cm e é encontrada em áreas abertas com árvores e moitas e em borda de mata, de araucária; prefere terreno rochoso. Entre 700 a 2400 m de altitude, é endêmico restrito aos campos altimontanos no sudeste e Sul; habita as serras do Mar, da Mantiqueira, do Caraça, do Itatiaia, do Caparaó e dos Órgãos. Apresenta o bico azulado, olho vermelho-escuro, podendo ter crista; o macho é preto-azulado, com faixa branca na asa; a fêmea é semelhante, mas tem a garganta rajada de castanho-escuro e preto. Vive em casal; não pousa tão expostos; em geral fica na vegetação baixa capturando insetos entre arbustos em voos curtos, e é bem silenciosa; elas pernoitam abrigadas em escarpas rochosas e nidificam em grotas e paredões rochosos secos nos meses de verão. Ocorre de Alagoas, Bahia, Paraná ao Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.8. *Lathrotriccus euleri* (Cabanis, 1868)

Está espécie é conhecida popularmente por enferrujado. Possui tamanho aproximado de 12,5 cm; de ocorrência ampla a baixa altura em mata, capoeiras e bordas, até 1800 m de altitude. Seu dorso é pardo-escuro, bico amarelado, leve mancha clara no loro e anel ocular claro, peito pardo-oliváceo e barriga branca. Vive sozinho ou em casal, não se junta a bandos mistos; discreto fica oculto na folhagem do sub-bosque, seu ninho tem forma de taça aberta em meio à vegetação do sub-bosque. Seu canto mais comum é um “ziu-bi” ou um “ziu”. Ocorre da Venezuela à Bolívia, Argentina e Paraguai, em todas as regiões do Brasil até o Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.9. *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846

Está espécie é conhecida popularmente por cabeçudo. Possui tamanho aproximado de 13 cm; de ocorrência ampla em sub-bosque de mata, capoeira, e florestas úmidas. Em geral abaixo de 1200 m de altitude, mas pode chegar até 1500 m. Seu dorso é oliva, a cauda amarronzada, asa escura com duas faixas pardas e filetes amarelos, coroa marrom-escuro e

face branco-suja com crescente preto nas auriculares. Garganta cinza-clara, peito oliváceo e barriga amarelo-clara. Vive sozinho ou em casal, voa em bandos mistos, pousa em locais abertos, costuma levantar uma das asas na vertical; constrói o ninho pendular globular com entrada lateral, fixando-o nas raízes, expostas dos barrancos em ravinas. Seu canto é rápido e tênue “ski-k’k’k’k’k’k’k’kiu” Ocorre do México, Amazonas, Rondônia, Mato Grosso e Bolívia; Nordeste, Leste e Sul até o Rio Grande do Sul, Misiones e Paraguai (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.10. *Mionectes rufiventris* Cabanis, 1846

Esta espécie é conhecida popularmente por abre-asa-de-cabeça-cinza; possui tamanho aproximado de 13 cm; encontrada em sub-bosque de mata, de araucária e em capoeira, em geral até 1500 m de altitude, mas pode chegar a 1800 m. Seu dorso é oliva-amarronzado, asa uniforme, bico de base rosada, capuz cinza, peito oliváceo e barriga laranja. Uma ave discreta que tende a ficar dentro da mata, atraídas para a borda por plantas com frutos; também observada em bandos mistos, aos casais ou em grupos familiares. Frequentemente abre a cauda em leque e uma das asas na vertical; forrageia insetos em meio a aglomerados de folhas mortas, consome poucos frutos; seu ninho é pendular, uma bolsa piriforme com entrada lateral. O canto do macho é anasalado; começa lento, acelera e depois para de repente. É restrito ao sul: Espírito Santo (regiões serranas), Minas Gerais, Rio de Janeiro (Petrópolis, Teresópolis, Itatiaia, etc.), ao Rio Grande do Sul, Misiones e Paraguai (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.11. *Myiarchus ferox* (Gmelin, 1789)

Esta espécie é conhecida popularmente por maria-cavaleira. Possui tamanho aproximado de 19 cm, encontrada em borda de mata, capoeira e áreas abertas, florestas úmidas, de ampla ocorrência, até 1800 m de altitude. Sua plumagem tem tons de cinza-esverdeados no dorso, bico preto e longo, barriga de cor amarelo vivo, cauda mais escura na parte superior. Todos os *Myiarchus* têm o costume de arrepiar as penas do vértice. Seu canto é um “brrrui” suave. Ocorre do norte da América do Sul à Bolívia e Uruguai, Brasil

amazônico, central e oriental, também no Rio de Janeiro e oeste do Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.12. *Myiarchus swainsoni* Cabanis & Heine, 1859

Esta espécie é conhecida popularmente por irré. Possui tamanho aproximado de 19 cm, de ampla ocorrência em mata de borda, capoeira, e áreas abertas, até 1650 m de altitude; também pode ser encontrado no cerrado, matas secas, caatinga, e bordas de florestas úmidas. Seu dorso é pardo-oliváceo, coroa amarronzada, bico rosado, cauda enegrecida com lateral branca, garganta e peito cinza-claro, e barriga amarelada. Alimenta-se de frutos e insetos em voo. Seu canto é um assobio “uíó” curto, suave, também tem outras frases como “ría, brr-ria”. É um pássaro migratório que ocorre da Venezuela à Bolívia, Argentina, Paraguai e Uruguai, em todas as regiões do Brasil, incluindo o Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.13. *Phyllomyias griseocapilla* Sclater, 1862

Esta espécie é conhecida popularmente por piolinho-serrano. Possui tamanho aproximado de 11 cm, de ampla ocorrência em borda de mata capoeira, serranas e mata de araucária, e às vezes nos arredores; de 800 até 1800 m de altitude; espécie endêmica do Sudeste e Sul. Seu dorso é oliva-vivo, tem anel ocular branco, asa enegrecida com faixas amarelas, cabeça cinza, ventre branco. Vive sozinho ou em casal, alimenta-se em baixa altura, às vezes com bandos mistos. Normalmente é silencioso; um assobio suave “uíú”, repetido até quatro vezes, e “u-iiii” mais longo. Ocorre em Minas Gerais e do sul da Bahia à Santa Catarina (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.14. *Phylloscartes difficilis* (Ihering & Ihering, 1907)

Esta espécie é conhecida popularmente por estalinho. Possui tamanho aproximado de 11 cm; de ocorrência em sub-bosque e borda de mata serrana e de araucária, de 800 a 2100 m

de altitude. Espécie endêmica da serra do Mar e da Mantiqueira. Seu dorso é oliva-vivo, com anel ocular e sobrançelha brancos e face cinzenta; asa com filetes oliva; seu ventre é cinzento, garganta e meio da barriga mais brancos. Vive em casal e normalmente não se junta a bandos mistos; oculto no sub-bosque e no estrato baixo, em meio ao emaranhado da vegetação; captura insetos em voos curtos e consome pequenos frutos. Seu canto é um “tuídidi!” rápido e produz um estalo com o bico. Ocorre de Minas Gerais e Rio de Janeiro a São Paulo, restrito às montanhas (Serra dos Órgãos, Bocaina, Itatiaia, Caparaó); Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.15. *Pitangus sulphuratus*

Esta espécie é conhecida popularmente por bem-te-vi. Possui tamanho aproximado de 22,5 cm, de ocorrência em borda de mata e em ambiente alterado, uma ave muito numerosa em áreas urbanas, até 1600 m. Em Itatiaia até 2300 m de altitude. Seu dorso é marrom, coroa e máscara negras, longa sobrançelha branca, mancha amarelada semioculta na coroa, bico forte e reto, asa e cauda com filetes canela, garganta branca, ventre amarelo-vivo. São aves chamativas, barulhentas e bem adaptáveis a qualquer meio; descobre sempre novas fontes de alimento, vive em casal ou em grupos, come insetos e frutos, pesca pequenos peixes e caça pequenos vertebrados; faz grandes ninhos no topo de árvores e até em transformadores de iluminação pública. Seu canto é um sonoro “bem-te-vi!”, que pode variar para “bem-te-vi-trriik”, e um “i-ii”. Ocorre do Texas onde nidifica à Argentina e em todo o Brasil (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.16. *Platyrinchus mystaceus* Vieillot, 1818

Esta espécie é conhecida popularmente por patinho. Possui tamanho aproximado de 10 cm, de ampla ocorrência em sub-bosque de mata, araucária e em capoeira, até 1500 m de altitude. Seu dorso é marrom-oliváceo, coroa com mancha amarela oculta, plumagem pardo-amarelado e preto na face, garganta branca, bico muito largo e chato, mandíbula clara, ventre pardo, e meio da barriga amarelado. Ave discreta e pequena, em geral vive sozinha; não se junta a bandos mistos; prefere vegetação arbustiva e densa a pouca altura; são bem rápidos;

capturam insetos. Seu canto é um “uik!”, ou “uikik”. Ocorre do México à Bolívia e Argentina, Brasil oriental, meridional (inclusive Rio Grande do Sul) e centro-ocidental (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.17. *Ramphotrigon megacephalum* (Swainson, 1835)

Esta espécie é conhecida popularmente por maria-cabeçuda. Possui tamanho aproximado de 13 cm; de ocorrência em sub-bosque de mata e capoeira com predomínio em taquarais, até 1400 m de altitude. Na Serra do Caparaó em até 1900 m. Seu dorso é oliva-escuro apagado, sobrancelha branco-amarelada, bico largo e chato, asas mais escuras com duas faixas ocráceas, ventre amarelada, com peito oliva-ocráceo e garganta branca. Uma ave arredia, que pousa ereta entre a vegetação, em meio a taquarais. Prefere o interior escuro do sub-bosque denso; vive sozinha ou aos pares, alimenta-se de insetos; o casal nidifica em cavidades naturais em árvores, chocando dois ovos. Seu canto é um “ué, urt” abrupto. Ocorre na Amazônia ocidental, Minas Gerais e Espírito Santo a Santa Catarina; Paraguai e Misiones (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.18. *Serpophaga nigricans* (Vieillot, 1817)

Esta espécie é conhecida popularmente por João-pobre. Possui tamanho aproximado de 12 cm; de ocorrência em áreas arbustivas e abertas, sempre à beira d'água; até 1500 m de altitude, às vezes 2000 m. Uma ave pequena e escura, dorso cinza-amarronzado, ventre cinza mais claro, cauda preta. Vive sozinho ou em casal, saltitando perto d'água e pousando em rochas e galhos; desce ao solo e costuma abrir a cauda ou jogá-la para cima. Alimenta-se de artrópodes à beira d'água; vasculha o musgo atrás de alimento. Seu canto é um “tchit- tchit-tch-t-t-t-t”. Ocorre da Argentina ao Espírito Santo e Minas Gerais; no norte, nas montanhas (Itatiaia, Bocaina, etc.) (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.19. *Tolmomyias poliocephalus* (Taczanowski, 1884)

Esta espécie é conhecida popularmente por bico-chato-de-cabeça-cinza. Possui tamanho aproximado de 12 cm; de ocorrência a meia altura, abaixo do dossel, e em borda de mata, nas baixadas costeiras, até 600 m de altitude. Seu dorso é oliva, coroa cinza, mancha branca diante do olho, olho cor de mel, bico quase todo preto, asa escura com duas faixas e filetes amarelos, garganta branca, peito oliva, barriga amarelo-clara. Vive em bando misto de dossel; raramente desce das copas; tem uma postura horizontal, costuma erguer a cauda. Seu canto é “fi, fií, fi-i, fii-i” um pouco ofegante. De ocorrência ampla na Amazônia brasileira e extrabrasileira; também na mata atlântica do litoral de Pernambuco até o Espírito Santo. No Rio de Janeiro em algumas florestas remanescentes de baixada do norte do estado, em Campos e Casimiro de Abreu (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.3.20. *Tolmomyias sulphurescens* (Spix, 1825)

Esta espécie é conhecida popularmente por bico-chato-de-orelha-preta. Possui tamanho aproximado de 13,5 cm; de ocorrência em sub-bosque e borda de mata, araucária, em capoeira, em até 1700 m de altitude. Seu dorso é oliva, com coroa e nuca cinzentas, mancha branca na frente do olho, manchas escuras nas auriculares, asa escura com duas faixas e filetes amarelos, mandíbula clara e chata, garganta acinzentada, peito e flanco oliváceos, e barriga amarela. Vive sozinho ou em casal; também em bandos mistos pelo subdossel e estrato médio. Costuma pousar ereto, mas também pode adotar uma postura horizontal com a cauda erguida; percorre galhos secos à procura de insetos; também consome frutos. Constrói seu ninho longo e suspenso sobre árvores à beira d’água, caminhos ou em ravinas. Seu canto é um “chuit!” agudo e áspero. Ocorre do México à Bolívia e Argentina, em todas as regiões do Brasil, até o Rio Grande do Sul (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

#### 2.2.6.4. Icteridae

##### 2.2.6.4.1. *Cacicus haemorrhous* (Linnaeus, 1766)

Esta espécie é conhecida popularmente por guaxe. Possui tamanho aproximado de 28 cm para macho e 23 cm para fêmea; são aves de dossel, borda de mata e mata de araucária; em geral até 1000 m de altitude. Seu olho é azul, bico amarelado, preto brilhoso, uropígio e coberteiras superiores da cauda vermelhas; a fêmea é mais opaca. É uma ave chamativa e barulhenta, fácil de detectar onde ocorre. Sua dieta é composta basicamente por frutos; procurados nas bordas de floresta, como camboatá, e de diversas espécies de embaúbas, também alimenta-se de invertebrados, néctar e flores; a colônia fica localizada em galhos sobre a água em frondes de palmeiras ou em árvores isoladas; o material do ninho é constituído de vários vegetais. Seu chamado é áspero, às vezes intercalados com notas mais melodiosas, um “tchouiiii” prolongado, costuma dar um “tchap! tchap! tchap!” áspero durante alimentação e voo. Prefere baixadas quentes com florestas (p. ex. Espírito Santo, Rio de Janeiro). Ocorre do norte do continente, através da Amazônia, localmente até o Juruá, baixo Tapajós e Belém (Pará), Brasil oriental e centromeridional; também Pernambuco, sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul; Paraguai e Argentina (SICK, 1997; SIGRIST, 2014; RIDGELY et al., 2015).

### 2.3. OS COCCÍDIOS

#### 2.3.1. Classificação

Os coccídios de aves mais abundantes encontrados parasitando a ordem Passeriformes pertencem ao gênero *Isospora*, seguido do gênero *Eimeria*. De acordo com Upton (2000) os coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* são classificados da seguinte forma:



Domínio: Eukaryota Chatton, 1925

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Conoidasida Levine, 1988

Subclasse: Coccidiasina Leuckart, 1879

Ordem: Eucoccidiorida Léger e Duboscq, 1910

Sub-ordem: Eimeriorina Léger, 1911

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Gênero: *Isohora* Schneider, 1881

### 2.3.2. Diversidade

As espécies do gênero *Isohora* são relatadas parasitando aves Passeriformes há mais de dois séculos, pela transmissão desses coccídios serem via feco-oral, a transmissão é comum em aves simpátricas, então a transmissão entre aves não simpátricas seria improvável (BERTO et al., 2011a). Esse tipo de transmissão entre aves não simpátricas já foi relatado, porém na maioria dos casos houve transmissão promovida pelo comércio legal ou tráfego de Passeriformes silvestres e reintrodução por Centros de Triagem de Animais Silvestres (BERTO; LOPES, 2013).

Os membros da família Icteridae pode ser parasitada por coccídios do gênero *Isohora*. Até o presente momento as espécies de *Isohora* recuperadas dos Passeriformes dessa família são: (i) *Isohora divitis* Pellérdy, 1967 de *Ptiloxena atroviolacea* (d'Orbigny, 1839) (syn. *Dives atroviolaceus*) em Cuba (PELLÉRDY, 1967); (ii) *Isohora cacici* Lainson, 1994 do xexéu *Cacicus cela cela* (Linnaeus, 1758) na Amazônia brasileira (LAINSON, 1994); (iii) *Isohora bellicosa* Upton, Stamper e Whitaker, 1995 de *Leistes bellicosus* deFilippi, 1847 (syn. *Sturnella bellicosa*) no Peru (UPTON et al., 1995); (iv) *Isohora icterus* Upton & Whitaker, 2000 de *Icterus icterus* (Linnaeus, 1766) nos EUA (UPTON; WHITAKER, 2000); e (v) *Isohora graceannae* Upton & Whitaker, 2000 de *Icterus graceannae* Cassin, 1867 nos EUA (UPTON; WHITAKER, 2000); e recentemente, Silva et al. (2017) descreveram (vi) *Isohora guaxi* Silva & Berto, 2017, do guaxe *C. haemorrhous*, e *I. bellicosa* em um novo hospedeiro, *C. haemorrhous*, no PNI no sudeste do Brasil,

demonstrando transmissão parasitária entre icterídeos alopátricos que habitam lados opostos dos Andes.

Desde os anos 2000, espécies de *Isospora* foram descritas de tiranídeos do Novo Mundo, sendo elas: (i) *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009, da maria-cavaleira *M. ferox*, *Isospora mionectesi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2009 do abre-aza-de-cabeça-cinza *M. rufiventris*, e *Isospora attilae* Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015, descrito do capitão-de-saíra *A. rufus*, os hospedeiros destas três espécies habitavam a mesma localidade, a Ilha Marambaia no sudeste do Brasil (BERTO et al., 2009a, b; RODRIGUES et al., 2015); recentemente *Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018, do patinho *P. mystaceus* descrito por Silva-carvalho et al., (2018a), no PNI.

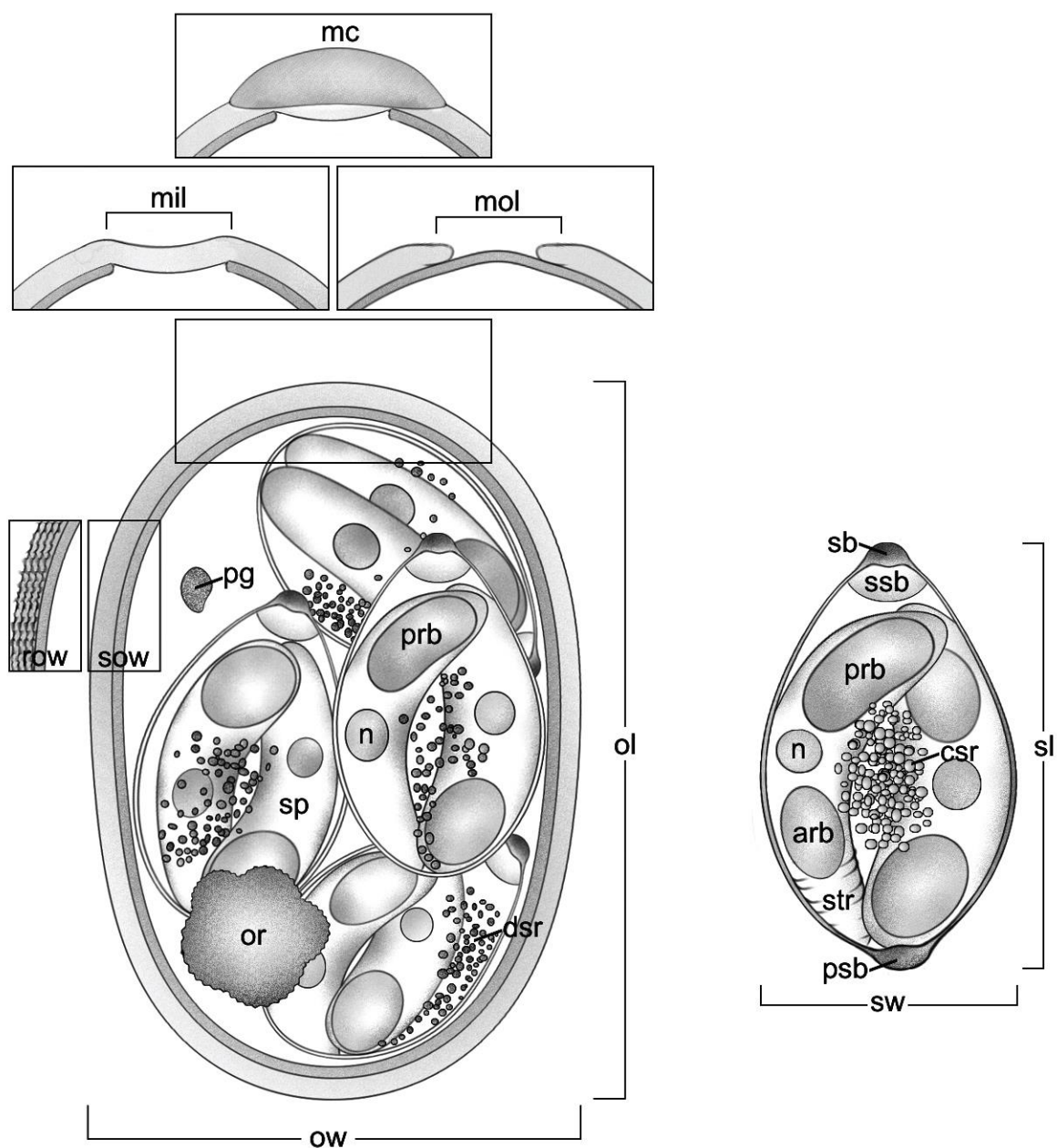
São relatadas duas espécies de *Isospora* encontradas infectando taminofilídeos: *Isospora sagittulae* McQuiston e Capparella, 1992, descrito por McQuiston e Capparella (1992) parasitando *Hylophylax naevioides* (Lafresnaye, 1847), no Equador, um pássaro taminofilídeo que tem uma distribuição trans-andina na Colômbia, Costa Rica, Equador, Honduras, Nicarágua e Panamá (MCQUISTION; CAPPARELLA 1992). Essa mesma espécie de *Isospora* também foi descrita infectando a mãe-de-taoca-de-cauda-barrada *Oneillornis salvini* (Berlepsch, 1901) (syn. *Gymnopathys salvini*), que é restrito à área de endemismo denominado Inambari, distribuídos na Bolívia, Brasil e Peru, e o rendadinho *Willisornis poecilinotus* Cabanis, 1847, que ocorre na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Departamento ultramarino da Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela, demonstrando que haveria transmissão desse coccídio entre aves não simpátricas de mesma família, porém de gêneros diferentes que habitam lados opostos da cordilheira dos Andes e do rio Amazonas (BERTO et al., 2014a). Recentemente Silva-carvalho et al., (2018b) relataram um novo hospedeiro para *I. sagittulae* em aves taminofilídeos na região Neotropical, o papa-taoca-do-sul *P. leucoptera*, demonstrando assim a ampla dispersão de *I. sagittulae*; outra *Isospora* relatada na família Thamnophilidae foi descrita por Silva et al. (2016), *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2016 parasitando a papa-taoca-do-Sul, *P. leucoptera* no PNI, RJ.

Na família Conopophagidae até o presente momento apenas uma espécie de coccídio isosporóide foi relatada, *Isospora borbai* Silva-Carvalho et Berto, 2019, descrita por Silva-Carvalho et al. (2019), encontrada parasitando dois hospedeiros distintos, pertencentes ao mesmo gênero e família, *C. melanops* e *C. lineata* capturados em diferentes localidades da região do Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro.

### 2.3.3. Identificação

Os coccídios são identificados e classificados frequentemente pelos oocistos, que são formas exógenas observadas nas fezes ou urina de seus hospedeiros. Essa identificação só poderá ser realizada de maneira precisa quando as características morfológicas do organismo estiverem visíveis, após o período de esporulação, período de maturação variável de acordo com a espécie. As características morfológicas fundamentais para a identificação e organização sistemática dos gêneros *Isoospora* e *Eimeria* são: presença e número de esporocistos e esporozoítos; parede do oocisto; micrópila e/ou capuz polar; grânulo polar e/ou resíduo do oocisto; corpos de Stieda, substieda e parastieda; resíduo do esporocisto; corpo refrátil, núcleo e estrias no esporozoíto. Dentre as características morfométricas destacamos o diâmetro maior/menor do oocisto, diâmetro maior/menor do esporocisto e índices morfométricos (Figura 2) (BERTO et al., 2014b).

De acordo com Levine (1985), os oocistos dispóricos tetrazóicos, ou seja, um oocisto contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, foram descritos como espécies do gênero *Isoospora* em vários hospedeiros vertebrados e invertebrados, e os oocistos tetraspóricos dizóicos, ou seja, um oocisto contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada, foram descritos como espécies do gênero *Eimeria*. Os coccídios do gênero *Isoospora* são os parasitos mais comuns encontrados em Passeriformes.



**Figura 2.** Principais características morfológicas observadas no oocisto. Capuz polar (mc); micrópola na camada interna (mil) e externa (mol); parede exterior áspera (row) ou lisa (sow); largura do oocisto (ow); comprimento do oocisto (ol); grânulo polar (pg); resíduo do oocisto (or); largura do esporocisto (sw); comprimento do esporocisto (sl); corpo de Stieda (sb); corpo substieda (ssb); corpo de parastieda (psb); resíduo do esporocisto compacto (csr) ou difuso (dsr); esporozoíto (sp); corpo refráctil anterior (arb) e posterior (prb) do esporozoíto; núcleo do esporozoíto (n); e estrias do esporozoíto (str). De acordo com Berto et al. (2014b).

Os estudos de Belli et al. (2006) e Mai et al. (2009) assinalaram que a estrutura de base da parede do oocisto é comum a todos os coccídios. Em ambos os estudos, esses autores indicaram claramente que a parede do oocisto é constituída por duas camadas distintas, uma interna e outra externa, envolvida por uma membrana externa, que é normalmente ausente em oocistos maduros isolados a partir de fezes; pelo fato dessa membrana ser muito delicada, ela é perdida logo após o desenvolvimento e eliminação do oocisto da célula. Na camada externa da parede do oocisto observa-se uma superfície áspera e a densidade aumenta conforme se aproxima da parte interna; já a camada interna é menos espessa e mais densa que a outra, as mesmas são diferenciadas na microscopia óptica, porém a separação é muito difícil. O modelo bicamada está em desacordo com muitos estudos anteriores que descreveram as paredes dos oocistos como uma única camada (LAINSON; SHAW, 1989). No entanto, pensa-se atualmente que a parede de camada única descrita em alguns coccídios era na verdade duas camadas, com camadas muito finas e/ou fundidas, o que dificultou sua correta observação por microscopia de luz (BELLI et al, 2006; MAI et al, 2009).

A coloração é também uma importante característica da parede do oocisto. Muitos dos artigos citam e diferenciam espécies com base na cor da parede, caracterizando como marrom, amarelado, castanho, etc., apesar de em alguns casos ter a visualização alterada pela exposição a conservantes, intensidade luminosa e/ou a escolha do filtro utilizado para a microscopia de luz (NOWELL; HIGGS, 1989). Por outro lado, a diferença de tonalidade entre as duas camadas, considerada como mais escura e mais clara, pode ser uma característica importante em alguns casos (DE SOUZA et al., 2009).

A textura da superfície exterior da parede do oocisto pode variar de lisa à áspera e é considerada uma característica importante; em alguns casos, permite diferenciação entre relatos entre espécies do gênero *Eimeria* (ALBUQUERQUE et al., 2008). Esse recurso é melhor observado, quando o foco no microscópio de luz é colocado sobre a superfície exterior da parede do oocisto. A textura da superfície externa da parede do oocisto de *Isospora* é predominantemente lisa (BERTO et al., 2011a, b). Finalmente, a presença de estruturas protuberantes na superfície exterior do oocisto, descritas como espinhas ou projeções cónicas, foi relatada para algumas espécies (McALLISTER; UPTON, 1989; MODRY, 2006). A parede do oocisto tem importância significativa na delimitação, proteção e resistência no meio exterior, possibilitando o desenvolvimento e a infectividade do coccídio (LEVINE, 1985; SOULSBY, 1987).

A micrópila pode ser definida como uma descontinuidade numa das camadas da parede do oocisto. Esta característica pode ser observada com mais frequência na camada interna. Em algumas espécies a micrópila parece estar coberta por um capuz; o capuz polar, que proporciona uma proteção para regiões descontínuas das camadas. Estas estruturas são comuns em *Eimeria*, sendo raras ou ausentes em outros gêneros (BERTO et al., 2014b). O resíduo no oocisto é uma grande estrutura entre os esporocistos que pode ser formado por uma massa regular compacta ou uma massa irregular de grânulos (MODRY et al., 2005; EL-SHAHOWI et al., 2012); já o grânulo polar, menor que o corpo residual, pode ser observado sempre denso e com formato variável conforme cada uma das espécies observadas.

Os esporocistos possuem estruturas conhecidas como corpo de Stieda e substieda que facilitam a identificação de espécies, pois o tamanho e a forma mostram um padrão característico para cada espécie de *Isospora*; portanto e na maioria dos casos, o desempenho de uma descrição detalhada deve ser suficiente para se chegar ao nível de identificação das espécies. Dada a importância desta estrutura, é recomendado que, sempre que possível, as variações observadas por microscopia óptica para representantes da mesma espécie, devem ser caracterizadas e desenhadas. As possíveis razões para tais variações incluem a posição dos esporozoítos dentro do esporocisto, ou a posição do oocisto e esporocisto sob a lâmina. Neste contexto, essas variações são sutis e podem, eventualmente, ser observadas em esporocistos de um único oocisto. No entanto, se essas variações são evidentes em oocistos distintos, é possível que o hospedeiro apresente duas espécies diferentes (BERTO et al., 2008a-b). De maneira geral variam de formato; podendo ser em forma de mamilo, achatado, arredondado, meia lua, entre outros (BERTO et al., 2014b). A importância do corpo substieda tem sido tradicionalmente associada com as espécies de *Isospora*; no entanto, estudos recentes têm enfatizado o seu valor potencial para o diagnóstico e identificação também em espécies do gênero *Eimeria* (BERTO et al., 2008c, 2009a, 2013a).

O corpo de parastieda raramente tem sido descrito em coccídio. Duszynski (1985), e Duszynski e Wilber (1997), observaram e caracterizaram essa estrutura em *Eimeria parastiedica* Duszynski, 1985 como representando um corpo substieda localizado no lado oposto do oocisto em relação ao corpo Stieda. Mais recentemente, em um estudo de *Eimeria caviae* Flausino et al., 2014, relataram a presença de um corpo de parastieda e considerou-o como uma estrutura semelhante a um corpo de Stieda adicional, localizado na extremidade oposta dos esporocistos, o que impossibilitava a localização das extremidades anterior e posterior do esporocisto (BERTO et al., 2014b).

O resíduo do esporocisto pode ser quantificado relativamente em cada espécie de coccídio e uma descrição dessa estrutura é um componente de maior detalhe das espécies descritas. A estrutura pode aparecer como de forma difusa entre os esporozoítos ou pode formar uma massa compacta de grânulos. Em alguns casos, a massa compacta pode ser rodeada por uma membrana; enquanto em outras espécies, observa-se um padrão distinto, onde os grânulos desenvolvem uma forma característica de anel (BERTO et al, 2009a, b, c, d, 2011a; LOPES et al., 2013a).

As estruturas associadas com o esporozoíto são os corpos refráteis, o núcleo e estrias na superfície externa e anterior da membrana do esporozoíto. Os corpos refráteis podem ser exclusivos para cada esporozoíto ou podem aparecer como um par; um anterior e outro posterior; cuja forma pode ser de alongada à subesférica. O núcleo é geralmente menor do que os corpos refráteis, e localizado na região mediana do esporozoíto (BERTO et al., 2008b, 2009d, 2013b; LOPES et al., 2014). Atualmente, são frequentes descrições de novas espécies de coccídios parasitando Passeriformes. Numa tentativa de organizar esse crescente corpo de informações, Duszynski et al. (1999) reuniram várias espécies de coccídios e seus hospedeiros em um banco de dados chamado “The Coccidia of the World”. Em Passeriformes do Novo Mundo, Berto et al. (2011a) publicaram uma revisão que organiza todas as espécies de coccídios de acordo com suas famílias hospedeiras.

## **2.3.4. Ecologia**

### *2.3.4.1. Transmissão e dispersão*

Tyzzar foi um pioneiro nos estudos sobre a coccidiose nas aves, estabelecendo conceitos sobre a biologia dos coccídios. Nesses estudos, esses organismos foram considerados parasitos monoxenos e das células epiteliais da mucosa intestinal. As descrições dos ciclos de vida foram confirmadas mais tarde nas revisões de Levine (1985) e Ball et al. (1989). Os estudos sobre as espécies do gênero *Eimeria* em Passeriformes eram limitados às descrições de oocistos. Entretanto, há uma escassez de informação em relação aos ciclos de vida desse gênero em Passeriformes (BERTO et al., 2008d, 2009a). Considerando outras ordens de Aves, é reconhecido que a maioria das espécies de *Eimeria* tem ciclos intestinais

(LEVINE, 1985; BALL et al, 1989), no entanto, há algumas exceções, incluindo aquelas observadas em: *Eimeria reichenowi* Yakimoff e Matschoulsky, 1935, e *Eimeria truncata* (RAILLIET; LUCET, 1891) Waiselewski, 1904 (BERTO et al., 2011a).

Em contraste com *Eimeria*, os ciclos de vida das diferentes espécies de *Isospora* em Passeriformes foram relatados com detalhe durante as últimas quatro décadas. Antes de 1966, apenas o ciclo intestinal tinha sido reconhecido; contudo, após os estudos pioneiros de Box (1966, 1967, 1970, 1975, 1977, 1981) e de Levine (1982), a existência de um ciclo extra-intestinal foi confirmado. Essa possibilidade de ciclo foi fortemente inferida a partir da associação proposta entre coccidiose intestinal e formas semelhantes à esporozoítos que tinham sido observadas no baço de pardais, *Passer domesticus* (Linnaeus, 1758) e no fígado de canários *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758) (BOX, 1966, 1967). Observações experimentais subsequentes indicaram que as espécies de *Atoxoplasma* Garnham, 1950, descritos por Garnham, em 1950, parasitando macrófagos de canários, mais provavelmente representavam estádios extra-intestinais de espécies do gênero *Isospora* (BOX, 1970). Anteriormente, em estudos independentes, Lainson (1958, 1959, 1960) referiram a presença do parasito, alocado para *Lankesterella* Labbé, 1899, a partir de gametócitos obtidos das vísceras de pardais, observando que a transmissão ocorreu através do ácaro *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778. Box (1975, 1977, 1981) posteriormente confirmou que as espécies referidas como *Atoxoplasma* e *Lankesterella*, a partir de canários e pardais, não poderia ser transmitida por transfusão de sangue ou ácaros, mas apenas pela ingestão de oocistos do gênero *Isospora*. Assim, a Dra. Edith D. Box é reconhecida por ter associado merogonia extra-intestinal com infecção por *Isospora* (BARTA et al., 2005; BERTO et al., 2011a).

Ao ser notado que o parasito tinha a capacidade de atravessar barreira intestinal e infectar outros tecidos, esse foi reconhecido como *Isospora serini* Aragão, 1933, e que essa espécie deve ser diferenciada de *Isospora canaria* Box, 1975 que mantém ciclo de vida estritamente intestinal (BOX, 1975, 1977, 1981). Essa espécie desenvolve-se no epitélio intestinal e tem períodos, pré-patente e patente, de quatro a cinco dias e duas a três semanas, respectivamente. Em comparação, os esporozoítos de *I. serini* penetram no interior dos macrófagos na lâmina própria do intestino delgado e são transportados para vários órgãos, incluindo aqui o fígado, baço e pulmões, onde cinco merogonias podem ser observadas em fagócitos. Seguindo esse processo, *I. serini* retorna para o intestino em dois modos, isto é, os merozoítos podem penetrar diretamente na mucosa intestinal, ou, alternativamente, após a acumulação de merozoítos nos pulmões, eles podem migrar para dentro do trato digestivo



através da faringe e traquéia. Dentro do intestino, novas merogonias e gametogonias formam novas gerações de oocistos (Box, 1977, 1981). O período patente do ciclo extra-intestinal contrasta com a natureza do ciclo intestinal autolimitante, porque a baixa liberação do parasito a partir de macrófagos promove uma infecção crônica (BOX, 1981). Posteriormente, Milde (1979) sugeriu que as formas extra-intestinais muito provavelmente funcionem como reservatórios, permitindo o retorno de coccídios para o intestino após a infecção.

Na sequência de uma reavaliação do gênero *Atoxoplasma*, Levine (1982) listou 19 espécies, incluindo uma nova combinação *I. serini* como *Atoxoplasma serini* (Aragão, 1933) Levine, 1982. No entanto Box (1966, 1967, 1970, 1975, 1977, 1981) já havia fornecido provas conclusivas de que as formas observadas em leucócitos nas vísceras de Passeriformes foram de fato fases de desenvolvimento de algumas espécies do gênero *Isospora*. Assim, uma vez que tais formas não pertencem a uma espécie distinta, o reconhecimento de *Atoxoplasma* e *Lankesterella* em aves não poderia ser justificado. Esta afirmação foi apoiada pelo trabalho de Boulard et al. (1987), Upton et al. (2001) e, Gill e Paperna (2008). Finalmente, Carreno e Barta (1999), Schrenzel et al. (2005) e de Barta et al. (2005), usando uma combinação de estudos morfológicos e moleculares, confirmaram que espécies de *Isospora* e *Atoxoplasma* estão intimamente relacionadas e que estes gêneros são sinónimas.

Apesar de algumas espécies promoverem fases extras intestinais (BERTO et al. 2011a), normalmente, espécies de *Isospora* estão relacionadas a infecções entéricas, mas podem acometer outros órgãos como rins, fígado e baço. Ao infectarem as células do epitélio intestinal esse parasito promove a destruição das mesmas (GODOY; MATUSHIMA, 2010; VASCONCELOS et al., 2012). Seus oocistos são liberados não esporulados; a esporogonia ocorre no meio ambiente. O ciclo biológico é monóxeno e as formas infectantes penetram nas células epiteliais intestinais onde se multiplicam por merogonia (esquizogonia) e gametogonia. Desenvolvem gametogonia, onde os gamontes se desenvolvem separadamente e o microgametócito produz muitos microgametas (BERTO et al., 2014b).

Os parasitos relatados em Passeriformes do Novo Mundo são altamente relevantes, dado que a transmissão pode ocorrer entre aves simpátricas da mesma família (Duszynski; Wilber, 1997; Berto et al., 2011a). Alguns parasitos foram descritos a partir de Passeriformes que habitam áreas geograficamente isoladas e, assim, permanecem isolados; no entanto, alguns fatores, como migração das aves, o comércio legal ou tráfico de pássaros silvestres (biopirataria) e reintrodução pelos Centros de Triagem de Animais Silvestres pode levar à dispersão de parasitos (BERTO; LOPES, 2013).

No Brasil, os pássaros nativos são protegidos por lei e supervisionados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no entanto, o tráfico ilegal de animais é muito intenso, sendo as aves silvestres pertencentes às ordens Passeriformes e Psittaciformes as mais apreendidas pelas fiscalizações ambientais. Apenas no ano de 2013 o Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS) recebeu 61.990 animais oriundos das ações de fiscalização, resgate ou entrega voluntária de particulares. Os CETAS têm por objetivo, receber, identificar, marcar, triar, avaliar, recuperar, reabilitar e destinar esses animais silvestres, além disso, realizar e subsidiar pesquisas científicas, ensino e extensão (IBAMA, 2015).

O comércio ilegal de animais levou à redução e extinção de algumas espécies de aves em todo o mundo. Além disso, outra consequência é a introdução de novos parasitos, como ocorreu com *Isospora vanriperorum* Levine, 1982, descrita pela primeira vez em cardeais-da-Virgínia *Cardinalis cardinalis* Linnaeus, 1758, porém devido à sua introdução na América do Sul para reprodução em cativeiro, *I. vanriperorum* foi posteriormente relatado em trinca-ferros-verdadeiros *Saltator similis* d'Orbigny e Lafresnaye, 1837 (BERTO; LOPES, 2013).

Além do comércio ilegal de aves, a facilidade de transmissão de espécies *Isospora* entre as aves da mesma família e o grande número de pássaros no Novo Mundo podem garantir uma ampla dispersão destes parasitos na América do Norte, do Sul e Central (BERTO et al., 2011b).

#### 2.3.4.2. Especificidade ao hospedeiro

A transmissão de coccídios do gênero *Isospora* ocorre principalmente por via feco-oral. A especificidade tem sido motivo de diversos questionamentos, principalmente pelo fato da sistemática de Aves ser frequentemente alterada, contudo, compreende-se que esta seja família-específica. Reconhece-se que as espécies do gênero *Isospora* têm maior especificidade aos pássaros, quando comparadas com aquelas do gênero *Eimeria*. Historicamente, descrições de novas espécies no gênero *Isospora* são mais frequentes quando confrontadas ao gênero *Eimeria*, onde as descrições são mais eventuais (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al. 2011a). Esse estudo é baseado no conceito de especificidade intrafamiliar, que permite que novos hospedeiros de gêneros diferentes, mas de mesma família possam albergar as mesmas espécies. Até agora, esse conceito de especificidade

proposto por Duszynski e Wilber (1997) tem sido utilizado em vários estudos de novos hospedeiros entre Passeriformes (BERTO et al., 2010, 2011b; LOPES et al., 2013a, 2013b).

Duszynski e Wilber (1997) sugerem que uma nova espécie de coccídio deve ser comparada pela morfologia e morfometria dos oocistos em detalhe com espécies de coccídios que são características-similares e pertençam à mesma família do hospedeiro. Neste sentido, eles sugerem o conceito de especificidade em nível de Família do hospedeiro, a qual foi reafirmada por Berto et al. (2011a).

#### 2.3.4.3. Dinâmica de eliminação de oocistos

Grulet et al. (1982) descreveram 12 espécies de *Isospora* com base em um exame detalhado da morfologia dos esporocistos e de alguns aspectos dos ciclos de vida. Observações adicionais sobre a biologia destas espécies indicaram que o seu desenvolvimento seguiu um ritmo circadiano, o qual, durante o verão, resultou em uma eliminação abundante dos oocistos durante as últimas horas da tarde (Grulet et al., 1986a, b, c). Em um dos resultados desse estudo foram propostos três padrões de ciclo de vida.

O primeiro padrão tem um período pré-patente de quatro a cinco dias e um período patente de 12 dias. Esse ciclo de vida está limitado às vilosidades do epitélio intestinal e foi considerado semelhante ao descrito para *I. canaria*. O segundo padrão resulta em uma infecção crônica e também é limitado ao intestino. Nesse ciclo de vida, o gametogonia ocorre a cada noite, nas vilosidades intestinais, através de merozoítos que se desenvolveram nas criptas de Lieberkühn. Finalmente, o terceiro padrão também tende a resultar numa infecção crônica devido à intensa merogonia e gametogonia dentro do intestino ao longo de todo o período de 24 horas, com merozoítos formando complexos monocíticos-fagocítico. Esse terceiro ciclo de vida é semelhante ao anteriormente descrito por Box (1981) para *I. serini* (Grulet et al., 1986a, b, c).

Na última década, Brawner e Hill (1999), Dolnik (1999), Hudman et al. (2000), McQuiston (2000) e Brown et al. (2001) confirmaram a presença de um ritmo circadiano, à qual tinha sido previamente sugerido por Grulet et al. (1986a, b, c). Misof, em 2004, também observou uma flutuação diária na eliminação de oocistos em *Turdus merula* Linnaeus, 1758, onde jovens e adultos eliminaram oocistos predominantemente no final tarde. López et al.

(2007) afirmaram que qualquer estudo da prevalência de coccídio em Passeriformes deve ser delineado levando se em conta o ritmo circadiano destes parasitos (BERTO et al., 2011a).

Dolnik (1999), McQuiston (2000), Misof (2004) e Martinaud et al. (2009) propuseram duas hipóteses para explicar a dinâmica de eliminação de oocistos de *Isospora* em Passeriformes. Primeiramente, o período de eliminação dos oocistos poderia corresponder a um pico na atividade alimentar do hospedeiro. Como muitos partilham o mesmo espaço de alimentação, é admitido que oocistos liberados na área de alimentação teria uma maior probabilidade de transmissão após a esporulação (BERTO et al., 2011a; COELHO et al., 2013).

A segunda hipótese baseia-se na resistência de oocistos aos fatores ambientais, tais como temperatura e umidade. É bem reconhecido que a desidratação pode reduzir a infecciosidade de oocistos. Assim, a eliminação dos oocistos no final da tarde, quando as temperaturas são mais baixas e os níveis de umidade são mais elevados, pode representar uma adaptação evitando a desidratação em condições naturais (DOLNIK, 1999; MCQUISTION, 2000; MISOF, 2004; MARTINAUD et al., 2009). Essa hipótese foi recentemente testada usando oocistos de *Isospora turdi* Schwalbach, 1959, um parasito de *T. merula*. Observou-se ainda que a exposição das fezes a luz solar reduziu a capacidade infecciosa dos oocistos. Esses achados indicam fortemente que a eliminação dos oocistos no final da tarde é de fato uma adaptação de proteção contra os efeitos da desidratação e a radiação ultravioleta que resulta na mortalidade de oocistos no ambiente (MARTINAUD et al., 2009).

#### 2.3.4.4. Fatores associados a densidade e morfologia dos oocistos

A intensidade de infecção que se desenvolve na ave pode variar tremendamente (DOLNIK, 2006). Existem pelo menos três fatores que são importantes em aumentar a intensidade de infecção em coccídios de aves silvestres: (1) a frequência de re-infecção (DOLNIK 2002); (2) a infecção com uma dose elevada de oocistos esporulados, que podem levar a uma infecção crônica (DOLNIK, 2002); e (3) a presença de infecções concomitantes, as quais podem enfraquecer o hospedeiro e aumentar a gravidade da infecção (LONG, 1982; VALKIU-NAS, 2004). Todos os três fatores dependem da exposição do hospedeiro às fezes que contêm oocistos esporulados e, portanto, é dependente do forrageamento e hábitos

alimentares das aves. Desta forma, o hábito insetívoro de alguns Passeriformes não favorece a transmissão dos oocistos, como ocorre com aves frugívoras e granívoras.

O fenômeno da periodicidade de eliminação de oocistos foi observado em espécies de *Isospora* em Passeriformes silvestres desde a década de 30, e a maior eliminação ocorreu no final da tarde (BOUGHTON, 1937; DOLNIK, 1999, 2006; BROWN et al., 2001; LÓPEZ et al., 2007; MARTINAUD et al., 2009). No trabalho de Coelho et al. (2013) setenta e três das 220 amostras de trinca-ferros verdadeiros *S. similis*, foram positivas para *Isospora* spp.; apenas 1,8% das amostras coletadas durante a manhã tiveram resultados positivos. No final da tarde, 31,4% das amostras foram positivas. Além disso, a eliminação de oocisto foi quantitativamente maior no final da tarde, com valores de OoPD que alcançaram mais de 3 mil oocistos. Estas aves estavam mantidas em regime de quarentena em um Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), para reabilitação e reintrodução à vida silvestre. Dessa forma, o estresse das condições de confinamento e tratamento justificam o alto valor de OoPD.

De forma semelhante, o trabalho de Vasconcellos et al. (2013) foi realizado com amostras de trinca-ferros verdadeiros *S. similis* de cativeiro coletadas durante uma competição de canto. Neste trabalho, os resultados de OoPD foram classificados em níveis de intensidade de infecção, sendo que cerca de 20% das aves tiveram OoPD superiores a 500 oocistos.

Diferenças entre aspectos morfométricos dos oocistos são relatadas e relacionadas a fatores ambientais desde a década de 80 (FAYER, 1980), e em inúmeros trabalhos, incluindo, *Isospora lacazei* Labbé, 1893 do pardal *P. domesticus*, na província de Córdoba, Espanha (GOMEZ et al., 1982), *Eimeria opimi* Lambert, Gardner, e Duszynski, 1988, de tuco-tucos *Ctenomys* spp., na Bolívia (GARDNER; DUSZYNSKI, 1990), *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 de gansos cinzento *Anser anser* Linnaeus, 1758 (BERTO et al. 2008e), *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 de búfalos domésticos *Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758 (RAMIREZ et al. 2009) e *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2008 de traupídeos na Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil (BERTO et al. 2011b). Vários fatores podem ter influenciado a existência do polimorfismo observado: (1) estresse, (2) nutrição, (3) imunidade do hospedeiro, (4) dose infectante (FAYER 1980, JOYNER 1982), (5) tempo de descarga dos oocistos durante o período patente (DUSZYNSKI, 1971; CATCHPOLE et al., 1975; JOYNER, 1982), e (6) plasticidade fenotípica, quando um coccídeo ativa diferentes fenótipos em resposta ao seu ambiente (PARKER; DUSZYNSKI, 1986; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

O levantamento bibliográfico consistiu num compilamento de dados e informações realizada ao longo de todo o período de desenvolvimento da pesquisa que originou esta tese. Os artigos foram selecionados e analisados através da base de dados "Google Scholar", "PubMed", "SciELO" e "Periódicos Capes".

#### 3.2. LOCAL DE ESTUDO

A localidade selecionada para o desenvolvimento desta tese foi o PNI (22° 15'e 22°30'S; 44°30'e 44°45'O), que está situado nas divisas dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, próximo à Rodovia Presidente Dutra, abrange os municípios de Itatiaia e Resende no Estado do Rio de Janeiro e Bocaina de Minas e Itamonte no Estado de Minas Gerais. Apresenta um relevo caracterizado por montanhas e elevações rochosas, com altitude variando de 600 a 2.791 m, no seu ponto culminante, o Pico das Agulhas Negras. O PNI é uma Unidade de Conservação (UC) de proteção integral e faz parte do Mosaico de Unidades de Conservação da Serra da Mantiqueira, abriga uma grande biodiversidade de Passeriformes que representam uma amostragem das aves brasileiras observadas na Mata Atlântica (ICMBIO, 2018b). O PNI é uma região restrita, ainda preservada, com grande biodiversidade de fauna e flora e ampla diversidade de aves.

Paralelamente ao estudo e coletas realizadas no PNI, foram realizadas outras coletas em determinadas localidades na Região do Médio Paraíba Fluminense. Estas foram em: (1) Cacaria, um pequeno Distrito do Município de Pirai, área que apresenta uma certa preservação, porém seu entorno é bastante urbanizado e explorado pela atividade pecuária; e (2) um fragmento de área de Mata Atlântica no distrito de Santa Rita de Cássia no Município de Barra Mansa.

### 3.3. PONTOS DE CAPTURA DE AVES E COLETA DE AMOSTRAS

As expedições para captura de aves e coleta de amostras fecais foram realizadas nos meses de agosto (22° 26' 19" S, 44° 37' 23" O), novembro (22° 26' 57" S, 44° 36' 25" O) e dezembro (22° 27' 20" S, 44° 36' 28" O) de 2014; março (22° 27' 38" S, 44° 35' 34" O), abril (22° 27' 52" S, 44° 36' 26" O), maio (22° 26' 17" S, 44° 37' 33" O), julho (22° 27' 4" S, 44° 36' 51" O), e novembro (44W 36' 10" 22S 27' 48") de 2015; março (22°19'46.372"S, 44°32'11.319"W), junho (22° 26' 57.872" S, 44° 36' 24.987" O), julho (22° 26' 15.538" S, 44° 18' 33.183" O), e outubro (22° 27' 38.112" S, 44° 35' 34.222" O) de 2016; abril (22° 26' 15.538" S, 44° 18' 33.183" O) (22° 27' 20" S, 44° 36' 28" O), junho (22° 27' 4" S, 44° 36' 51" O), julho (22° 26' 15.538" S, 44° 18' 33.183" O), e novembro (22°26'57.00"S, 44°36'25.00"W) de 2017; maio (22 27 383 S, 44 35 34,3 O), e agosto (22°26'57.00"S, 44°36'25.00"W) de 2018, totalizando dezenove coletas no PNI, além desta localidade, foram realizadas outras três expedições em duas localidades distintas: Cacaria nos meses de agosto e setembro de 2016 (22° 43' 2,64"S; 43°51' 14,46' 'O); e Barra Mansa no mês de julho de 2018 (22°29'48.3"S 44°09'45.0"W). Nos locais de capturas, foram utilizadas redes de neblina com tamanho total de 9m por 3m e 18m por 3m, dimensões de malha de 20mm e 40mm e fixadas em hastes de alumínio do tipo encaixe, objetivando a captura de aves de diversos portes. A frequência de verificação das redes de neblina foi de, aproximadamente, 20 minutos, conduzindo-se em sequência com a retirada manual da ave, minimizando o estresse (NASCIMENTO et al., 1994). As aves foram inicialmente mantidas em sacos de pano e, em seguida, foram identificadas de acordo com os guias de identificação de aves em Campo de Sigrist (2014) e Ridgely et. al. (2015) e fotografadas. Logo após a identificação, as aves foram transferidas para caixas de papelão que são tradicionalmente utilizadas para o comércio de aves de pequeno e médio porte. Estas caixas foram de diferentes dimensões para acondicionar aves de diversos portes e previamente forradas com papel absorvente objetivando-se obter as defecações isoladas para a quantificação de OoPD. Após a obtenção das amostras fecais, as aves foram, em seguida, libertadas no próprio ambiente de capturas. Em média, o tempo de acondicionamento para a defecação variou entre 30min até 60min.

Toda metodologia foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) de nº 45200, 49605 e 54951 e Comissão de Ética CEUA/UFRRJ protocolos IV-036/2014, IB-008/2015 e IV-6606250616 (ANEXOS).

### 3.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras fecais obtidas foram transportadas em tubos cônicos de centrífuga com capacidade de 15ml, contendo uma defecação inteira diluída em solução aquosa de Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 2,5% a 1:6 (v/v), possibilitando a manutenção dos oocistos. As mesmas foram transportadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC), no Departamento de Biologia Animal (DBA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

No laboratório, as amostras foram mantidas nos tubos cônicos de centrífuga e solução de  $K_2Cr_2O_7$  em temperatura ambiente. Para garantir a esporulação dos oocistos, os tubos foram abertos e homogeneizados assegurando constante presença de oxigênio atmosférico por um período mínimo de 10 dias.

Após a esporulação dos oocistos, utilizou-se a técnica modificada de flutuação com solução saturada de sacarose à 1,23 g/ml, via centrifugação (10min/2.000 rpm) descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynski e Wilber (1997), onde os oocistos foram separados das fezes e do  $K_2Cr_2O_7$ . Nesta metodologia, a solução foi suspensa em água destilada, homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos, possibilitando a retirada do excesso de  $K_2Cr_2O_7$ . Após esse procedimento, o sedimento foi novamente suspenso, homogeneizado e centrifugado em solução saturada de sacarose por mais 10 minutos. Em seguida, o conteúdo do tubo foi elevado com solução saturada de sacarose até o limite da abertura do tubo formando um menisco convergente, onde foi depositada uma lamínula de 24 x 24 mm durante 15 minutos; depois deste período, a lamínula foi retirada e colocada cuidadosamente na superfície de uma lâmina de vidro para visualização ao microscópio.

### 3.5. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DEPOSITADAS NO LABICOC/UFRRJ

Objetivando comparações morfológicas e moleculares específicas com oocistos identificados no trabalho presente, foram requeridos oocistos em Etanol a 70% e as medidas originais de *I. sagittulae* de *O. salvini* e *W. poecilinotus* identificados em Berto et al. (2014a), os quais foram depositados na Coleção Parasitológica do LABICOC (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) na UFRRJ sob o número de repositório 52/2014.



## 3.6. ESTUDO DOS OOCISTOS

### 3.6.1 Visualização e fotomicrografia dos oocistos

A visualização e as fotomicrografias foram realizadas utilizando microscópio binocular Olympus BX (Olympus Ótico, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), em objetiva de 100X com de óleo de imersão.

### 3.6.2. Quantificação dos oocistos

A quantificação foi realizada com base na metodologia de Dolnik (2006) e Dolnik et al. (2010), onde a contagem dos oocistos é feita a partir de uma defecação inteira. A lamínula foi observada criteriosamente para quantificação. Esse método promove a densidade por meio da quantificação de OoPD. O método facilita a investigação em campo e, principalmente, com pássaros que defecam quantidades muito pequenas de fezes, insuficientes para alcançar 1g. Ainda de acordo com estes mesmos autores, além de López et al. (2007), Morin-Adeline et al. (2011) e Pap et al. (2011), as amostras consideradas para os estudos de prevalência foram apenas aquelas coletadas no período da tarde (entre 13h e 18h), sendo as demais apenas utilizadas para estudos comparativos. Isto deve-se ao fato dos coccídios de pássaros possuírem ritmo circadiano de eliminação de oocistos, tendendo a eliminar maior quantidade de oocistos nas últimas horas do dia.

### 3.6.3. Identificação das espécies

Para identificação dos oocistos recuperados utilizou-se como base as diretrizes e estudos morfológicos e morfométricos destacados por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014b) que auxiliam na classificação dos oocistos esporulados de coccídios. Assim, em cada oocisto esporulado procurou-se observar e mensurar, em micrometros ( $\mu\text{m}$ ), as seguintes estruturas morfológicas: diâmetros maior (DM) e menor (dm) do oocisto; diâmetros maior (EM) e menor (em) do esporocisto; altura e largura dos corpos de Stieda (CS), substieda

(CSS) e parastieda (CPS); índices morfométricos (diâmetro maior/diâmetro menor) do oocisto (IM) e do esporocisto (IME); espessura da parede do oocisto (PO); presença e ausência de micrúpila (M), grânulo polar (GP), resíduo do oocisto (RO), resíduo do esporocisto (RE) e corpos refrateis (CR) e núcleo (N) nos esporozoítos (Figura 2).

#### **3.6.4. Identificação de novos hospedeiros**

Após a identificação de uma espécie de coccídio, caso essa não tenha sido previamente descrita nesse hospedeiro, este se torna um novo hospedeiro. Entretanto, este novo hospedeiro deve pertencer à mesma família do hospedeiro cujo coccídio foi descrito originalmente, senão, este parasitismo não é família-específico conforme Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2011a).

#### **3.6.5. Desenho dos oocistos**

Os oocistos identificados em nível de espécie foram esquematizados e editados digitalmente através dos programas de editoração gráfica CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, versão 11.0, Corel Corporation, Canadá), especificamente o Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT.

### **3.7. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA**

#### **3.7.1. Análise de variância (ANOVA)**

Para comparação entre as medidas dos diâmetros maiores e menores e índices morfométricos dos oocistos e esporocistos recuperados de diferentes amostras utilizou-se o pacote estatístico Bioestat na versão 5.0 (AYRES et al., 2007), com nível de significância de  $p < 0,05$ , para calcular as médias, variâncias, graus de liberdade e valor de “p” (SAMPAIO, 2002; BERTO et al., 2014b).

### 3.7.2. Regressão linear

A análise de regressão linear simples objetivou avaliar as medidas do diâmetro menor (dm) sobre as medidas do diâmetro maior (DM) de oocistos e esporocistos esporulados. Nos casos em que hospedeiros de espécies diferentes eliminaram oocistos de mesma espécie, as regressões foram realizadas de maneira individual para cada hospedeiro, entretanto os gráficos foram sobrepostos para melhor visualização. O método e as interpretações concordam com Norton e Joyner (1981), Sampaio (2002) e Berto et al. (2014b) onde as medidas de dm foram organizadas na reta Y e as medidas de DM na reta X. Os gráficos com os resíduos, bem como os coeficientes de inclinação das retas de regressão foram obtidos através do software Microsoft Excel 2010®.

## 3.8. AVALIAÇÃO MOLECULAR

### 3.8.1 Análises moleculares

Sempre que possível, de um até 20 (no máximo) oocistos com morfologia equivalentes em uma amostra foram isolados através do método de Dolnik et al. (2009a). Após isolamento em lâmina, esse(s) oocisto(s) foi(ram) ressuspensão(s) em PBS, e lavado(s) por centrifugação até o sobrenadante tornar-se claro. O DNA foi extraído dos oocistos purificados utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue *Kit* (Qiagen, São Paulo, Brazil) de acordo com instruções do fabricante. Objetivando a quebra dos oocistos, quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração do DNA. A amplificação do gene da subunidade 1 da citocromo *c* oxidase (COI) foi realizada por nested-PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009a) e Yang et al. (2015). Os iniciadores externos COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') e COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produziram um produto com tamanho de 302 pares de bases. Os iniciadores internos COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3 ') e COIbR2 (5'-ATA GTA TGTATCATG TAR WGC AA-3') produziram um produto amplificado com 257 pares de bases. A reação de PCR continha 10 µl de 5× Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de 10 mM dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 unidades de DNA polimerase

GoTaq®, 3 µl de DNA (para a reação primária) ou 3 µl de produto primário de PCR (para a reação secundária) e 30,8 µL de H<sub>2</sub>O. As reações primária e secundária de PCR foram realizadas usando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30s, 47°C por 45 s e 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos amplificados do segundo ciclo de PCR foram purificados usando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). Todos os produtos do PCR foram sequenciados usando iniciadores direto e reverso Ludwig Biotechnology, onde um analisador genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi usado para o sequenciamento. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados pelo software Chromas 2.6. Essas análises foram realizadas em parceria com a Prof. Viviane Moreira de Lima do Laboratório de Atividade Genotóxica de Plantas (LAGeP) do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **3.8.2. Análises das sequências**

As novas sequências geradas foram comparadas com *Isospora* spp. e outros parasitos coccidianos disponíveis no banco de dados do GenBank usando o “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST). Árvores filogenéticas foram construídas para *Isospora* spp. sequenciadas pelo gene COI com isolados adicionais do GenBank. Análises de alinhamento e parcimônia foram conduzidas usando o software MEGA versão 7 (MEGA 7) (TAMURA et al., 2007). A história evolutiva foi inferida utilizando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ), “Maximum Likelihood” (ML) e “Maximum Parsimony” (MP) e as distâncias foram calculadas usando o método Método de Tamura-Nei, baseando-se no modelo de seleção “ModelTest” no MEGA 7. Análises de “Bootstrap” foram realizadas com 1000 réplicas para avaliar a confiabilidade de topologias de árvores inferidas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. AVES CAPTURADAS E AMOSTRAS EXAMINADAS

Em quatro anos de expedições (de agosto/14 a agosto/18) foram capturadas e identificadas 204 aves da ordem Passeriformes, pertencentes as famílias Thamnophilidae, Conopophagidae, Tyrannidae e Icteridae no PNI. A ordem Passeriformes foi a mais representativa em número de espécies. Desse total de aves capturadas a família Thamnophilidae obteve uma representatividade de 49,1%; 100/204, já a família Tyrannidae obteve 43,6%; 89/204, seguidas das famílias Icteridae com 3,9%; 8/204; e Conopophagidae com 3,4%; 7/204.

A presença dessas aves na área de Mata Atlântica no PNI, pode estar associada ao hábito alimentar insetívoro, o qual é predominante entre essas famílias do presente estudo (SICK, 1997). A maioria das trilhas de captura e coleta das aves tinha em seu entorno muitas árvores da Mata Atlântica, que foram reflorestadas, assim como havia muitos insetos, tais como formigas de correição favorecendo o hábito alimentar dessas espécies.

Após a coleta e processamento das amostras das 204 aves, pôde-se observar coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* em algumas delas. Observou-se que as aves capturadas encontravam se aparentemente saudáveis, incluindo aquelas parasitadas por coccídios. A totalidade de aves capturadas e identificadas, assim como as prevalências de aves positivas, por famílias e espécies, podem ser visualizadas na tabela 1.

### 4.2. DISTRIBUIÇÃO DOS COCCÍDIOS NAS FAMÍLIAS DE AVES

Das 4 diferentes famílias de aves cujos espécimes foram capturados e identificados no PNI, todas foram positivas para coccídios, e eliminaram oocistos dos gêneros *Isospora* ou *Eimeria*.

**Tabela 1.** Prevalência de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* de aves silvestres capturadas no PNI.

Famílias/ Espécies / Nomes comuns		Amostras		
		Positivo	Negativo	Total
<b>Thamnophilidae</b>				
Espécie	Nome comum			
<i>Drymophila ferruginea</i> (Temminck, 1822)	trovoada	0	6	6
<i>Dysithamnus mentalis</i> (Temminck, 1823)	choquinha-lisa	11	26	37
<i>Mackenziaena leachii</i> (Such, 1825)	borralhara-assobiadora	0	1	1
<i>Mackenziaena severa</i> (Lichtenstein, 1823)	borralhara	0	1	1
<i>Myrmoderus loricatus</i> (Lichtenstein, 1823)	formigueiro-assobiador	0	2	2
<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1818)	papa-taoca-do-sul	29	12	41
<i>Rhopias gularis</i> (Spix, 1825)	choquinha-de-garganta-pintada	0	12	12
Subtotais:		<b>40</b>	<b>60</b>	<b>100</b>
<b>Tyrannidae</b>				
Espécies	Nome comum			
<i>Attila rufus</i> (Vieillot, 1819)	capitão-de-saíra	0	3	3
<i>Capsiempis flaveola</i> (Lichtenstein, 1823)	marianinha-amarela	0	1	1
<i>Colonia colonus</i> (Vieillot, 1818)	viuvinha	0	3	3
<i>Corythopis delalandi</i> (Lesson, 1831)	estalador	0	8	8
<i>Elaenia parvirostris</i> Pelzeln, 1868	guaracava-de-bico-curto	1	0	1
<i>Knipolegus cyanirostris</i> (Vieillot, 1818)	maria-preta-de-bico-azulado	1	1	2
<i>Knipolegus nigerrimus</i> (Vieillot, 1818)	maria-preta-de-garganta-vermelha	0	1	1
<i>Lathrotriccus euleri</i> (Cabanis, 1868)	enferrujado	5	3	8
<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi, 1846	cabeçudo	9	2	11
<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis, 1846	abre-asa-de-cabeça-cinza	0	11	11
<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	maria-cavaleira	0	1	1
<i>Myiarchus swainsoni</i> Cabanis & Heine, 1859	irré	0	1	1
<i>Phyllomyias griseocapilla</i> Sclater, 1862	piolhinho-serrano	0	1	1
<i>Phylloscartes difficilis</i> (Ihering & Ihering, 1907)	estalinho	1	0	1
<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	bem-te-vi	0	1	1
<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot, 1818	patinho	9	15	24
<i>Ramphotrigon megacephalum</i> (Swainson, 1835)	maria-cabeçuda	1	0	1
<i>Serpophaga nigricans</i> (Vieillot, 1817)	joão-pobre	0	1	1
<i>Tolmomyias poliocephalus</i> (Taczanowski, 1884)	bico-chato-de-cabeça-cinza	0	1	1
<i>Tolmomyias sulphurescens</i> (Spix, 1825)	bico-chato-de-orelha-preta	6	2	8
Subtotais:		<b>33</b>	<b>56</b>	<b>89</b>
<b>Conopophagidae</b>				
Espécies	Nome comum			
<i>Conopophaga lineata</i> (Wied, 1831)	chupa-dente	1	1	2
<i>Conopophaga melanops</i> (Vieillot, 1818)	cuspidor-de-máscara-preta	2	3	5
Subtotais:		<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
<b>Icteridae</b>				
Espécies	Nome comum			
<i>Cacicus haemorrhous</i> (Linnaeus, 1766)	guaxe	8	0	8
Subtotais:		<b>8</b>	<b>0</b>	<b>8</b>
<b>Total (Prevalência):</b>		<b>84 (41%)</b>	<b>120</b>	<b>204</b>

A maior prevalência de positivos foi observada na família Icteridae (100%; 8/8), seguida das famílias Conopophagidae (42,9%; 3/7), Thamnophilidae (40%; 40/100), e Tyrannidae (37%; 33/89). Nas famílias de Passeriformes cujo habito alimentar é insetívoro foram observadas prevalências mais baixas, como por exemplo em Conopophagidae e

Thamnophilidae. A família Tyrannidae apresenta um hábito alimentar insetívoro em sua maioria, porém há algumas espécies que se alimentam tanto de insetos, frutos, anfíbios, peixes, e etc..., sendo considerados onívoros. A família Icteridae têm o hábito de alimentação onívoro, se alimenta de insetos, artrópodes, pequenos vertebrados, néctar e frutos, o que deve estar relacionado às maiores prevalências observadas. Coccídios dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* têm transmissão fecal-oral e, neste sentido, o hábito de se alimentar e defecar na mesma localidade, que são características desse hábito alimentar, deve favorecer a transmissão e, conseqüentemente, maior prevalência nessa família. Por outro lado, famílias de aves predominantemente insetívoras são geralmente negativas para coccídios ou têm baixa prevalência (DOLNIK et al., 2010).

Ao analisar as capturas pertencentes as quatro famílias de pássaros, verificou-se que as famílias Thamnophilidae e Tyrannidae obtiveram uma maior representatividade em número de espécimes e espécies em relação às famílias Conopophagidae e Icteridae, com 7 espécimes pertencentes a 2 espécies distintas, e 8 espécimes pertencentes a uma única espécie, respectivamente. Na família Thamnophilidae observou-se uma maior quantidade de espécimes capturados, num total de 100/204, chegando a quase metade do total de pássaros capturados, no entanto, houve pouca diversidade de espécies nesta família (7 espécies diferentes), porém, na família Tyrannidae aconteceu algo diferente, ao todo foram capturados um total de 89/204 espécimes, um número bem representativo, mas ao contrário dos taminofilídeos, houve uma grande diversidade de espécies; foram 20 espécies distintas no seu total. Essa variedade de espécies se deve ao fato desta família ser a maior entre os suboscines das Américas e a maior do Brasil, que ocupam todos os tipos de ambiente, desde floresta e cerrados, até ambientes abertos, lacustres e montanhosos (SIGRIST, 2009).

#### **4.2.1. Família Thamnophilidae**

Neste trabalho foram capturadas sete diferentes espécies de taminofilídeos: trovoadá *D. ferrugínea*; choquinha-lisa *D. mentalis*; borralhara-assobiadora *M. leachii*; borralhara *M. severa*; formigueiro-assobiador *M. loricatus*; papa-taoca-do-sul *P. leucoptera*; e choquinha-de-garganta-pintada *R. gularis*. Destas apenas as espécies *D. mentalis* e *P. leucoptera* foram positivas para coccídios do gênero *Isospora* ou *Eimeria* (Tabela 2).

Nas amostras fecais de vinte três taminofilídeos capturados foram recuperados e observados oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. parnaitataiensis* espécie descrita originalmente parasitando *P. leucoptera* no PNI; e outros dezessete taminofilídeos capturados positivos para oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. sagittulae*, espécie descrita originalmente parasitando o *H. naevioides* no Equador.

Alguns taminofilídeos capturados eliminaram oocistos de espécies do gênero *Isospora* e *Eimeria* ao qual a morfologia observada não foi compatível com nenhuma espécie de *Isospora* e *Eimeria* descritas de *Thamnophilidae*. Dessa forma, essas espécies foram nomeadas como *Isospora* morfotipo 1, e *Eimeria* morfotipo 1, e deverá ser considerada como novas espécies após descrição taxonômica detalhada, e publicada em um periódico científico.



**Tabela 2.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de Thamnophilidae em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.

Amostras dos hospedeiros <sup>a</sup>	Data da coleta	Identificação e OoPD específicos <sup>b</sup>				OoPD total <sup>c</sup>		
		<i>Isospora parnaitataiensis</i>	<i>Isospora sagittulae</i>	<i>Eimeria</i> Morfotipo 1	<i>Isospora</i> Morfotipo 1			
PI	I A	22/08/2014	0	0	0	0	0	
	I B	22/08/2014	41	17	0	0	58	
	II A	18/12/2014	0	0	7	0	7	
	III	A	02/03/2015	0	2	0	0	2
		B		0	0	0	0	0
		C		0	0	0	0	0
	IV	A	02/03/2015	0	0	0	0	0
		B		0	25	0	0	25
		C		0	0	0	0	0
	V	A	02/03/2015	147	589	0	0	736
		B		3	11	0	0	14
		C		4	14	0	0	18
	VI A	02/03/2015	10	0	0	0	10	
	VII	A	14/05/2015	0	116	0	0	116
		B		0	184	0	0	184
VIII	A	06/07/2015	0	5	0	0	5	
	B		0	1	0	0	1	
IX	A	25/07/2016	2	0	0	0	2	
	B		0	0	0	0	0	
X	A	25/07/2016	0	0	0	0	0	
	B		0	0	0	0	0	
	C		0	6	0	0	6	
XI	A	13/10/2016	0	2	38	0	40	
	B		0	1	4	0	5	
	C		0	1	11	0	12	
XII	A	13/10/2016	1	0	1	0	2	
	B		1	0	5	0	6	
XIII A	13/10/2016	1.694	770	616	0	3.080		
XIV	A	27/04/2017	1	3	1	0	5	
	B		0	0	0	0	0	
	C		0	0	0	0	0	
	D		1	3	1	0	5	
XV A	01/06/2017	0	0	0	0	0		

	B		2	0	7	2	<b>11</b>
	C		36	0	107	36	<b>179</b>
	D		1	0	3	1	<b>5</b>
XVI	A	20/07/2017	0	1	0	0	<b>1</b>
	B		0	0	0	0	<b>0</b>
XVII	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B	20/07/2017	2	0	0	0	<b>2</b>
	C		3	0	0	0	<b>3</b>
XVIII	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B	20/07/2017	0	0	0	0	<b>0</b>
	C		0	10	0	0	<b>10</b>
XIX	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B	20/07/2017	4	0	0	0	<b>4</b>
	C		41	0	0	0	<b>41</b>
XX	A	20/07/2017	1	0	0	0	<b>1</b>
XXI	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	0	2	0	<b>2</b>
	C	10/11/2017	0	0	0	0	<b>0</b>
	D		0	0	0	0	<b>0</b>
	E		0	0	3	0	<b>3</b>
XXII	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	1	0	0	<b>1</b>
	C		0	0	0	0	<b>0</b>
	D	10/11/2017	0	0	0	0	<b>0</b>
	E		0	0	0	0	<b>0</b>
	F		0	0	0	0	<b>0</b>
	G		0	0	0	0	<b>0</b>
XXIII	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	2	2	0	<b>4</b>
	C		0	2	1	0	<b>3</b>
	D	10/11/2017	0	30	31	0	<b>61</b>
	E		0	10	10	0	<b>20</b>
	F		0	1	1	0	<b>2</b>
	G		0	0	0	0	<b>0</b>
XXIV	A		4	1	1	0	<b>4</b>
	B		2	0	0	0	<b>2</b>
	C	18/05/2018	16	2	2	0	<b>20</b>
	D		1	1	1	0	<b>3</b>
	E		0	0	0	0	<b>0</b>
	F		50	6	6	0	<b>62</b>
XXV	A	18/05/2018	0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	1	0	0	<b>1</b>

	C		0	0	0	0	0	
	D		0	3	0	0	3	
	E		0	5	0	0	5	
	F		0	37	0	0	37	
<hr/>								
XXVI	A		42	0	0	0	42	
	B	28/08/2018	0	0	0	0	0	
	C		0	0	0	0	0	
<hr/>								
XXVII	A		0	0	0	0	0	
	B		0	1	0	0	1	
	C	28/08/2018	0	0	0	0	0	
	D		0	0	0	0	0	
	E		0	0	0	0	0	
	F		0	0	0	0	0	
<hr/>								
XXVIII	A		0	0	0	0	0	
	B	28/08/2018	2	0	0	0	2	
	C		54	0	0	0	54	
	D		0	0	0	0	0	
<hr/>								
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>14</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>1</b>		
<hr/>								
<i>Dm</i>	I	A	20/11/2014	42	0	0	0	42
	II	A	02/03/2015	48	0	0	0	48
		B		1	0	0	0	1
	III	A		0	0	0	0	0
		B		2	0	16	0	18
		C	13/10/2016	1	0	11	0	12
		D		0	0	0	0	0
		E		0	0	0	0	0
	IV	A		0	0	0	0	0
		B		0	0	0	0	0
		C	01/06/2017	0	0	0	0	0
		D		0	0	0	0	0
		E		4	0	0	0	4
		F		34	0	0	0	34
	V	A		494	0	0	0	494
		B	10/11/2017	112	0	0	0	112
		C		638	0	0	0	638
		D		803	0	0	0	803
	VI	A	10/11/2017	8.617	0	0	0	8.617
	VII	A		0	0	1	0	1
		B	10/11/2017	0	0	0	0	0
		C		0	0	1	0	1
		D		0	0	3	0	3

VIII	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	0	1	0	<b>1</b>
	C	28/08/2018	0	0	1	0	<b>1</b>
	D		0	0	0	0	<b>0</b>
	E		0	0	0	0	<b>0</b>
IX	A		5.821	0	0	0	<b>5.821</b>
	B		8	0	0	0	<b>8</b>
	C	28/08/2018	27	0	0	0	<b>27</b>
	D		28	0	0	0	<b>28</b>
X	A		0	0	0	0	<b>0</b>
	B		0	0	0	0	<b>0</b>
	C	28/08/2018	0	0	0	0	<b>0</b>
	D		3	0	0	0	<b>3</b>
	E		0	0	0	0	<b>0</b>
XI	A		289	0	0	0	<b>289</b>
	B	28/08/2018	190	0	0	0	<b>190</b>
	C		5	0	0	0	<b>5</b>
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>9</b>	<b>3</b>			
<b>Total de oocistos<sup>e</sup>:</b>			<b>19.333</b>	<b>1.864</b>	<b>895</b>	<b>39</b>	
<b>Total de positivos<sup>f</sup>:</b>			<b>23</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	

aOrdem cronológica a qual as amostras foram coletadas por hospedeiro, *Pyriglena leucoptera* (Pl) e *Dysithamnus mentalis* (Dm). Algarismos romanos representam o espécime hospedeiro e as letras suas respectivas amostras.

bQuantidade de oocistos por espécie em uma única defecação.

cQuantidade de oocistos total em uma única defecação.

dTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio (parcial, por espécie hospedeira).

eTotal de oocistos observados por espécie de coccídio.

fTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio.

#### 4.2.2. Família Tyrannidae

Neste estudo foram capturadas vinte diferentes espécies de tiranídeos: capitão-de-saíra *A. rufus*; marianinha-amarela *C. flaveola*; viuvinha *C. colonus*; estalador *C. delalandi*; guaracava-de-bico-curto *E. parvirostri*; maria-preta-de-bico-azulado *K. cyanirostris*; maria-preta-de-garganta-vermelha *K. nigerrimus*; enferrujado *L. euleri*; cabeçudo *L. amaurocephalus*; abre-asa-de-cabeça-cinza *M. rufiventris*; maria-cavaleira *M. ferox*; irré *M. swainsoni*; piolhinho-serrano *P. griseocapilla*; estalinho *P. difficilis*; bem-te-vi *P. sulphuratus*; patinho *P. mystaceus*; maria-cabeçuda *R. megacephalum*; joão-pobre *S. nigricans*; bico-chato-de-cabeça-cinza *T. poliocephalus*; e bico-chato-de-orelha-preta *T. sulphurescens*, desta apenas as espécies *E. parvirostris*; *K. cyanirostris*; *L. euleri*; *L. amaurocephalus*; *P. difficilis*; *P. mystaceus*; *R. megacephalum*; *T. sulphurescens* foram positivas para coccídios do gênero *Isospora* ou *Eimeria* (Tabela 3).

Nas amostras fecais de sete tiranídeos capturados foram recuperados e observados oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. attilae* espécie descrita originalmente parasitando *A. rufus* na Ilha da Marambaia; outros cinco tiranídeos capturados positivos para oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. lopesi*, espécie descrita originalmente parasitando *P. mystaceus* no PNI.

Alguns tiranídeos capturados eliminaram oocistos de espécies do gênero *Isospora* e *Eimeria* cujas morfologias observadas nestes oocistos não foram compatíveis com nenhuma espécie de *Isospora* e *Eimeria* descritas de Tyrannidae. Dessa forma, essas espécies foram nomeadas como *Isospora* morfotipo 1, *Isospora* morfotipo 2, *Isospora* morfotipo 3, *Isospora* morfotipo 4, *Isospora* morfotipo 5, *Eimeria* morfotipo 1, e deverão ser consideradas como novas espécies após descrições taxonômica detalhadas, e publicadas em um periódico científico.

**Tabela 3.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de Tyrannidae em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.

Amostras dos hospedeiros <sup>a</sup>	Data da coleta	Identificação e OoPD específicos <sup>b</sup>									OoPD total <sup>c</sup>			
		<i>Isospora</i> Morfotipo	<i>Isospora</i> Morfotipo	<i>Isospora</i> Morfotipo	<i>Isospora</i> Morfotipo	<i>Isospora</i> Morfotipo	<i>Eimeria</i> Morfotipo	<i>Isospora</i> <i>atillae</i>	<i>Isospora</i> <i>lopesi</i>					
		1	2	3	4	5	1							
<i>Ep</i>	I	A	08/04/2015	97	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>97</b>	
		B		96	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>96</b>	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>				<b>1</b>										
<i>Kc</i>	I	A	20/07/2017	0	0	0	0	0	25	0	0	0	<b>25</b>	
		B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
		C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>								<b>1</b>						
<i>Le</i>	I	A	18/12/2014	2.136	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>2.136</b>	
		B		104	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>104</b>	
	II	A	13/10/2016	0	0	0	0	0	0	1.382	0	0	<b>1.382</b>	
	III	A	13/10/2016	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>	
	IV	A	20/07/2017		0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		B			0	0	0	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>
		C			0	0	0	0	0	0	62	0	0	<b>62</b>
		D			0	0	0	0	0	0	312	0	0	<b>312</b>
	V	A	28/08/2018		0	0	0	0	0	6	0	0	0	<b>6</b>
		B			0	0	0	0	0	83	0	0	0	<b>83</b>

	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>1</b>				<b>2</b>	<b>2</b>					
<i>La</i>	I	A	0	1	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	
		B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	
		C	18/12/2014	0	4	0	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
		D		0	7	0	0	0	0	0	0	0	<b>7</b>
	II	A	02/03/2015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		B		0	0	28	0	0	0	0	0	0	<b>28</b>
	III	A	08/04/2015	0	0	1	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
		B		0	0	2	0	0	0	0	0	0	<b>2</b>
	IV	A	13/10/2016	0	0	6	0	0	0	0	0	0	<b>6</b>
		B		0	0	447	0	0	0	0	0	0	<b>447</b>
	V	A	13/10/2016	0	0	2	0	0	0	0	0	0	<b>2</b>
	VI	A	01/06/2017	0	0	4	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
		B		0	0	109	0	0	0	0	0	0	<b>109</b>
	VII	A		0	0	81	0	0	0	0	0	0	<b>81</b>
		B		0	0	29	0	0	0	0	0	0	<b>29</b>
		C	10/11/2017	0	0	6	0	0	0	0	0	0	<b>6</b>
		D		0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	VIII	A	10/11/2017	0	0	70	0	0	0	0	0	0	<b>70</b>
	IX	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		B		0	0	74	0	0	0	0	0	0	<b>74</b>
C		28/08/208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
D			0	0	35	0	0	0	0	0	0	<b>35</b>	
E			0	0	8	0	0	0	0	0	0	<b>8</b>	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>1</b>	<b>8</b>									

<i>Pd</i>	A		0	0	2	0	0	0	0	0	<b>2</b>	
	I	B	20/07/2017	0	0	19	0	0	0	0	<b>19</b>	
		C		0	0	100	0	0	0	0	<b>100</b>	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>					<b>1</b>							
<i>Pm</i>	A			0	0	0	0	0	0	0	1.952	<b>1.952</b>
	I	B	02/03/2015	0	0	0	0	0	0	0	466	<b>466</b>
		C		0	0	0	0	0	0	0	3.220	<b>3.220</b>
		A		0	0	0	0	0	0	0	96	<b>96</b>
	II	B	21/03/2016	0	0	0	0	0	0	0	35	<b>35</b>
		C		0	0	0	0	0	0	0	891	<b>891</b>
		D		0	0	0	0	0	0	0	420	<b>420</b>
	III	A	25/07/2016	0	0	0	0	0	0	69	0	<b>69</b>
	IV	A	13/10/2016	0	0	0	0	0	0	0	161	<b>161</b>
		B		0	0	0	0	0	0	0	161	<b>161</b>
	V	A	13/10/2016	0	0	15	0	0	0	0	0	<b>15</b>
		B		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		A		0	0	0	0	0	0	209	834	<b>1.043</b>
		B		0	0	0	0	0	0	13	51	<b>64</b>
	VI	C	01/06/2017	0	0	0	0	0	0	434	1.737	<b>2.171</b>
		D		0	0	0	0	0	0	13	53	<b>66</b>
		E		0	0	0	0	0	0	190	758	<b>948</b>
		F		0	0	0	0	0	0	259	1.038	<b>1.297</b>
	VII	A		0	0	0	0	0	0	4	0	<b>4</b>
		B	20/07/2017	0	0	0	0	0	0	226	0	<b>226</b>
		C		0	0	0	0	0	0	4.814	0	<b>4.814</b>



	D		0	0	0	0	0	0	5.429	0	<b>5.429</b>	
	A		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	B		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	C		0	0	0	0	0	0	6	0	<b>6</b>	
VIII	D	18/05/2018	0	0	0	0	0	0	21	0	<b>21</b>	
	E		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	F		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	G		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	A		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	B		0	0	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>	
IX	C	28/08/2018	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
	D		0	0	0	0	0	0	0	23	<b>23</b>	
	E		0	0	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>	
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>1</b>					<b>4</b>	<b>5</b>			
<i>Rm</i>	I	A	20/07/2017	0	0	0	0	0	0	90	0	<b>90</b>
		B		0	0	0	0	0	0	13	0	<b>13</b>
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>1</b>									
<i>Ts</i>	I	A		0	0	0	0	0	4	0	0	<b>4</b>
		B	02/03/2015	0	0	0	0	0	8	0	0	<b>8</b>
		C		0	0	0	0	0	380	0	0	<b>380</b>
		D		0	0	0	0	0	58	0	0	<b>58</b>
	II	A		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		B	10/11/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		C		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		D		0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>

	E		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F		0	0	0	0	85	0	0	0	85
III	A		0	0	0	0	1.591	0	0	0	1.591
	B	10/11/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C		0	0	0	0	4	0	0	0	4
IV	A		0	0	0	295	0	0	0	0	295
	B	10/11/2017	0	0	0	71	0	0	0	0	71
	C		0	0	0	73	0	0	0	0	73
	D		0	0	0	141	0	0	0	0	141
V	A		0	0	0	0	17	0	0	0	17
	B	28/08/2018	0	0	0	0	4	0	0	0	4
	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D		0	0	0	0	13	0	0	0	13
VI	A		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B		0	0	3	0	0	0	0	0	3
	C	28/08/2018	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F		0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>					<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>			
<b>Total de oocistos<sup>e</sup>:</b>			<b>2.433</b>	<b>13</b>	<b>1.041</b>	<b>580</b>	<b>1.714</b>	<b>565</b>	<b>13.547</b>	<b>11.900</b>	
<b>Total de positivos<sup>f</sup>:</b>			<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	

aOrdem cronológica a qual as amostras foram coletadas por hospedeiro, *Elaenia parvirostris* (Ep), *Knipolegus cyanirostris* (Kc), *Lathrotriccus eulerei* (Le), *Leptopogon amaurocephalus* (La), *Phylloscartes difficilis* (Pd), *Platyrinchus mystaceus* (Pm), *Ramphotrigon megacephalum* (Rm), *Tolmomyias sulphurescens* (Ts). Algarismos romanos representam o espécime hospedeiro e as letras suas respectivas amostras.

bQuantidade de oocistos por espécie em uma única defecação.

cQuantidade de oocistos total em uma única defecação.

dTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio (parcial, por espécie hospedeira).

eTotal de oocistos observados por espécie de coccídio.  
fTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio.

### 4.2.3. Família Conopophagidae

Neste trabalho foram capturadas apenas duas espécies diferentes de conopofagídeos: chupa-dente *C. lineata*; e cuspidor-de-máscara-preta *C. melanops*. As duas espécies capturadas foram positivas para coccídios do gênero *Isospora* (Tabela 4).

Nas amostras fecais recuperadas de um chupa-dente *C. lineata*, e dois exemplares do cuspidor-de-máscara-preta *C. melanops* capturados, foram observados oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. borbai*, o primeiro coccídio relatado para a família Conopophagidae.

**Tabela 4.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de Conopophagidae em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.

Amostras dos hospedeiros <sup>a</sup>	Data da coleta	Identificação e OoPD específicos <sup>b</sup>		OoPD total <sup>c</sup>
			<i>Isospora borbai</i>	
<i>Cl</i>	I	A	489	<b>489</b>
		B	52	<b>52</b>
	<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>1</b>
<i>Cm</i>	I	A	372	<b>372</b>
		A	93	<b>93</b>
	II	B	17	<b>17</b>
		C	0	<b>0</b>
		D	1	<b>1</b>
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>2</b>	
<b>Total de oocistos<sup>e</sup>:</b>			<b>1024</b>	
<b>Total de positivos<sup>f</sup>:</b>			<b>3</b>	

aOrdem cronológica a qual as amostras foram coletadas por hospedeiro, *Conopophaga lineata* (*Cl*) e *Conopophaga melanops* (*Cm*). Algarismos romanos representam o espécime hospedeiro e as letras suas respectivas amostras.

bQuantidade de oocistos por espécie em uma única defecação.

cQuantidade de oocistos total em uma única defecação.

dTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio (parcial, por espécie hospedeira).

eTotal de oocistos observados por espécie de coccídio.

fTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio.

#### 4.2.4. Família Icteridae

Neste trabalho foi capturada apenas uma espécie de icterídeo, o guaxe *C. haemorrhous*; num total de oito exemplares pertencentes a esta espécie. Todos os espécimes capturados foram positivos para coccídios do gênero *Isoospora* (Tabela 5).

Nas amostras fecais de seis guaxes *C. haemorrhous* capturados, foram recuperados e observados oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. guaxi* e outros quatro *C. haemorrhous* capturados foram positivos para oocistos com morfologia idêntica àquela descrita para *I. bellicosa*, espécie descrita originalmente parasitando *L. bellicosus* no Peru (UPTON et al., 1995).

A identificação de *I. bellicosa* em guaxes *C. haemorrhous* neste estudo registra o PNI, RJ, como uma nova localidade para este coccídio e demonstra a ampla distribuição desse coccídio no sudeste do Brasil.

E por último, um espécime de *C. haemorrhous* capturado, eliminou oocistos de uma espécie do gênero *Isoospora* cuja morfologia observada nestes oocistos não foi compatível com nenhuma espécie de *Isoospora* descrita de Icteridae. Dessa forma, essa espécie foi nomeada como morfotipo 1, e deverá ser considerada como nova espécie após descrição taxonômica detalhada, e publicada em um periódico científico.

**Tabela 5.** Identificação e densidade de infecção (OoPD) de coccídios parasitos de Icteridae em um fragmento de Mata Atlântica no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.

Amostras dos hospedeiros <sup>a</sup>	Data da coleta	Identificação e OoPD específicos <sup>b</sup>			OoPD total <sup>c</sup>	
		<i>Isoospora guaxi</i>	<i>Isoospora bellicosa</i>	<i>Isoospora</i> Morfotipo 1		
Ch	I	A	42	0	0	<b>42</b>
		B	246	0	0	<b>246</b>
	II	A	1619	0	0	1619
	III	A	79	449	0	<b>528</b>
	IV	A	0	1	0	<b>1</b>
		B	0	83	0	<b>83</b>
	V	A	1	1	0	<b>2</b>
		B	5	4	0	<b>9</b>

VI	A	03/11/2015	4	0	0	<b>4</b>
	B		2	0	0	<b>2</b>
VII	A	03/11/2015	0	0	87	<b>87</b>
VIII	A	03/11/2015	2	5	0	<b>7</b>
	B		10	30	0	<b>40</b>
<b>Positivos<sup>d</sup>:</b>			<b>6</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	
<b>Total de oocistos<sup>e</sup>:</b>			<b>2.010</b>	<b>573</b>	<b>87</b>	
<b>Total de positivos<sup>f</sup>:</b>			<b>6</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	

aOrdem cronológica a qual as amostras foram coletadas por hospedeiro, *Cacicus haemorrhous* (Ch). Algarismos romanos representam o espécime hospedeiro e as letras suas respectivas amostras.

bQuantidade de oocistos por espécie em uma única defecação.

cQuantidade de oocistos total em uma única defecação.

dTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio (parcial, por espécie hospedeira).

eTotal de oocistos observados por espécie de coccídio.

fTotal de hospedeiros positivos para a espécie de coccídio.

#### 4.3. DENSIDADES DE COCCÍDIOS E PERIODICIDADE DE ELIMINAÇÃO DOS OOCISTOS

Após a contagem dos oocistos das amostras positivas pela técnica de OoPD (DOLNIK, 2016), observou-se nos tiranídeos as maiores densidades foram no patinho *P. mystaceus*, onde foram obtidas amostras com OoPD de 3.220, 4.814 e 5.429; enferrujado *L. euleri* com OoPD de 1.382 e 2.136; e bico-chato-de-orelha-preta *T. sulphurescens*, com OoPD de 1.591. As densidades também foram altas nos taminofilídeos choquinha-lisa *D. mentalis*, onde foram obtidas amostras com OoPD de 5.821 e 8.617; e papa-taoca-do-sul *P. leucoptera* com OoPD de 736 e 3.080. Apesar destas maiores densidades, estas aves foram aparentemente saudáveis. Em verdade, quando comparada à outras famílias com hábito alimentar de onivoria, frugivoria e/ou granivoria, estes valores de OoPD mostram-se baixos, pois conforme mencionado anteriormente, a onivoria, frugivoria e/ou granivoria favorecem a transmissão de coccídios, o que pode estar associado as densidades mais altas (DOLNIK et al., 2010), no entanto o hábito alimentar das espécies mencionadas acima é insetívora. Os horários de maior eliminação dos oocistos foram no período da tarde, entre 13hs e 18h, corroborando os trabalhos descritos na literatura. Em comparação com aves silvestres em ambientes impactados, mantidas em cativeiro ou recuperadas do tráfico ilegal, onde a coccidiose tende a ser severa e as densidades bastante altas (COELHO et al., 2011; BERTO;

LOPES, 2013; GIRAUDEAU et al., 2014; BATISTA et al., 2015), pode-se considerar que as densidades obtidas neste estudo são baixas ou moderadas, e as aves parecem manter uma relação parasito-hospedeiro estável que não alteram suas condições de saúde. Nesse sentido, pode-se considerar que as condições ambientais encontradas no PNI, como: temperatura, umidade, altitude, período de muda e reprodução, pluviosidade, e degradação ambiental podem ter influenciado na distribuição dos coccídios e nos parâmetros de eliminação dos oocistos de diferentes hospedeiros ou de mesmos hospedeiros submetidos às condições ambientais distintas.

#### 4.4. ALGUMAS OBSERVAÇÕES SOBRE A DISTRIBUIÇÃO E DISPERSÃO DE COCCÍDIOS DE PÁSSAROS ICTERÍDEOS NA AMÉRICA DO SUL: *Isospora guaxi* E *Isospora bellicosa* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO GUAXE *Cacicus haemorrhous* (PASSERIFORMES: ICTERIDAE) NO SUDESTE DO BRASIL

O guaxe *C. haemorrhous* pertence à família Icteridae. Ocorre exclusivamente em Florestas neotropicais da região amazônica; sudeste e regiões do centro-oeste do Brasil; Paraguai; nordeste da Argentina; Colômbia; e leste dos Andes (PARKES, 1970; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015; IUCN, 2015). Esta espécie se reproduz em colônias, tecendo ninhos na forma de saco suspenso no final de galhos de árvores (FEEKES, 1981; SICK, 1997).

Espécies da família Icteridae são amplamente distribuídas, mas restritas ao Novo Mundo, com exceções de algumas espécies que vivem na Europa, como o triste-pia *Dolichonyx oryzivorus* (Linnaeus, 1758), a graúna-ferrugínea *Euphagus carolinus* (Müller, 1776), o corrupeirão-de-baltimore *Icterus galbula* (Linnaeus, 1758), o chopim-mulato *Molothrus ater* (Boddaert, 1783) e a graúna-de-cabeça-amarela *Xanthocephalus xanthocephalus* (Bonaparte, 1826) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015; IUCN, 2015).

Semelhante a outras famílias de Passeriformes, os icterídeos podem ser parasitados por coccídios isosporóides. Atualmente, as espécies de *Isospora* recuperadas de Passeriformes dessa família são: (i) *I. divitis* de *P. atroviolacea* em Cuba (PELLÉRDY, 1967); (ii) *I. cacici* do xexéu *C. cela cela* na Amazônia brasileira (LAINSON, 1994); (iii) *I. bellicosa* de *L. bellicosus* no Peru (UPTON et al., 1995); (iv) *I. icterus* de *I. icterus* nos EUA (UPTON;

WHITAKER, 2000); e (v) *I. graceannae* a partir de *I. graceannae* nos EUA (UPTON; WHITAKER, 2000).

Neste contexto, este estudo descreve uma nova espécie de *Isospora* e *I. bellicosa* do guaxe *C. haemorrhous* no PNI no sudeste do Brasil, demonstrando transmissão parasitária entre icterídeos alopátricos que habitam lados opostos dos Andes.

#### 4.4.1 Morfologia de *Isospora guaxi* e *Isospora bellicosa* no sudeste brasileiro

Família Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero *Isospora* Schneider, 1881

- ***Isospora guaxi* Silva & Berto, 2017** (Figuras 3A; 4A-C)

**Hospedeiro tipo:** Guaxe *C. haemorrhous* (Passeriformes: Icteridae).

**Localidade tipo:** Parque Nacional do Itatiaia (22° 27'48"S, 44° 36'10"W), sudeste do Brasil.

**Espécimes tipo:** Os fototipos e os desenhos de linha estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Fotografias dos espécimes do hospedeiro tipo (simbiotipos) foram depositadas na mesma coleção. O número do repositório é P-64/2016.

**Local do hospedeiro:** Desconhecido.

**Prevalência:** 63% (5 de 8 aves infectadas).

**Etimologia:** O epítáfio específico é derivado do nome local comum para o hospedeiro, que é "guaxe".

**Descrição:** Oocistos (n = 18) subesféricos, 28–34 x 27–32 (30,9 x 29,0); relação comprimento/largura (C/L) 1,0–1,1 (1,06). Parede bicamada, 1,8–2,1 (1,9) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Micrópila e resíduo do oocisto ambos ausentes; único grânulo polar presente. Esporocistos (n = 17) elipsoides, 17–21 x 12–15 (19,3 x 13,8); relação C/L 1,3–1,6 (1,41). Corpo de Stieda presente em forma de botão, 1,0 de altura, 2,0 de largura; corpo de substieda presente, proeminente e compartimentalizado com porção densa e



central, arredondada ou irregular, 2,5 de altura, 2,0 de largura e uma parte pálida, arredondada ou trapezoidal, 3,0 de altura, 4,0 de largura; corpo de parastieda ausente. Resíduo do esporocisto presente, composto por muitos grânulos dispersos de tamanhos diferentes. Esporozoíto vermiforme com corpo refractário posterior único e núcleo centralmente localizado.

- ***Isospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995** (Figuras 3B; 4D – F)

**Hospedeiro:** Guaxe *C. haemorrhous* (Passeriformes: Icteridae).

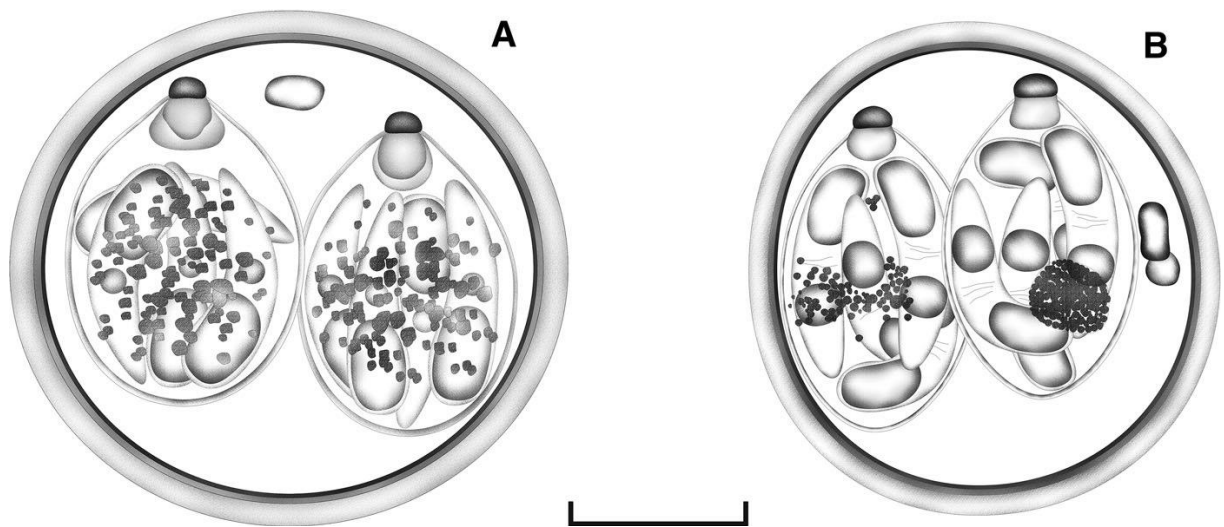
**Localidade:** Parque Nacional do Itatiaia (22° 27'48"S, 44° 36'10"W), sudeste do Brasil.

**Material estudado:** Fototipos e desenhos de linha estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Fotografias dos espécimes hospedeiro tipo (simbiotipos) foram depositadas na mesma coleção. O número do repositório é 65/2016.

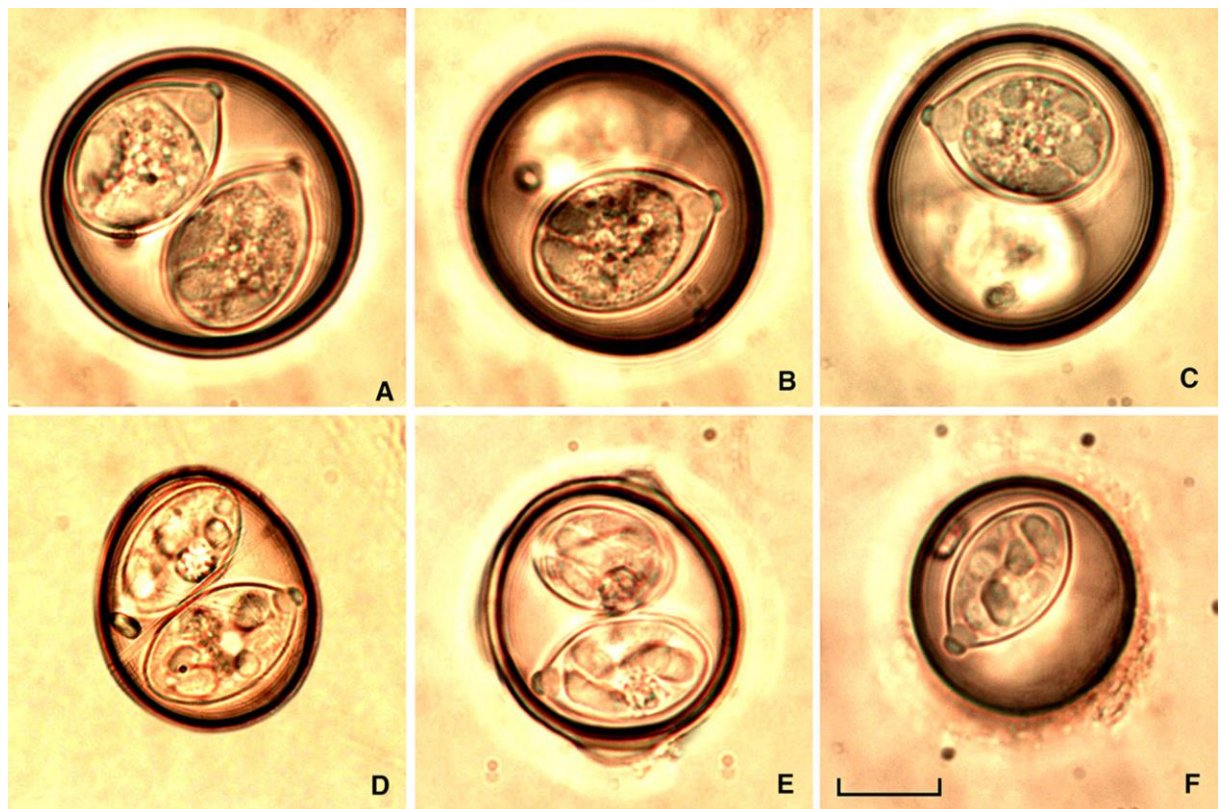
**Local do hospedeiro:** Desconhecido.

**Prevalência:** 4/8 aves infectadas (50%).

**Descrição:** Oocistos (n = 24) subesféricos a ovoides, 24–32 x 23–27 (27,1 x 25,0); comprimento/largura (C/L) relação 1,0–1,2 (1,08). Parede com duas camadas, 1,4–1,7 (1,5) camada exterior espessa lisa, c.2/3 de espessura total. Micrópila e resíduo do oocisto ambos ausentes; 1 ou 2 grânulos polares presentes. Esporocistos (n = 13) elipsoides, 16–21 x 10–12 (18,1 x 10,9); relação C/L 1,5–1,7 (1,65). Corpo de Stieda presente em forma de botão, 1,5 de altura, 2,5 de largura; corpo de substieda presente, arredondado a retangular, 1,5 de altura, 2,5 de largura; corpo parastieda ausente. Resíduo do esporocisto presente, composto por uma massa compacta ou grânulos difusos. Esporozoíto vermiforme com um corpo refrátil posterior e núcleo localizado centralmente.



**Figura 3.** Desenhos em linha compostos de oocistos esporulados de *Isospora guaxi* (A) e *Isospora bellicosa* (B) de *Cacicus haemorrhous*. Barra de escala: 10  $\mu$ m



**Figura 4.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora guaxi* (A – C) e *Isospora bellicosa* (D – F) de *Cacicus haemorrhous*. Barra de escala: 10  $\mu$ m

#### 4.4.2. Caracterização morfológica e morfométrica dos oocistos dos Guaxes

De acordo com Duszynski & Wilber (1997) e uma extensa bibliografia de coccídios de Passeriformes (BERTO et al., 2011a), as novas espécies devem ser comparadas em detalhes com as espécies de coccídios que são semelhantes em características e pertencem à mesma família do hospedeiro. Portanto, uma comparação foi realizada com *Isospora* spp. descritas de Icteridae (Tabela 6). O oocisto de *I. guaxi* tem tamanho semelhante apenas com *I. icterus*; no entanto, a nova espécie pode ser distinguida pelo seu corpo substida sendo compartimentado. Esta característica da compartimentação do corpo substida só é compartilhada com *I. graceannae*; no entanto, *I. guaxi* tem oocistos maiores e esporocistos sem grânulos fragmentados espalhados.

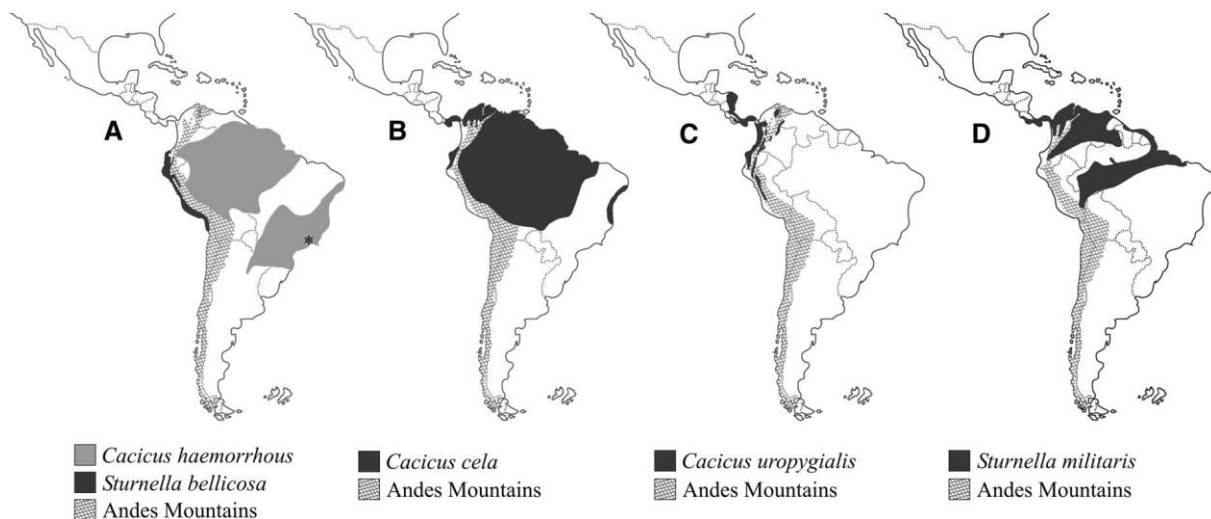
O segundo morfotipo observado neste estudo foi muito semelhante à morfologia descrita para *I. bellicosa*, exceto pela forma dos oocistos, que eram mais elipsoides na descrição de Upton et al. (1995). No entanto, seria insensato considerar uma espécie nova baseada apenas em uma ligeira diferença do oocisto, que pode ser derivado de polimorfismo natural ou um resultado de impactos ambientais e fatores do hospedeiro (FAYER, 1980; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990). De qualquer forma, vale ressaltar que *I. bellicosa* foi originalmente descrita a partir de *L. bellicosus*, que é alopatrico com *C. haemorrhous*. A figura 5A demonstra as faixas geográficas desse trans- andino *L. bellicosus* e cis-andino *C. haemorrhous* com ênfase na barreira geográfica, a Cordilheira dos Andes, que separa as populações desses icterídeos. Da mesma forma, Berto et al. (2014a) relatam *I. sagittulae* de dois novos hospedeiros cis-andinos, *O. salvini* e *W. poecilinotus*, que são alopatricos com o hospedeiro tipo trans-andino *H. naevioides*.

O principal pressuposto introduzido por Berto et al. (2014a) para dispersão entre papaformigas trans e cis-andino podem ser reiterados no trabalho atual. Nesse pensamento, icterídeos com distribuições trans e cis-andina poderiam ter sido infectados com *I. bellicosa* na região trans-andina e transmitido para *C. haemorrhous* na região cis-andina, dispersando *I. bellicosa* através dos Andes, *Cacicus uropygialis* Lafresnaye, 1843 (Figura 5B), *C. cela* (Figura 5C) e *Leistes militaris* (Linnaeus, 1771) (syn. *Sturnella militaris*) (Figura 5D) são espécies congêneres que possuem distribuições cis-andinas simpátricas com *L. bellicosus* e *C. haemorrhous*; portanto, essas espécies são exemplos de possíveis dispersores de *I. bellicosa* através dos Andes. Além disso, vale ressaltar que alguns estudos ornitológicos demonstraram a capacidade de vários Passeriformes para atravessar ou ignorar o Cordilheira dos Andes,

especialmente nas últimas décadas, consequência da taxa acelerada de perda de habitat e fragmentação ao longo das encostas andinas e planícies adjacentes, juntamente com o efeito do aquecimento global nas gamas geográficas das espécies (DE LAS CASAS et al., 2004; AVENDANHÃO et al., 2013).

Também é importante notar que guaxes infectados no trabalho atual foram capturados no sudeste do Brasil (Figura 5A), no lado oposto da América do Sul. Essa população do sudeste de *C. haemorrhous* é alopátrica com a população noroeste, que está próxima das populações de *Leistes* spp. (syn. *Sturnella* spp.) Nesse sentido, conclui-se que *Cacicus* spp., como *C. cela*, ou outros icterídeos suscetíveis a *I. bellicosus* que possuem faixas no Brasil central deveriam ter transmitido *I. bellicosus* para a população sudeste de *C. haemorrhous*.

Em conclusão, *I. guaxi* é considerado novo para ciência e o sexto coccídeo isosporóide relatado de um pássaro icterídeo. Além disso, um novo hospedeiro para *I. bellicosus* é descrito, uma vez que oocistos esporulados com características semelhantes foram recuperadas de *C. haemorrhous* apoiando a transmissão de parasitos entre aves alopátricas da mesma família e gêneros diferentes que habitam lados opostos dos Andes.



**Figura 5.** Distribuição geográfica de várias espécies dos gêneros *Cacicus* e *Sturnella* na América do Sul [adaptado DE LAS CASAS et al. (2004); BIRDLIFE INTERNATIONAL (2015); IUCN (2015)]. Os hospedeiros de *Isospora bellicosus* são *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosus*) e *Cacicus haemorrhous*; *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosus*) é alopátrica de *Cacicus haemorrhous*, além de ser separada pelos Andes (A); *Cacicus cela* (B), *Cacicus uropygialis* (C) e *Leistes militaris* (syn. *Sturnella militaris*) (D) são exemplos de aves icterídeos trans e cis-andinos que são simpátricos à *Leistes bellicosus* (syn. *Sturnella bellicosus*) e (ou) *Cacicus haemorrhous*. O asterisco indica a localização aproximada do ponto de coleta do estudo atual.

**Tabela 6.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isohora* recuperado a partir de pássaros da família Icteridae.

Espécies	Hospedeiro	Oocisto				Esporocisto				Referencias
		Forma	Comprimento × Largura	Relação C/L	Grânulo polar	Comprimento × Largura	Relação C/L	Corpo de Stieda	Corpo de substieda	
<i>Isohora guaxi</i>	<i>Cacicus</i>	subesférico	28–34 × 27–	1.0–1.1	1	17–21 × 12–	1.3–1.6	forma de	proeminente e	Presente estudo
	<i>haemorrhous</i> (L.)		32 (30.9 × 29.0)	(1.06)		15 (19.3 × 13.8)	(1.41)	botão, 1.0 × 2.0	compartimentalizado 3.0 × 4.0	
<i>Isohora bellicosa</i> Upton, Stamper & Whitaker, 1995	<i>Cacicus</i>	subesférico	24–32 × 23–	1.0–1.2	1–2	16–21 × 10–	1.5–1.7	forma de	arredondado a	Presente estudo
	<i>haemorrhous</i> (L.)	a ovoide	27 (27.1 × 25.0)	(1.08)		12 (18.1 × 10.9)	(1.65)	botão, 1.5 × 2.5	retangular, 1.5 × 2.5	
	<i>Leistes bellicosus</i> deFilippi	elipsoide, ovoide ou oblongo	26–32 × 21– 26 (29.4 × 23.5)	1.1–1.4 (1.25)	1–2	17–19 × 10– 11 (17.8 × 10.7)	1.5–1.8 (1.67)	largo, 1.5 × 2.5	homogêneo, 1.5 × 2.5	Upton et al. (1995)
<i>Isohora divitis</i> Pellérdy, 1967	<i>Ptiloxena atroviolacea</i> (d'Orbigny)	subesférico	22–30 × 20– 28	–	ausente	(17 × 13)	–	conspícuo	–	Pellérdy (1967)
<i>Isohora cacici</i> Lainson, 1994	<i>Cacicus cela</i> (L.)	subesférico	22–28 × 20– 26 (26.5 × 23.7)	1.0–1.2 (1.1)	1–2	17–19 × 11– 14 (17.7 × 12.5)	1.2–1.5 (1.4)	proeminente, em forma de rolha	proeminente, 1.0 × 2.0	Lainson (1994)
<i>Isohora icterus</i> Upton & Whitaker, 2000	<i>Icterus icterus</i> (L.)	subesférico	27–32 × 25– 30 (28.9 × 27.2)	1.0–1.1 (1.06)	1	17–19 × 12– 14 (17.8 × 12.8)	1.3–1.5 (1.39)	mamiliforme, 1.5 × 2.0	homogêneo, em forma de balão, 3.0 × 5.0	Upton & Whitaker (2000)

<i>Isospora</i> <i>graceannae</i> Upton & Whitaker, 2000	<i>Icterus</i> <i>graceannae</i> Cassin	subesférico	20–26 × 19– 25 (23.9 × 22.3)	1.0–1.2 (1.07)	1, fragmentado	14–16 × 10– 11 (15.5 × 10.7)	1.4–1.5 (1.44)	robusto, 1.0 × 1.0	compartimentalizado 2.5 × 3.0	Upton & Whitaker (2000)
---	---	-------------	------------------------------------	-------------------	-------------------	------------------------------------	-------------------	-----------------------	----------------------------------	-------------------------------

---

#### 4.5. *Isospora lopesi* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) A PARTIR DO PATINHO *Platyrinchus mystaceus* (PASSERIFORMES: TYRANNI: TYRANNIDAE) NA AMÉRICA DO SUL

O território brasileiro possui uma rica diversidade em sua avifauna. Na última listagem de registros de espécies de aves, 29 espécies foram adicionadas, atingindo 1.872 espécies no Brasil (CBRO, 2014). O patinho *P. mystaceus*, é uma das menores espécies que habitam o interior das florestas conservadas. Tem uma ampla distribuição geográfica do México para a Bolívia e Argentina. No Brasil, é distribuído do nordeste para o sul (SICK, 1997; BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016).

Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2014), *P. mystaceus* é classificado na ordem Passeriformes, subordem Tyranni, parvorder Tyrannida, superfamília Tyrannoidea e família Platyrinchidae, que inclui quatro outros *Platyrinchus* spp., *Neopipo cinnamomea* (Lawrence, 1869) e *Calyptura cristata* (Vieillot, 1818) no Brasil. Em contraste, a BirdLife International (2016), que é atualmente, baseada na lista de verificação de del Hoyo et al. (2016), e Brands (2017), classifica *P. mystaceus* na família Tyrannidae, que é muito mais abrangente com 450 espécies em todo o mundo.

Semelhante a outros Passeriformes tiranídeos podem ser parasitados por coccídio, Boughton et al. (1938) e Kawazoe et al. (1989) relataram *Isospora* spp. do piuí *Sayornis phoebe* (Latham, 1790) e da maria-preta-de-bico-azulado *K. cyanirostris*; contudo, estas espécies de coccídios não foram descritas ou nomeadas. Desde os anos 2000, as espécies de *Isospora* foram descritas a partir de pássaros tiranídeos do Novo Mundo, *I. ferox*, *I. mionectesi* e *I. attilae*, originalmente descritas a partir da maria-cavaleira *M. ferox*, abre-azade-cabeça-cinza *M. rufiventris* e capitão-de-saíra *A. rufus*, respectivamente. Os hospedeiros destas três espécies habitavam a mesma localidade, a Ilha Marambaia no sudeste do Brasil (BERTO et al., 2009a, b; RODRIGUES et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi examinar as fezes do patinho *P. mystaceus* para determinar quais parasitos coccídios estavam presentes. Estes espécimes de *P. mystaceus* foram capturados no PNI, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade localizado na Serra da Mantiqueira na fronteira de três Estados no sudeste do Brasil, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo.

#### 4.5.1. Morfologia de *Isospora lopesi*

Quatorze exemplares de *P. mystaceus* foram examinados e três estavam positivos para coccídio. Todos oocistos observados foram característicos de *Isospora*. Este material é descrito abaixo.

Família Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero *Isospora* Schneider, 1881

***Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018** (Figuras 6, 7)

**Hospedeiro tipo:** *P. mystaceus* (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae), patinho.

**Localidade tipo:** Parque Nacional do Itatiaia (22° 27'S, 44° 35'W), sudeste do Brasil.

**Espécimes tipo:** Fototipos, desenho de linha e oocistos em etanol a 70% foram depositados no Museu de Zoologia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2017003. Fototipos e desenhos de linha também estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o número do repositório P-79/2017. Fotografias do espécime do hospedeiro tipo (simbiotipo) foram depositadas na mesma coleção.

**Local do hospedeiro:** Desconhecido.

**Prevalência:** 21% (3 de 14 aves infectadas).

**Sequência de DNA representativa:** um representante COI sequenciado foi depositado no banco de dados do GenBank sob o número de acesso MF438267.

**Registro no ZooBank:** Para cumprir os regulamentos previstos no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 2012), os detalhes da nova espécie foram enviados para o ZooBank. O Identificador da Ciência da Vida (LSID) para *I. lopesi* é urn: lsid: zoobank.org: ato: ED3F1187-FB31-439E-B5E2-9F3C0A050BE0.

**Etimologia:** O nome específico é derivado do nome de família do parasitologista brasileiro Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, dado em sua homenagem por sua contribuição para o estudo dos protozoários.

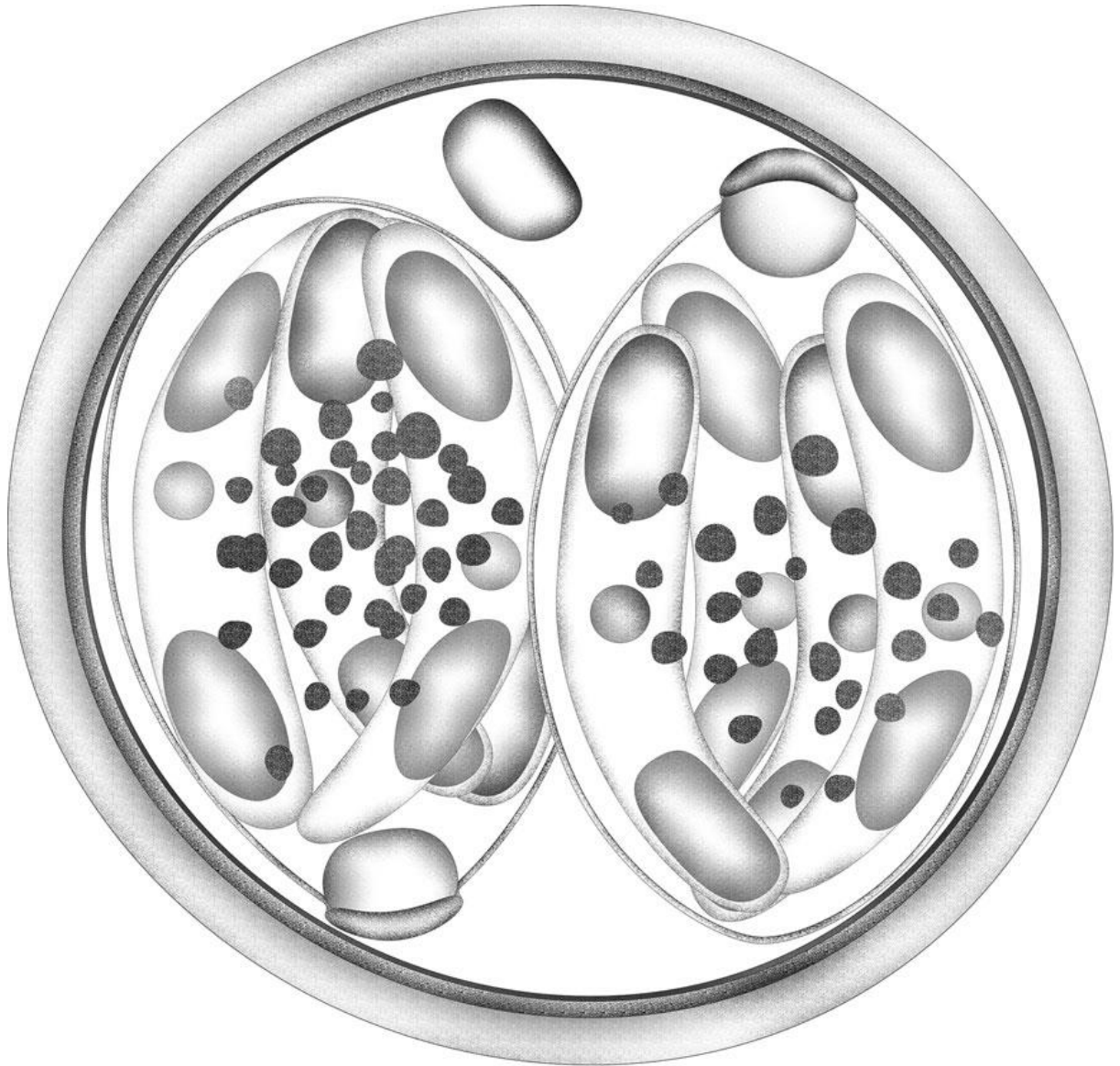


**Descrição:** Oocistos (n = 25) subesféricos a ovoides, 18–24 x 18–22 (20,6 x 19,7); relação comprimento/largura (C/L) 1,0–1,2 (1,05). Parede com camada dupla, 1,3 a 1,6 (1,5) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Micrópila e resíduo do oocisto ambos ausentes, mas um grânulo polar está presente. Esporocistos (n = 24) 2, elipsoides, 12–16 x 8–11 (14,4 x 8,6); relação C/L 1,5–1,9 (1,7). Corpos de Stieda presente, achatado em forma de meia-lua, 1,0 x 2,5; substieda presente, arredondado, 2,0 x 2,5; corpo parastieda ausente; resíduo do esporocisto presente, composto de dispersas esférulas de tamanhos diferentes. Esporozoítos 4, vermiformes, com corpos refráteis anteriores e posteriores e núcleo centralmente localizado.

**Observações:** Seguindo as evidências que demonstram especificidade em nível de família relatado em artigos sobre a taxonomia de coccídios de Passeriformes (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al., 2011a; SILVA et al., 2016), *I. lopesi* foi comparado em detalhes com espécies coccidianas que são morfologicamente semelhantes e parasitam aves pertencentes à mesma família hospedeira. Até hoje, três espécies de *Isospora* são registradas de hospedeiros de Tyrannidae (Tabela 7). *I. mionectesi* tem oocistos e esporocistos maiores que *I. lopesi*. Os oocistos de *I. attilae* e *I. feroxis* têm tamanho e forma semelhantes a *I. lopesi*; no entanto, pode ser facilmente distinguido pelo corpo de Stieda achatado em forma de meia-lua. Além disso, esporocistos de *I. lopesi* são consideravelmente mais alongadas que as de *I. feroxis* que é morfometricamente demonstrado pelo índice morfométrico (1,7 vs 1,4). *I. attilae* possui esporocistos sobrepondo a faixa de tamanho para *I. lopesi*. Contudo, o esporocisto em *I. attilae* é mais cônico no final do corpo de Stieda e tem um resíduo de esporocisto menor (BERTO et al., 2009a, b; RODRIGUES et al., 2015).

**Análise filogenética:** Amplificação de DNA dos oocistos de *I. lopesi* mostrou uma faixa clara de c.250 bp. Análise filogenética incluiu 30 sequências para *Isospora* spp. e cinco sequências para *Eimeria* spp. disponíveis no GenBank (Figura 8) *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) foi usado como o outro grupo. *I. lopesi* agrupados com 16 *Isospora* spp. isolados de *Sylvia* spp., *Isospora hypoleucae* Dolnik, Ronn & Bensch, 2009 e duas *Eimeria* spp. de roedores, mas sem suporte estatístico. Entre elas, as novas espécies apresentaram a maior similaridade de 98,5% e 98,0% com *Isospora* sp. isolados da toutinegra-tomilheira *Sylvia conspicillata* Temminck, 1820 (GenBank: KP688311 e KP688312; ver ILLERA et al., 2015). Em uma segunda análise, um subconjunto de sequências do gene COI de 215 pares de bases por 10 *Isospora* spp. foi utilizado (Figura 9). Nesta análise, *I. lopesi* foi descrito como um táxon irmão basal para um clado compreendendo *I. hypoleucae* e cinco espécies de

*Isospora* isolados da toutinegra-de-barrete-preto *Sylvia atricapilla* (Linnaeus, 1758) com semelhanças de 96,1% e 95,1–97,5%, respectivamente.



**Figura 6.** Desenho de linha composta do oocisto esporulado de *Isospora lopesi* de *Platyrrinchus mystaceus*. Barra de escala: 1µm.



**Figura 7.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora lopesi* de *Platyrrinchus mystaceus*. Abreviaturas: pg, grânulo polar; sb, corpo de Stieda; ssb, corpo substieda; sr, resíduo de esporocisto; rb, corpo refrátil; n, núcleo. Tudo para a mesma escala. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

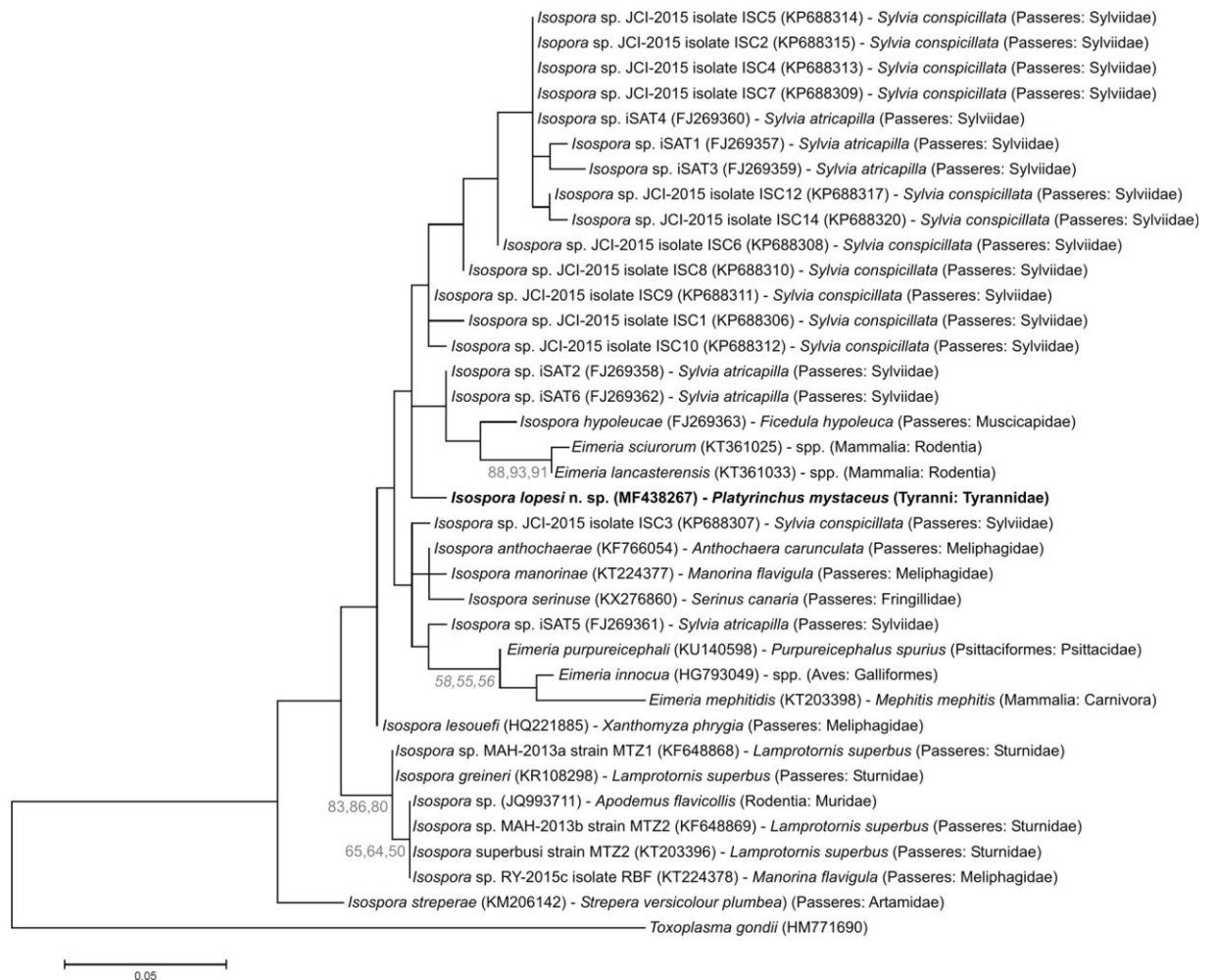
**Tabela 7.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isoospora* recuperado a partir de pássaros tiranídeos do Novo Mundo (Tyrannidae).

Espécies	Hospedeiros	Forma dos			Forma dos			Referências				
		Oocistos	Tamanho (μm)	Índice Morfométrico	Grânulo polar	Esporocistos	Tamanho (μm)	Índice Morfométrico	Corpo de Stieda	Corpo de substieda	Resíduo do Esporocisto	
<i>Isoospora ferox</i>	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin)	subesférico	18–20 × 17–20 (18.7 × 18.0)	1.0–1.1 (1.1)	usualmente 2	ovoide	11–13 × 8–10 (11.7 × 8.5)	1.0–1.5 (1.4)	ovoide, achatado	proeminente	difuso	Berto et al. (2009a)
<i>Isoospora mionectes</i>	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis	elipsoide	23–31 × 19–23 (28.3 × 21.2)	1.2–1.4 (1.3)	1 ou 2	alongado-elipsoide	17–22 × 10–13 (19.7 × 11.7)	1.6–1.8 (1.7)	arredondado	proeminente	subesférico, compacto	Berto et al. (2009b)
<i>Isoospora attilae</i>	<i>Attila rufus</i> (Vieillot)	subesférico a elipsoide	18–22 × 18–21 (20.3 × 19.0)	1.0–1.2 (1.07)	1 ou 2	elipsoide	12–15 × 7–9 (13.5 × 7.9)	1.6–1.9 (1.7)	forma de botão	arredondado a traapezoidal	difuso	Rodrigues et al. (2015)

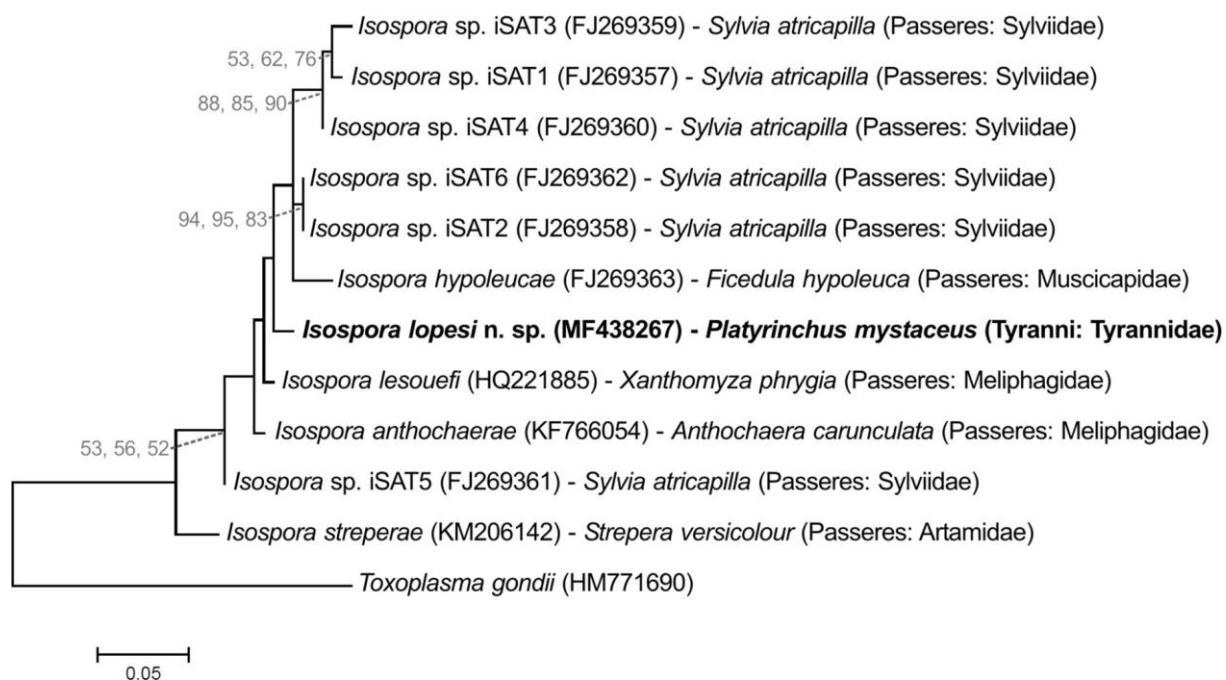
Lopes,  
Berto,  
Luz,  
Ferreira  
& Lopes,  
2015

<i>Iso</i>	<i>Platy</i>	subesfé	18–24 ×	1.0–1.2	1	elipsoide	12–16 ×	1.5–1.9 (1.7)	achatado a	arredonda	difuso	presente
<i>lo</i>	<i>rin</i>	co a	18–22	(1.05)			8–11		forma de	do		estudo
<i>po</i>	<i>ch</i>	ovoide	(20.6 ×				(14.4 ×		meia lua			
<i>si</i>	<i>us</i>		19.7)				8.6)					
	<i>mystaceus</i>											
	Vieillot,											
	1818											

---



**Figura 8.** Árvore de ML estimada a partir das seqüências COI. Os números nos representam o suporte de bootstrap (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para NJ, ML e MP, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.



**Figura 9.** Árvore de ML estimada a partir do conjunto de dados de sequenciamento COI de 215 pares de bases para *Isospora* spp. Números nos representam suporte a Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados] para NJ, ML e MP, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

#### 4.5.2. Caracterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de *Isospora lopesi*

O primeiro parasito coccidiano de Tyrannidae a ter sua seqüência COI depositada no banco de dados do GenBank foi *I. lopesi*. Como mostrado na árvore da figura 8, a maioria das seqüências COI disponíveis para *Isospora* spp. dos hospedeiros dos Passeriformes são das famílias Sylviidae, Meliphagidae e Sturnidae. Todas estas famílias pertencem à subordem Passeres, enquanto *P. mystaceus* pertence à subordem Tyranni (suboscines), que contém famílias de Passeriformes primitivos, filogeneticamente distantes de famílias de Passeres. Apesar disso, *I. lopesi* exibiu alta semelhança com isolados de *Isospora* spp. de hospedeiros de Sylviidae (KP688311 e KP688312; 98,5% e 98,0%). Nós prevemos que quanto mais seqüências de COI *Isospora* spp. dos hospedeiros nos Tyranni são depositados no banco de dados do GenBank, essa árvore se reorganizaria formando um ou mais clados de *Isospora* spp. de suboscines, onde *I. lopesi* seria colocado.

Os genes 28S e 18S rRNA foram reconhecidos como lócus úteis para diferenciar *Isospora* spp. de Passeriformes e estimar suas relações interespecíficas (YANG et al., 2015,

2016; TOKIWA et al., 2017). Além disso, o 18S rRNA é o locus mais comum usado para caracterização molecular de parasitos coccidianos como evidenciado pelo grande número de sequências de 18S rRNA de coccidia no GenBank. No entanto, no presente estudo o genoma COI foi escolhido para genotipagem porque é indicado como o mais adequado para estudos filogenéticos por ter um maior poder de resolução do que o gene 18S rRNA na delimitação de eventos recentes de especiação (YANG et al., 2015; OGEDENGBE et al., 2011). Além disso, em recentes estudos de Yang et al. (2015, 2016) com genotipagem em locus 18S, 28S e COI de *Isospora* spp. de Passeriformes, foi enfatizado que os iniciadores de PCR COI originalmente usado por Dolnik et al. (2009a), que geram 215 pares de bases de amplificação, podem ser mais confiáveis para a delimitação de espécies de *Isospora* spp. Nesse sentido, os primers de Dolnik et al. (2009a) foram escolhidos para genotipagem de *I. lopesi* no presente estudo. Seguindo Yang et al. (2015, 2016), análises filogenéticas foram inicialmente construídas comparando *I. lopesi* com as sequências COI mais similares depositadas no GenBank (Figura 8) e, subsequentemente, apenas com sequências de *Isospora* com comprimento de 215 pares de bases (Figura 9).

Tyrannidae é uma das maiores famílias de aves Passeriformes do Novo Mundo (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016); entretanto, somente algumas espécies de coccídios são relatadas na família (BERTO; LOPES, 2013). O estudo dos coccídios dos hospedeiros de Tyrannidae torna-se mais relevante porque duas espécies de *Eimeria*, que é um gênero parasito coccidiano incomum de Passeriformes, são descritos de aves desta família (Berto et al., 2008d, 2009b). Aliado a isso, também é importante saber quais espécies de *Isospora* tem um ciclo extra-intestinal, já que espécies com este ciclo são reconhecidas como mais patogênicas causando a chamada atoxoplasmose (BERTO et al., 2011a). Essas espécies de *Isospora* extra-intestinais foram anteriormente identificadas e/ou nomeadas como *Lankesterella* ou *Atoxoplasma*, até Box (1981) associou a merogonia extra-intestinal em canários com uma infecção por *Isospora*. Assim, todas as formas sanguíneas descritas como *Atoxoplasma* e *Lankesterella* em Passeriformes foram redescritas como *Isospora* (BERTO et al., 2011a). Atualmente, com o estudo molecular e com o número crescente de espécies de *Isospora* sequenciadas no GenBank, é possível identificar se uma espécie com descrição morfológica e molecular, possui um ciclo extra-intestinal, através da detecção molecular por PCR/sequenciamento em amostras de sangue de Passeriformes (DOLNIK et al., 2009a; HAFEEZ et al., 2014). A identificação de espécies extra-intestinais que podem ser potencial causa da coccidiose grave (atoxoplasmose) pode ajudar a classificar os hospedeiros e/ou



famílias mais ou menos suscetíveis à doença e, portanto, orientam a tomada de decisão para conservação, principalmente em áreas protegidas.

Baseado nas características morfológicas descritas acima, *I. lopesi* é considerada nova para a ciência e a quarta espécie coccidiana isosporóide relatada de um pássaro tiranídeo no Novo do Mundo. Além disso, este é o primeiro parasito coccidiano de um hospedeiro dos Tyranni a ter a caracterização molecular do gene COI.

#### 4.6. *Isospora sagittulae* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DE PAPA-FORMIGAS (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE) NA AMAZÔNIA E NA MATA ATLÂNTICA DO BRASIL: COM OBSERVAÇÕES SOBRE SUA DISTRIBUIÇÃO E DISPERSÃO NA REGIÃO NEOTROPICAL

Thamnophilidae é uma família de aves Passeriformes insetívoras que compreende 241 espécies restritas às planícies e à baixa altitude das florestas das ilhas do Caribe, Mesoamérica e América do Sul. Evidentemente, devido ao grande número de espécies, é uma família altamente polimórfica, e predominantemente composta de aves silvestres com hábitos alimentares insetívoros (SICK, 1997; CBRO, 2014; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Apesar dessa aparente restrição em baixas altitudes e limitação das suas distribuições às barreiras geográficas da região neotropical, alguns taminofilídeos parecem atravessar fortes barreiras geográficas, ou pelo menos têm populações que não são limitados ou bloqueados por essas barreiras (SICK, 1997; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

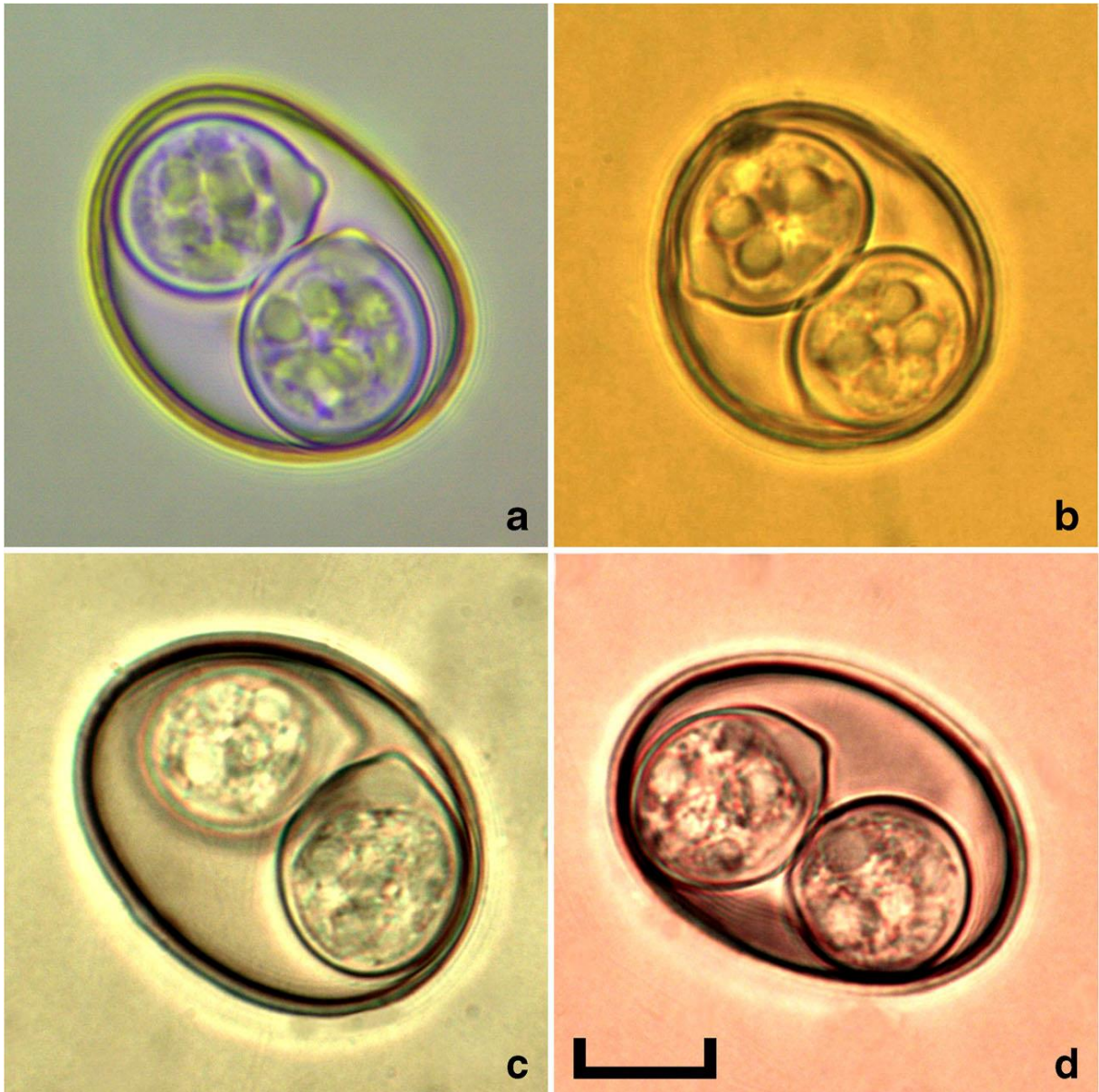
A possibilidade dos taminofilídeos cruzarem fortes barreiras, foi assumido por Berto et al. (2014a), que evidenciaram uma dispersão coccidiana entre regiões trans e cis-andinas por taminofilídeos que habitam ambas as regiões e, possivelmente, cruzam as montanhas dos Andes. O coccídeo eimeriida das aves tem predominantemente transmissão oral-fecal; isto é, ocorre através da ingestão de oocistos, que são as fases infecciosas do coccídeo eliminado nas fezes do hospedeiro. Portanto, a transmissão de coccídios necessariamente ocorre quando hospedeiros suscetíveis habitam o mesmo ambiente. Em Berto et al. (2014a), o parasito coccidiano *I. sagittulae* foi relatado da mãe-de-taoca-de-cauda-barrada *O. salvini* e do rendadinho *W. poecilinotus* na Amazônia brasileira, na região cis-andina; contudo, esse parasito foi originalmente descrito a partir de *H. naevioides*, um pássaro taminofilídeo que tem uma distribuição trans-andina na Colômbia, Costa Rica, Equador, Honduras, Nicarágua e

Panamá (MCQUISTION; CAPPARELLA 1992). Nesse sentido, presumiu-se que a transmissão ocorreu por meio de pássaros com distribuições tanto trans- como cis-andinas, como *Cercomacra tyrannina* Sclater, 1855 e *Formicivora grisea* (Boddaert, 1783), o que poderia manter e transmitir *I. sagittulae* através do Andes.

Neste contexto, o presente trabalho contribuiu para a conhecimento sobre a identificação, distribuição e dispersão de *I. sagittulae* em aves taminofilídeos na região Neotropical, pois relata o papa-taoca-do-sul *P. leucoptera* como novo hospedeiro na Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil, demonstrando assim a ampla dispersão de *I. sagittulae*, além de comparar, de forma morfológica e molecular, as amostras da Amazônia e Mata Atlântica.

#### **4.6.1. Morfologia de *Isospora sagittulae* no sudeste brasileiro**

Os papa-taocas-do-sul capturados no PNI foram positivos para *I. sagittulae* (Tabela 1); entretanto àqueles capturados em Cacaraia foram negativos. Seus oocistos (Figura 10c, d) foram irregularmente ovoides a elipsoides, 30,8 (29-33) × 24,4 (22-26) µm, com índice morfométrico de 1,3 (1,2–1,5). Parede do oocisto bicamada e lisa, 1,1 µm. Micrópila, e resíduo do oocisto está ausente, mas 1–3 (geralmente 2) grânulos polares estão presentes. Esporocistos subsféricos a ovoides, 15,9 (14-17) × 13,4 (12-15) µm, com índice morfométrico de 1,2 (1,1-1,3). Corpo de Stieda fino e achatado, 0,5 de altura × 2,0 de largura. Corpo de substieda triangular a arredondar, 2,5 de altura × 5,0 de largura. Corpo de parastieda ausente. Resíduo do esporocisto composto por grânulos dispersos. Esporozoítos com corpo refratário posterior proeminente e pequeno núcleo.



**Figura 10.** Fotomicrografias de *Isospora sagittulae* recuperado de mãe-de-taoca-de-cauda-barrada *Oneillornis salvini* (a), rendadinho *Willisornis poecilinotus* (b) e papa-taoca-do-sul *Pyriglena leucoptera* (c, d). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

#### 4.6.2. Material depositado

Fotomicrografias e oocistos em etanol a 70% foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2017005. Fotomicrografias também foram depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção Parasitológica do Laboratório de Biologia

de Coccídios, na UFRRJ, sob o número de repositório 86/2017. Fotografias dos espécimes hospedeiros foram depositadas na mesma coleção.

#### **4.6.3. Morfometria Comparativa**

Análises comparativas por ANOVA entre os oocistos e esporocistos de *I. sagittulae* recuperados de *O. salvini*, *W. poecilinotus* e *P. leucoptera* revelaram algumas diferenças significativas no tamanho dos oocistos (Tabela 8). Estas diferenças significantes e a alta irregularidade da forma dos oocistos também foram observadas na distribuição das medidas na análise de Regressão linear (Figura 11).

#### **4.6.4. Sequenciamento**

A amplificação de DNA dos oocistos de *I. sagittulae* resultou em uma banda em torno de 250 pares de bases. As sequências de DNA dos oocistos recuperados de *P. leucoptera* e *W. poecilinotus* foram 100% equivalentes, e foram depositados no GenBank sob os números de acesso MF981004 e MF981005, respectivamente.

#### **4.6.5. Análise filogenética**

A análise filogenética incluiu 32 sequências das espécies de *Isospora* disponíveis no GenBank (Figura 12). *Eimeria tenella* (Railliet e Lucet, 1891) foi usada como o grupo externo. *I. sagittulae* de *W. poecilinotus* e *P. leucoptera* dispuseram-se em um clado com a maior similaridade de 99,5% com *I. lopesi* (SILVA-CARVALHO et al. 2018a), o qual foi depositado com o número de acesso MF438267.

**Tabela 8.** Morfometria de oocistos de *Isospora sagittulae* recuperados de taminofilídeos (Thamnophilidae).

Hospedeiros	Localidade	n <sup>I</sup>	Oocistos		IM <sup>II</sup>	Esporocistos		
			DM (µm)	dm (µm)		DM (µm)	dm (µm)	IM <sup>II</sup>
<i>Hylophylax naevioides</i> Lafresnaye, 1847	noroeste do Equador	21	25-30 (27.5)	21-24 (21.8)	1.27	13-16(14.8)	12-13 (12.4)	1.1-1.3 (1.19)
<i>Oneillornis salvini</i> (Berlepsch, 1901)	Amazônia brasileira	8	27-31 (29.5) <sup>a</sup>	21-24 (22.8) <sup>a,b</sup>	1.2- 1.3 (1.29) <sup>a</sup>	14-17 (15.5) <sup>a</sup>	12-14 (12.9) <sup>a</sup>	1.1-1.3 (1.20) <sup>a</sup>
<i>Willisornis poecilinotus</i> (Cabanis, 1847)	Amazônia brasileira	7	27-28 (27.2) <sup>b</sup>	20-25 (22.0) <sup>a</sup>	1.1- 1.4 (1.25) <sup>a</sup>	13-16 (14.6) <sup>a</sup>	12-13 (12.3) <sup>a</sup>	1.1-1.2 (1.19) <sup>a</sup>
<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1818)	Mata Atlântica Brasileira	27	29-33 (30.8) <sup>a</sup>	22-26 (24.4) <sup>b</sup>	1.2- 1.5 (1.27) <sup>a</sup>	14-17 (15.9) <sup>a</sup>	12-15 (13.4) <sup>a</sup>	1.1-1.3 (1.19) <sup>a</sup>

Diametro maior (DM); diamentro menor (dm); e índice morfométrico (IM).

Letras diferentes em cada coluna denotam diferenças estatisticamente significativas (P <0,01) pela ANOVA

a Número total de oocistos medidos

b Relação comprimento/largura

#### **4.6.6. Caracterização morfológica e morfométrica dos oocistos da Amazônia e Mata Atlântica**

Observa-se na tabela 8 que um maior número de oocistos de *I. sagittulae* pôde ser observado, o que permitiu verificar a irregularidade no tamanho e na forma dos seus oocistos. Observando a regressão linear na figura 11, verifica-se que os pontos de dados estão distantes da linha de regressão, indicando irregularidade na distribuição das medições. Além disso, os valores muito baixos de  $R^2$  obtidos em ambas as amostras da Amazônia e Mata Atlântica do Brasil, claramente revelam o polimorfismo dos oocistos de *I. sagittulae* (BERTO et al., 2014b). Essa forma irregular também foi morfológicamente observada em alguns oocistos, principalmente aqueles com forma de bumerangue (Figura 10a, c) ou outras formas irregulares.

Este polimorfismo já foi relatado na literatura como intrínseco a uma espécie coccidiana, derivado das diferentes posições dos oocistos durante as medições e/ou relacionadas a vários fatores ambientais e do hospedeiro; como estresse, nutrição, imunidade do hospedeiro, dose infectante, tempo de descarga dos oocistos durante o período da patente, e plasticidade fenotípica (FAYER, 1980; PARKER; DUSZYNSKI, 1986; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990; BERTO et al. 2014b).

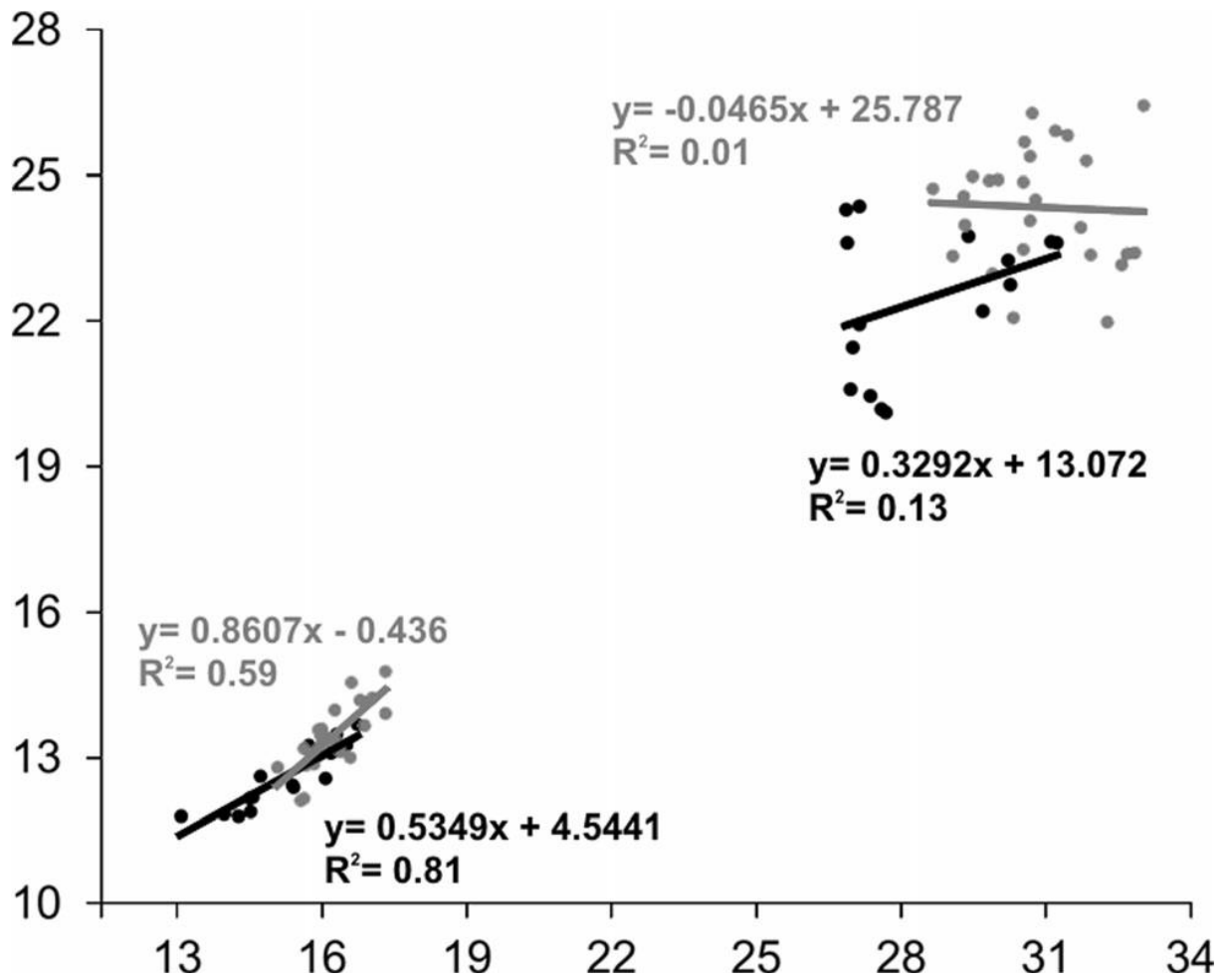
#### **4.6.7. Identificação molecular e delimitação de espécies**

A similaridade genotípica de 100% para a localidade COI observado entre as amostras de *W. poecilnotus* e *P. leucoptera* corrobora a semelhança morfológica entre essas mesmas amostras; portanto, esses resultados enfatizam que os oocistos recuperados dos hospedeiros da Amazônia e Mata Atlântica no Brasil pertencem à mesma espécie, *I. sagittulae*. O gene COI foi escolhido para genotipagem no presente estudo, porque tem sido indicado como o mais adequado para estudos filogenéticos por ter um maior poder de resolução do que o gene 18S rRNA na delimitação de eventos recentes de especiação (YANG, et al. 2015; OGEDENGBE, et al. 2011). Além disso, em estudos recentes de Yang et al. (2015, 2016) com genotipagem nos loci 18S, 28S e COI de espécies de *Isospora* dos Passeriformes, foi enfatizado que o Primers de COI utilizados originalmente por Dolnik et al. (2009a), que geram bandas de 215 pares de bases, podem ser mais confiáveis para delimitação das espécies de *Isospora*.

A delimitação de espécies de coccídios tem sido superestimada ou subestimada em alguns trabalhos científicos. Esta discussão foi levantada por Silva et al. (2016), que destacaram estudos onde cerca de 1% da diferença genotípica resultou na separação em duas espécies, e outras onde cerca de 3% da diferença genotípica não resultou em separação de espécies. Nós concordamos com Silva et al. (2016), que basearam a identificação das espécies nas diretrizes de Duszynski e Wilber (1997), onde oocistos devem ser comparados com espécies de coccídios que são características semelhantes e pertencem à mesma família do hospedeiro; além disso, nós entendemos que uma espécie deve ser identificada e classificada de acordo com todos os seus aspectos morfológicos, biológicos, ecológicos, e características moleculares. Em outras palavras, de acordo com Kunz (2002), o critério para identificação de novas espécies não pode ser apenas com base em um certo número de trocas de base dentro da sequência de DNA. De qualquer forma, as fortes equivalências morfológicas, moleculares e ecológicas (especificidade do hospedeiro) dos oocistos observados no presente trabalho garantem a identificação única de *I. sagittulae*.

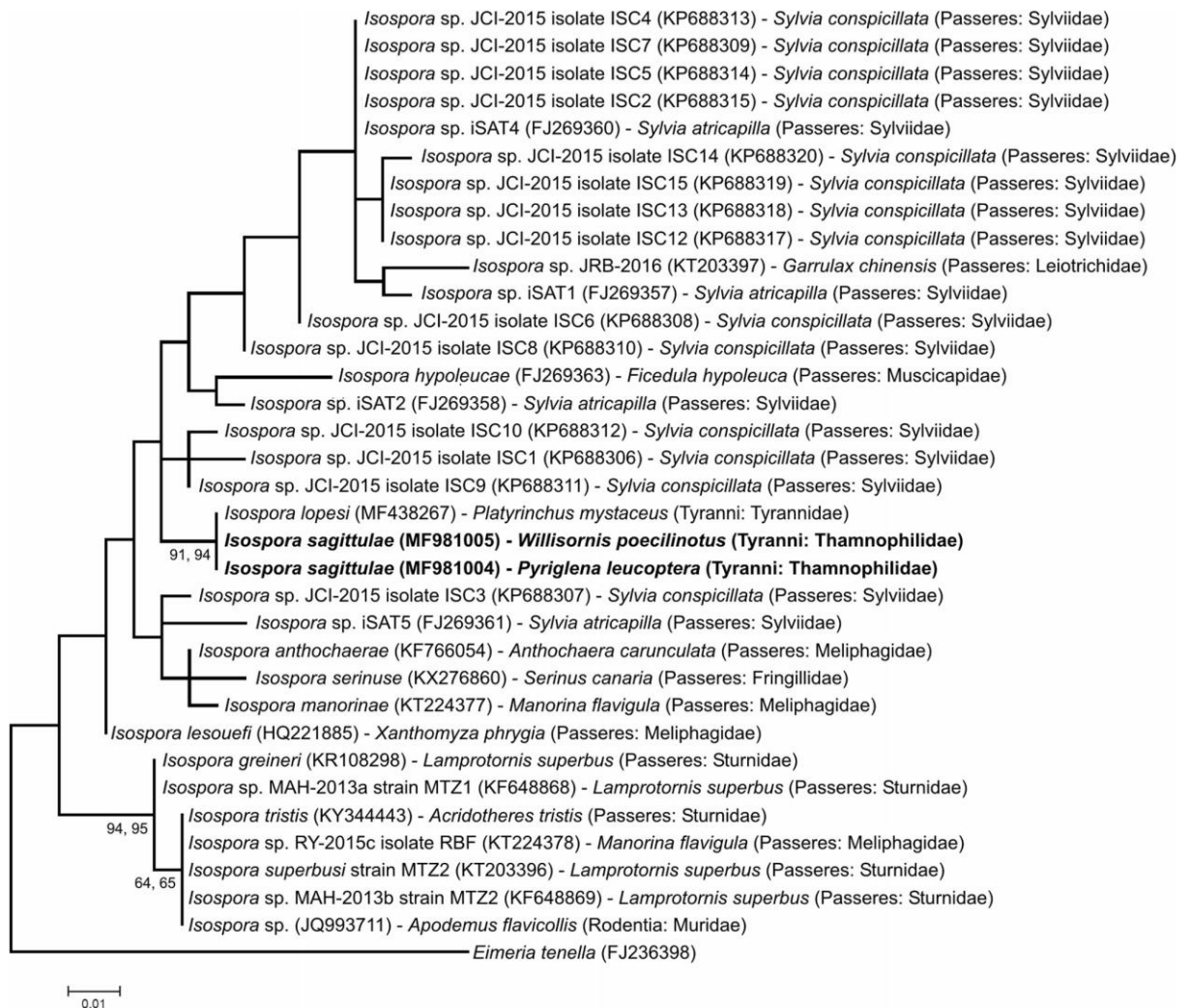
#### **4.6.8. Análise filogenética**

A análise filogenética (Figura 12) revelou que *I. sagittulae* está mais próxima (cerca de 99,5%) de *I. lopesi*, e mais distante (cerca de ~ 97%) de *Isospora* spp. isolado de toutinegra-tomilheira *S. conspicillata* (ILLERA, et al. 2015), que é filogeneticamente e geograficamente distante dos hospedeiros taminofilídeos de *I. sagittulae* (DELHOYO, et al. 2016). Juntamente com os resultados de Silva-Carvalho et al. (2018), este resultado evidencia a tendência da formação de um clado contendo *Isospora* spp. de pássaros primitivos (subordem Tyranni), que devem ser confirmados quando mais *Isospora* spp. de Tyranni forem sequenciados pelo gene COI. Dessa forma, essa observação reforça o conceito de co-evolução de parasitos coccidianos e seus hospedeiros (ODUM, 1998).



**Figura 11.** Regressões lineares comparativas de oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isospora sagittulae* recuperada de *Oneillornis salvini* e *Willisornis poecilinotus* na Amazônia (preto) e *Pyriglema leucoptera* na Mata Atlântica (cinza).





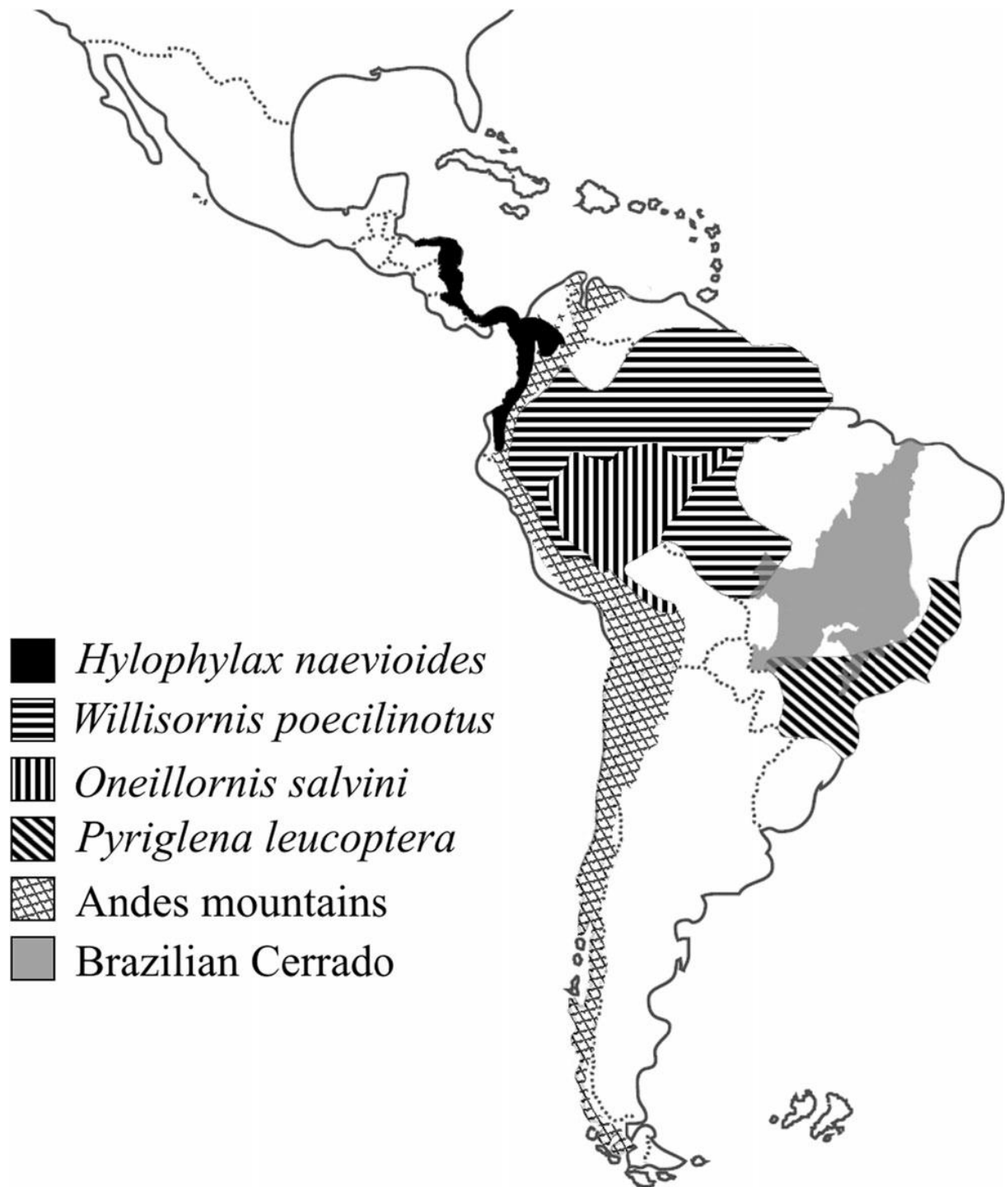
**Figura 12.** Árvore de ML estimada a partir das sequências do gene COI de *Isospora* spp. Números em nós representam suporte a Bootstrap para 1000 réplicas (> 50%) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por site.

#### 4.6.9. Distribuição e dispersão de *Isospora sagittulae* na região Neotropical

Adicionalmente, os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de dispersão de *I. sagittulae* através dos Andes, introduzido por Berto et al. (2014a). A morfologia e identificação molecular de *I. sagittulae* no sudeste do Brasil revelam a ampla dispersão de *I. sagittulae* no Brasil; portanto, supõe-se que *I. sagittulae* distribuído por toda a região neotropical onde ocorrem os taminofilídeos.

Assim como em Berto et al. (2014a), os hospedeiros de *I. sagittulae* no trabalho atual não são simpátricos. *O. salvini* e *W. poecilnotus* são endêmicas da Amazônia, enquanto *P. leucoptera* é endêmica da Mata Atlântica. Como mostrado na figura 13, o bioma Cerrado está

localizado entre esses dois biomas e, conseqüentemente, entre as faixas geográficas dessas espécies. Assim, supõe-se que os taminofilídeos no Cerrado também devem ser parasitados por *I. sagittulae* e podem transmitir e dispersar *I. sagittulae* para taminofilídeos na Amazônia e na Floresta Atlântica. Exemplos de taminofilídeos que são distribuídos no Cerrado e poderiam cumprir essa função seriam a choquinha-lisa *D. mentalis*, o formigueiro-de-barriga-preta *Formicivora melanogaster* (Pelzeln, 1868), o papa-formiga-vermelho *Formicivora rufa* (Wied, 1831), o chorozinho-de-chapéu-preto *Herpsilochmus atricapillus* (Pelzeln, 1868), o choró-boi *Taraba major* (Vieillot, 1816), a choca-barrada *Thamnophilus doliatus* (Linnaeus, 1764), a choca-do-planalto *Thamnophilus pelzelni* (Hellmayr, 1924), e a choca-de-asa-vermelha *Thamnophilus torquatus* (Swainson, 1825) (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016). Entre essas espécies, *D. mentalis*, *T. major*, e *T. doliatus* podem ser destacadas porque eles têm distribuições trans-andina e cis-andina, incluindo os Biomas brasileiros de Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016); portanto, essas espécies são potenciais dispersores de *I. sagittulae* na região Neotropical.



**Figura 13.** Distribuição geográfica dos hospedeiros taminofilídeos de *Isospora sagittulae* na região Neotropical (com base nos dados da BirdLife International 2016). Apenas *Oneillornis salvini* e *Willisornis poecilinotus* são simpátricos uns com os outros na Amazônia. *Hylophylax naevioides* é separado pelos Andes. O novo hospedeiro *Pyriglena leucoptera* tem distribuição geográfica na Floresta Atlântica no sudeste do Brasil, e está separado das populações dos hospedeiros amazônicos pelo bioma do Cerrado.

#### 4.7. *Isospora borbai* (CHROMISTA: APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO CHUPA-DENTES *Conopophaga* SPP. (PASSERIFORMES: TYRANNI: CONOPOPHAGIDAE) NA AMÉRICA DO SUL

A parvorder Thamnophilida (Passeriformes: Tyranni) é dividida em três famílias: Thamnophilidae, Melanopareiidae e Conopophagidae. A família Conopophagidae reúne dois gêneros: *Conopophaga* e *Pittasoma*. No Brasil, sete espécies de *Conopophaga* são relatadas; no entanto, as duas espécies de *Pittasoma* estão restritas à Colômbia, Costa Rica, Panamá e Equador (PIACENTINI et al., 2015; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

As espécies de *Conopophaga* (chupa-dente) são pequenas, com um longo tarso, cauda curta e asa arredondada. A maioria possui uma faixa pós-ocular alongada, geralmente branca. Eles são insetívoros terrestres comumente observados em florestas altas e úmidas, onde permanecem alojados em galhos finos e, às vezes, voam até o chão para pegar insetos (SICK, 1997).

O hábito alimentar insetívoro não favorece a transmissão oral-fecal de parasitos; no entanto, várias espécies de coccídios são registradas para famílias de Passeriformes insetívoros (BERTO; LOPES, 2013). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi examinar as fezes de chupa-dentes *Conopophaga* spp. capturados em diferentes localidades da região do Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, para determinar quais parasitos coccídios estavam presentes.

##### **4.7.1. Análise morfológica, morfométrica, molecular e filogenética de *Isospora borbai* no sudeste do Brasil**

Nove exemplares de *Conopophaga* foram examinadas e quatro positivas para coccídios (dois *C. melanops* e um *C. lineata* do PNI; e um *C. lineata* de Barra Mansa). Todos os oocistos observados foram característicos de *Isospora*. Este material é descrito abaixo.

Família Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero *Isospora* Schneider, 1881

***Isospora borbai* Silva-Carvalho & Berto (Figuras 14, 15)**

Oocistos (n = 32) subsféricos, 17-22 × 15-22 (20,2 × 19,1); relação comprimento/largura (C/L) 1.0–1.1 (1.06). Parede bicamada, 1,5-2,1 (1,7) de espessura, camada externa áspera, c.2/3 de espessura total. Micrópola presente, sem tampa ou rugas; no entanto, geralmente com ligeira invaginação da camada interna. Resíduo do oocisto ausente, mas um ou dois (frequentemente um subsférico) grânulos polares estão presentes. Esporocistos (n = 25) elipsoides, 12-15 × 8-11 (14,1 x 9,1); relação C/L 1,4–1,7 (1,56). Corpo de Stieda presente, em forma de meia lua, 1,0 × 2,5; substieda presente, arredondado, 2,0 × 3,5; corpo de parastieda ausente; resíduo do esporocisto presente, composto por partículas esféricas dispersas de diferentes tamanhos. Esporozoítos vermiformes, com corpo refratário posterior e núcleo central.

**Hospedeiro tipo:** *C. lineata* (Aves: Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae), chupadente.

**Outro hospedeiro:** *C. melanops* (aves: Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae), cuspidor-de-máscara-preta

**Localidade tipo:** Parque Nacional do Itatiaia (22 ° 27'S, 44 ° 35'W), sudeste do Brasil.

**Outra localidade:** Barra Mansa (22 ° 29'S, 44 ° 09'W), sudeste do Brasil.

**Espécimes tipo:** Fototipos, desenho de linha e oocistos em etanol a 70% estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2018008. Fototipos e desenhos de linha também estão depositados e disponibilizados (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob o número do repositório P-91/2018. Fotografias do espécime hospedeiro tipo (simbionte) foram depositadas na mesma coleção.

**Local do hospedeiro:** Desconhecido.

**Prevalência:** 44% (4 de 9 aves infectadas).

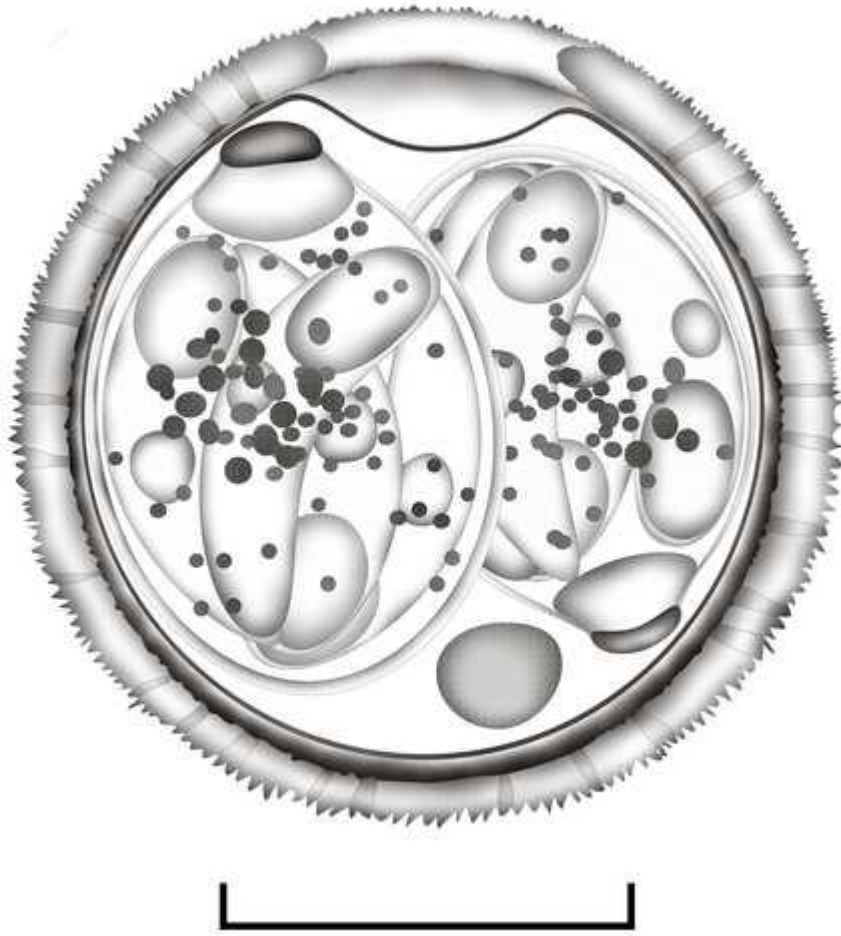
**Sequência de DNA representativa:** Uma sequência COI representativa foi depositada na base de dados do GenBank sob o número de acesso MK057528.

**Registro no ZooBank:** Para cumprir com os regulamentos estabelecidos no artigo 8.5 da versão de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 2012), em detalhes, as novas espécies foram submetidas ao ZooBank. O Identificador de Ciência da Vida (LSID) para *I. borbai* é urn:lsid:zoobank.org:act:D3BE104D-300F-4251-981C-393CD86800F7.

**Etimologia:** O nome específico é derivado do sobrenome do parasitologista brasileiro Dr. Hécio Resende Borba, dado em sua homenagem por sua contribuição ao estudo da atividade antiparasitária das plantas.

**Observações:** Até hoje, apenas duas *Isospora* spp. são registradas a partir de hospedeiros da parvorder Thamnophilida (Tabela 9). *I. sagittulae* e *I. parnaitatiaiensis* foram registrados de papa-formigas da família Thamnophilidae; portanto, nenhuma espécie de *Isospora* é registrada das famílias Conopophagidae e Melanopareiidae até agora. Como mostrado na tabela 9, *I. borbai* é facilmente diferenciado destas duas *Isospora* spp. de Thamnophilidae, devido ao seu tamanho menor, forma subsférica, micrópilas e camada externa áspera da parede do oocisto.

**Análise filogenética:** Amplificação de DNA de um oocisto individual de *I. borbai* recuperado de um *C. melanops* do PNI apresentou uma faixa clara de c.250 bp. A análise filogenética incluiu 36 seqüências para *Isospora* spp. disponível no GenBank (Figura 17). *E. tenella* foi usada como grupo externo. A *I. borbai* estava em um clado com a maior similaridade de 99,0-99,5% com *I. lopesi* (SILVA-CARVALHO et al. 2018a), *I. sagittulae* (SILVA-CARVALHO et al. 2018b). e *Isospora sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro e Lopes, 2005 (RODRIGUES et al. 2018) (Figura 16). Em uma segunda análise, um subconjunto de seqüências do gene COI de 215 pares de bases para 14 *Isospora* spp. foi utilizado (Figura 17). Nesta análise, *I. borbai* foi novamente agrupada com *I. lopesi*, *I. sagittulae* e *I. sporophila*, próxima ao outro clado com *I. hypoleucae* (DOLNIK et al. 2009b) e *Isospora* isoladas de toutinegra-de-barrete-preto *S. atricapilla* (DOLNIK et al. 2009a) com semelhanças de 95,7% e 94,8-97,1%, respectivamente.



**Figura 14.** Desenho de linha composto do oocisto esporulado de *Isospora borbai* de *Conopophaga* spp. Barra de escala: 10  $\mu$ m.



**Figura 15.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora borbai* de *Conopophaga* spp. Abreviaturas: camadas interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto; micrópula (m); grânulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); esporozoíto (sz); corpo refrátil (rb). Tudo para a mesma escala. Barra de escala: 10  $\mu$ m

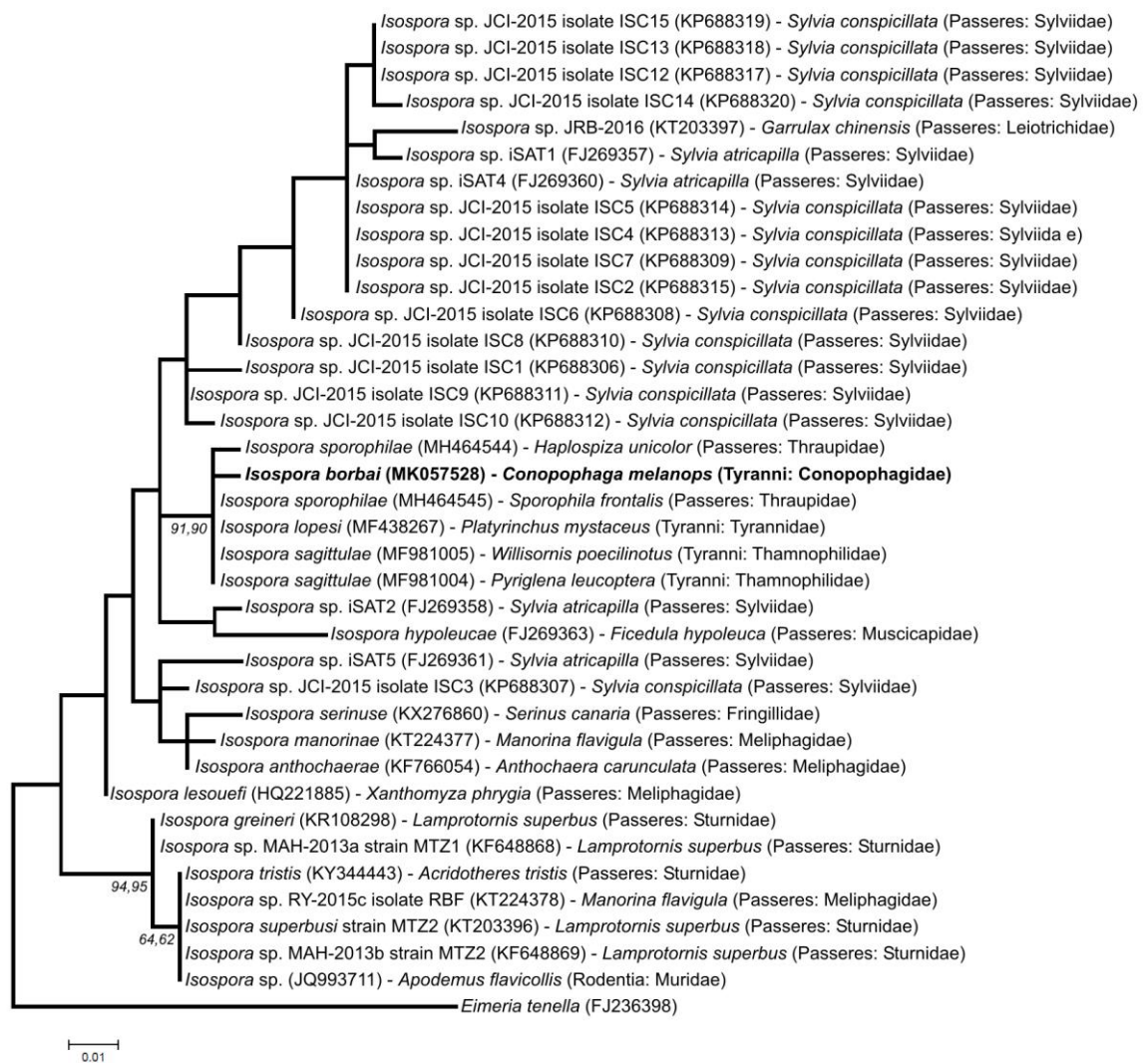


**Tabela 9.** Morfologia comparativa de espécies do gênero *Isoospora* recuperadas a partir da parvorder Thamnophilida.

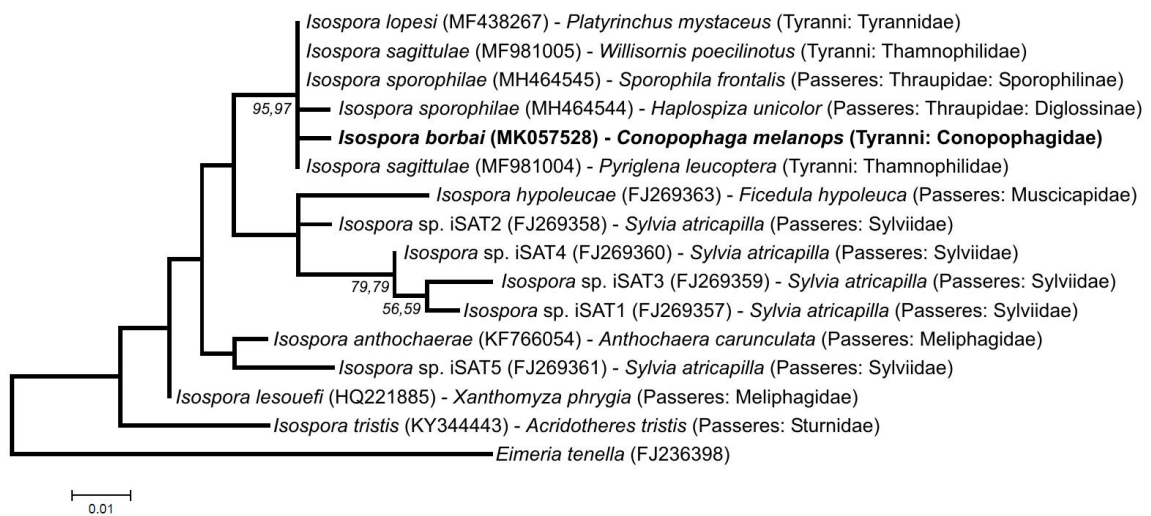
Coccídios	Espécies	Família	Referencias	Oocistos			Esporocistos					Resíduo		
				Forma	Diâmetros (µm)	Índice Morfo métrico	Parede	Grânulo polar	Forma	Diâmetros (µm)	Índice Morfo métrico		Corpo de Stieda	Corpo de substieda
	<i>Hylophylax naevioides</i> (Lafresnaye, 1847)	Thamno philidae	McQuiston e Capparella (1992)	ovoide a elipsoide	25–30 × 21–24 (27.5 × 21.8)	1.27	bicamada, presente, lisa	1-3	subesférico a ovoide	13–16 × 12–13 (14.8 × 12.4)	1.19	presente, fino e denso	presente, triangular	difuso
	<i>Gymnopithys salvini</i>													
<i>Isoospora sagittulae</i>	(Berlepsch, 1901); McQuiston, Capparella, 1992	Thamno philidae	Berto et al. (2014b)	ovoide a elipsoide	27–31 × 20–24 (28.4 × 22.4)	1.27	bicamada, presente, lisa	1-3	subesférico a ovoide	13–17 × 12–14 (15.0 × 12.6)	1.2	fino e acahtado, 0.5 × 2.0	triangular a arredondado, 2.5 × 5.0	difuso
	<i>Willisornis poecilinotus</i> (Cabanis, 1847)													
	<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1818)	Thamno philidae	Silva-Carvalho et al. (2018b)	ovoide a elipsoide	29–33 × 22–26 (30.8 × 24.4)	1.27	bicamada, presente, lisa	1-3	subesférico a ovoide	14–17 × 12–15 (15.9 × 13.4)	1.19	fino e achatado, 0.5 × 2.0	triangular a arredondado, 2.5 × 5.0	difuso
<i>Isoospora parnaitatiaiensis</i>	<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1818)	Thamno philidae	Silva et al. (2016)	elipsoide	22–27 × 18–21 (23.8 ×	1.23	bicamada, presente, lisa	1-2	elipsoide	13–16 × 8–10 (14.6 ×	1.6	mamilifor me a forma de botão,	arredondado a retangular, 1.5 × 2.0	compacto

Luz, Ferreira, Lopes, 2016				19.4)				9.3)		1.0 × 2.0
	<i>Conopophag</i>									
	<i>a melanops</i>									
<i>Isohora borbai</i>	(Vieillot,	Conopo	corrente	17–22 ×				12–15 ×		forma de
Silva-Carvalho	1818);	phagida	estudo	15–22	1.06	bicamada, presente,		8–11		botão a
e Berto	<i>Conopophag e</i>			(20.2 ×		áspera 1-2	elipsoide	(14.1 ×	1.56	forma de arredondado,
	<i>a lineata</i>			19.1)				9.1)		meia lua, difuso
	(Wied, 1831)									2.0 × 3.5
										1.0 × 2.5

---



**Figura 16.** Árvore de ML estimada a partir das sequências COI. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.



**Figura 17.** Árvore de ML estimada a partir do conjunto de dados de sequenciamento COI de 215 pares de bases para espécies do gênero *Isospora*. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

#### 4.7.2. Caracterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de *Isospora borbai*

Até o presente momento, *I. borbai* é a primeira espécie de coccídio a ser registrada da família Conopophagidae. Portanto, no trabalho atual, a diretriz de Duszynski e Wilber (1997) para comparação de novos coccídios com outros registrados a partir da mesma família hospedeira foi estendida para o nível de parvorder. Nesse sentido, *I. borbai* foi comparada a *I. sagittulae* e *I. parnaitatiaiensis*, que são as únicas espécies de coccídios registradas na parvorder Thamnophilida, especificamente da família Thamnophilidae (Tabela 9). Em qualquer caso, os oocistos de *I. borbai* são bastante distintos, porque eles têm uma parede áspera com uma micrópola, que são características incomuns em espécies de *Isospora*.

A análise filogenética (Figuras 16 e 17) reúne *I. borbai* com *I. sagittulae*, que também é parasito da parvorder Thamnophilida, e *I. lopesi*, parasito do patinho *P. mystaceus*, que também pertencem ao grupo suboscines (subordem Tyranni). Em contraste, esta abordagem padrão relacionada a grupos taxonômicos de hospedeiros é incompatível com a presença dos genótipos de *I. sporophila* neste grupo monofilético; visto que este coccídio é o parasito de pixoxó *Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869) e cigarra-bambu *Haplospiza unicolor* Cabanis, 1851, que são Passeriformes da família Thraupidae e suborder Passeri. Assim, essa análise

filogenética mantém a hipótese levantada em Rodrigues et al. (2018) que este grupo monofilético está relacionado com coccídios de aves neotropicais, e não necessariamente relacionado a grupos taxonômicos de hospedeiros.

Finalmente, com base nas características morfológicas e moleculares descritas acima, *I. borbai* é considerada nova para a ciência e a primeira espécie de coccídio registrada a partir de chupa-dente (Conopophagidae).

#### 4.8. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Isospora parnaitatiaiensis* (CHROMISTA: MIOZOA: EIMERIIDAE) DO PAPA-TAOCA-DO-SUL *Pyriglena leucoptera* E DA CHOQUINHA-LISA *Dysithamnus mentalis* (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE) NA AMÉRICA DO SUL

A família Thamnophilidae Swainson, 1824 é composta por pássaros de pequeno porte frequentemente observados capturando formigas e outros artrópodes na vegetação densa. Devido a este comportamento insetívoro, eles são considerados "papa-formigas". Na América do Sul, duas grandes áreas de distribuição desta família são os biomas de Mata Atlântica e Amazônia (WIENS, 1989; ZIMMER; ISLER, 2003).

Os pássaros podem ser parasitados por diversos parasitas, tanto de superfície, sangue ou intestinais, sendo os protozoários coccídios do gênero *Isospora* os mais frequentemente relatados de pássaros. Entretanto, até recentemente a única espécie de *Isospora* descrita infectando taminofilídeos foi *I. sagittulae* parasitando *H. naevioides*, no Equador. Essa espécie foi posteriormente relatada de *O. salvini* e *W. poecilotus* na Amazônia Brasileira, e, muito recentemente, de *P. leucoptera* na Mata Atlântica, revelando que esta espécie tem uma ampla distribuição na região Neotropical (MCQUISTION; CAPPARELLA, 1992; BERTO et al., 2014; SILVA-CARVALHO et al., 2018).

A espécie *I. parnaitatiaiensis* tornou-se a segunda espécie de *Isospora* de Thamnophilidae ao ser descrita parasitando o papa-taoca-do-Sul *P. leucoptera* no PNI, uma unidade de conservação no Sudeste Brasileiro e, no trabalho atual, essa mesma espécie coccidiana é identificada de choquinha-lisas *D. mentalis* e também *P. leucoptera* em sua localidade-tipo, o PNI, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar por sequenciamento do gene COI.

#### 4.8.1. Prevalência e identificação de *Isospora parnaitatiaiensis*

Um total de 41 *P. leucoptera* e 37 *D. mentalis* foram examinados e 24 foram positivos (15 *P. leucoptera* e 9 *D. mentalis*) para oocistos coccidianos que foram identificados morfológicamente como *I. parnaitatiaiensis* (Figura 18). Este material é descrito abaixo.

**Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981**

**Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987**

**Infracilo: Apicomplexa Levine, 1970**

**Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901**

**Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879**

**Família: Eimeriidae Minchin, 1903**

**Gênero: *Isospora* Schneider, 1881**

***Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015**

Oocistos subesféricos a elipsoides, medindo  $20-31 \times 17-25$  ( $25,3 \times 21,1$ )  $\mu\text{m}$ , com índice morfométrico de 1,0-1,5 (1,21). Parede do oocisto dupla e lisa, medindo 1,1-1,8 (1,5)  $\mu\text{m}$ . Micrópila e resíduo do oocisto ausentes. Grânulo polar presente variando em número de 1 a 3. Esporocistos elipsoides, medindo  $13-20 \times 8-11$  ( $16,0 \times 9,8$ )  $\mu\text{m}$ , com índice morfométrico de 1,5-1,9 (1,63). Corpo de Stieda em forma de mamilo ou botão, medindo  $1,0-1,4 \times 1,9-2,5$  ( $1,1 \times 2,1$ )  $\mu\text{m}$ . Corpo de substieda arredondado a retangular irregular, medindo  $1,2-2,1 \times 2,2-3,2$  ( $1,8 \times 2,7$ )  $\mu\text{m}$ . Corpo de parastieda ausente. Resíduo do esporocisto presente, geralmente como uma massa ovoide a elipsoide contendo inúmeros pequenos grânulos que parecem ser delimitados por uma membrana. Esporozoítos vermiformes, com corpos refráteis anterior e posterior e um núcleo centralmente localizado.

#### 4.8.2. Resumo Taxonômico

**Hospedeiros:** O papa-taoca-do-Sul *P. leucoptera*; e a choquinha-lisa *D. mentalis* (Aves: Passeriformes: Tyranni: Thamnophilidae).

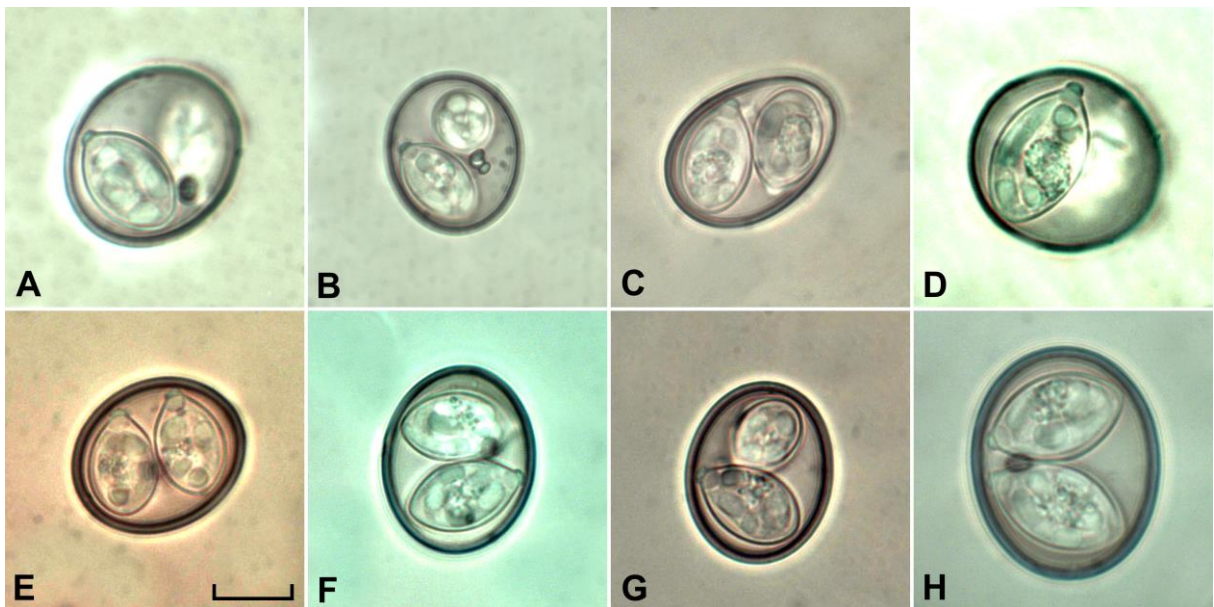
**Localidade:** Parque Nacional do Itatiaia - Parque Nacional do Itatiaia (22°27'S, 44°36'W).

**Espécimes:** Fotomicrografias, desenhos e oocistos recuperados de *D. mentalis* em solução de  $K_2Cr_2O_7$  a 2,5% foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2019020. As fotomicrografias também foram depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção Parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o número de repositório 103/2019. As fotografias dos hospedeiros foram depositadas na mesma coleção.

**Sequência de DNA representativa:** a amplificação do DNA do gene COI mostrou bandas em torno de 250 pares de bases. As seqüências representativas para *D. mentalis* e *P. leucoptera* foram depositadas no banco de dados GenBank sob os respectivos números de acesso MT233550 e MT233551.

**Local da infecção:** Desconhecido.

**Prevalência:** 31% (24/78) no total; 37% (15/41) para *P. leucoptera*; e 24% (9/37) para *D. mentalis*.



**Figura 18.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora parnaitaiensis* recuperados de *Pyriglena leucoptera* (A-D) e *Dysithamnus mentalis* (E-H). Escala = 10  $\mu$ m.

### 4.8.3. Observações

A morfometria dos oocistos de *Isospora* spp. descritas em Thamnophilidae e dos oocistos de *I. parnaitataiensis* recuperados de *P. leucoptera* e *D. mentalis*, neste estudo, podem ser visualizadas nas tabelas 10 e 11.

Na figura 18, observa-se que os oocistos obtidos de *P. leucoptera* e *D. mentalis* possuem as mesmas características morfológicas, as quais coincidem com a descrição original de *I. parnaitataiensis* (tabela 10). Além dessa, a única espécie descrita em Thamnophilidae é *I. sagittulae*, que foi descrita originalmente em *H. naevioides* no Equador e, posteriormente, relatada de *O. salvini*, *W. poecilnotus* e *P. leucoptera* (MCQUISTION; CAPPARELLA 1992; BERTO et al. 2014b; SILVA-CARVALHO et al., 2018). *I. sagittulae* (Tabela 10) difere de *I. parnaitataiensis* tendo oocistos maiores com esporocisto subesférico a ovoide e corpo de Stieda fino e achatado. Portanto, essa espécie é facilmente distinguida de *I. parnaitataiensis*.

O estudo morfométrico (Tabela 11) demonstrou que os oocistos de *D. mentalis* foram estatisticamente maiores e mais subesféricos que os da descrição original e atual de *P. leucoptera*. Em contra-partida os esporocistos foram equivalentes em todos os aspectos morfométricos (Tabela 11). A regressão linear (Figura 19) reproduziu graficamente os resultados do estudo morfométrico, além de evidenciar o polimorfismo de *I. parnaitataiensis* obtidos dos dois hospedeiros devido aos baixos valores de  $R^2$ .



**Tabela 10.** Comparação morfológica de espécies do gênero *Isospora* descritas de Thamnophilidae no Novo Mundo.

Coccídios	Hospedeiros	Referencias	Oocisto			Esporocisto			Corpo de Stieda	Corpo de substieda	Resíduo	
			Forma	Diâmetros (µm)	Índice morfométrico	Grânulo polar	Forma	Diâmetros (µm)				Índice morfométrico
<i>Isospora sagittulae</i> McQuistion, Capparella, 1992	<i>Hylophylax naevioides</i> Lafresnaye, 1847	McQuistion & Capparella (1992)	ovoide a elipsoide	25-30 × 21-24 (27,5 × 21,8)	1,27 (1,3-1,4)	presente 1-3	sub-esférico a ovoide	13-16 × 12-13 (14,8 × 12,4)	1,19 (1,1-1,3)	presente, fino e denso	presente triangular	difuso
	<i>Gymnopathys salvini</i> Berlepsch, 1901;	Berto et al. (2014b)	ovoide a elipsoide	27-31 × 20-24 (28,4 × 22,4)	1,27 (1,1-1,4)	presente 1-3	sub-esférico a ovoide	13-17 × 12-14 (15,0 × 12,6)	1,2 (1,1-1,3)	fino e achatado, 0,5 × 2,0	triangular a arredondado, 2,5 × 5,0	difuso
	<i>Willisornis poecilinotus</i> Cabanis, 1847	Silva-Carvalho et al. (2018)	ovoide a elipsoide	29-33 × 22-26 (30,8 × 24,4)	1,27 (1,2-1,5)	presente 1-3	sub-esférico a ovoide	14-17 × 12-15 (15,9 × 13,4)	1,19 (1,1-1,3)	fino e achatado, 0,5 × 2,0	triangular a arredondado, 2,5 × 5,0	difuso
<i>Isospora parnaitatiaiensis</i> Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015	<i>P. leucoptera</i>	Silva et al. (2015)	elipsoide	22-27 × 18-21 (23,8 × 19,4)	1,23 (1,1-1,5)	presente 1-2	elipsoide	13-16 × 8-10 (14,6 × 9,3)	1,6 (1,5-1,7)	forma de mamilo ou botão, 1,0 × 2,0	arredondado a retangular 1,5 × 2,0	compacto
	<i>P. leucoptera</i> ; <i>Dysithamnus mentalis</i> Temminck, 1823	corrente estudo	sub-esférico a elipsoide	20-31 × 17-25 (25,3 × 21,1)	1,21 (1,0-1,5)	presente 1-3	elipsoide	13-20 × 8-11 (16,0 × 9,8)	1,63 (1,5-1,9)	forma de mamilo ou botão, 1,1 × 2,1	arredondado a retangular irregular, 1,8 × 2,7	compacto

<sup>a</sup> Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05) pela ANOVA.

**Tabela 11.** Morfometria de oocistos de *Isospora parnaitataiensis* recuperados de Thamnophilidae do sudeste do Brasil.

Hospedeiro	n <sup>I</sup>	Oocistos			Regressão linear		Esporocistos		Regressão linear		
		Diâmetro maior (µm)	Diâmetro menor (µm)	IM <sup>II</sup>	R <sup>2</sup> <sub>III</sub>	Equação (y =) <sup>IV</sup>	Diâmetro maior (µm)	Diâmetro menor (µm)	IM	R <sup>2</sup>	Equação (y =)
<i>Pyriglena leucoptera</i>	77	24.9 (21-28) <sup>a</sup>	20.1 (17-24) <sup>a</sup>	1.24 (1.0-1.5) <sup>a</sup>	0.16	0.3121x + 12.356	15.9 (13-20) <sup>a</sup>	9.8 (8-11) <sup>a</sup>	1.63 (1.5-1.9) <sup>a</sup>	0.53	0.3723x + 3.833
<i>Dysithamnus mentalis</i>	84	25.8 (20-31) <sup>b</sup>	21.9 (18-25) <sup>b</sup>	1.18 (1.0-1.3) <sup>b</sup>	0.44	0.5276x + 8.3547	16.1 (14-19) <sup>a</sup>	9.9 (8-11) <sup>a</sup>	1.63 (1.5-1.9) <sup>a</sup>	0.27	0.249x + 5.8477

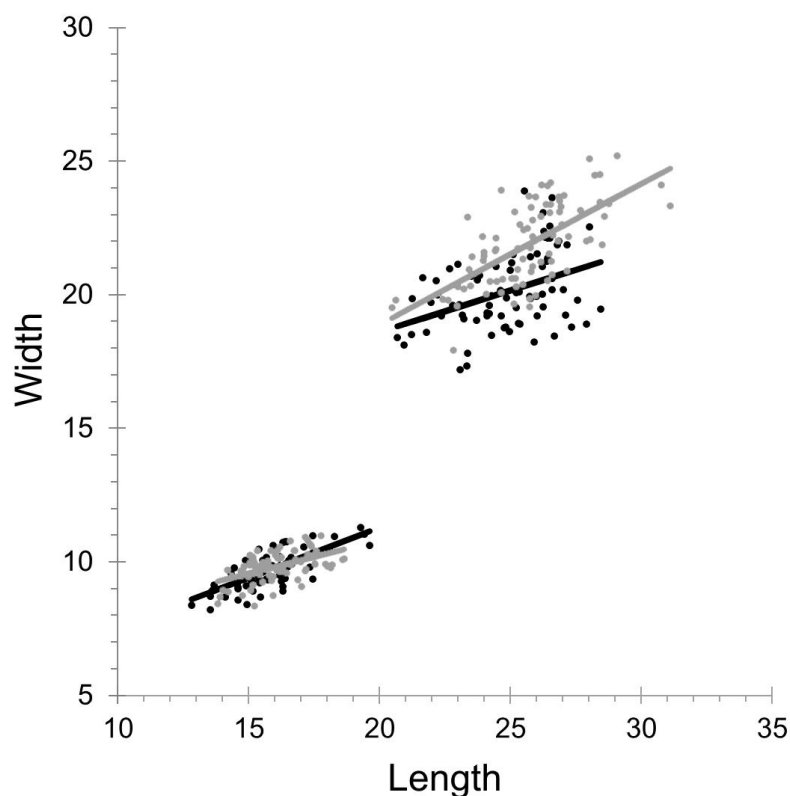
<sup>a</sup> Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (P <0,01) pela ANOVA.

<sup>I</sup> Número total de oocistos medidos.

<sup>II</sup> Índice morfométrico

<sup>III</sup> Coeficiente de determinação.

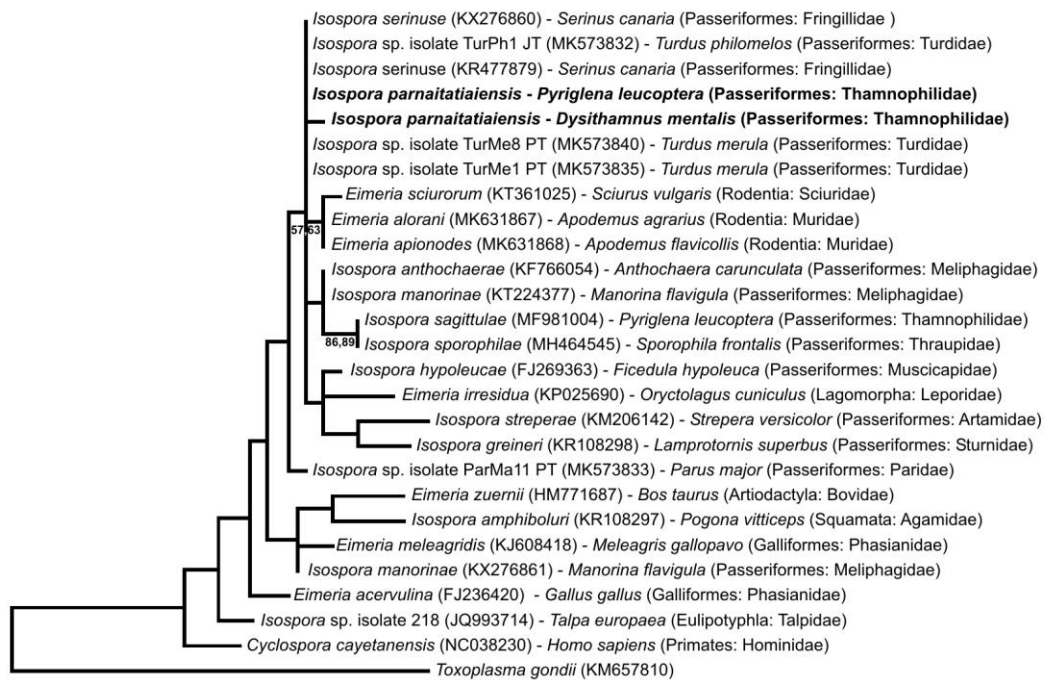
<sup>IV</sup> Equação da reta de regressão.



**Figura 19.** Regressão linear comparativa das dimensões dos oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isospora parnaitatiaiensis* recuperados de dois hospedeiros distintos: *Pyriglena leucoptera* (preto) e *Dysithamnus mentalis* (cinza).

#### 4.8.4. Análise filogenética

A análise filogenética baseada no gene COI incluiu sequências de coccídios eimeriídeos disponíveis no GenBank (Figura 20). *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) Nicolle e Manceaux, 1909 foi usada como grupo externo. Na análise filogenética, *I. parnaitatiaiensis* de *P. leucoptera* e *D. mentalis* apresentaram similaridade de 97,1%, ou a substituição de 5 nucleotídeos, e foram recuperadas em um clado com maior semelhança de 98,5% com *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot, Ryan, 2015 de canários *S. canaria*.



**Figura 20.** Árvore de ML estimada a partir das sequências COI. Os números nos representam o suporte de Bootstrap (1.000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para NJ e ML, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

#### 4.8.5. Caracterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética dos oocistos de *Isospora parnaitatiaiensis*

Os resultados morfológicos indicam que os oocistos de *I. parnaitatiaiensis* são visivelmente polimórficos nas características do esporocisto, corpo de Stieda e substieda. Em nenhum desses casos pôde-se observar um determinado padrão em uma amostra e/ou hospedeiro, uma vez que estes padrões foram observados na mesma amostra e, algumas vezes, no mesmo oocisto (Figura 18). Este polimorfismo expõe a importância e a complexidade da identificação de espécies de coccídios.

A ANOVA realizada (Tabela 11) resultou em diferenças significativas nos aspectos morfométricos associados aos oocistos. Observando as médias e limites dos diâmetros maiores e índices morfométricos pode-se concluir que os oocistos obtidos de *P. leucoptera*

foram menores e mais elipsoides do que os do novo hospedeiro *D. mentalis* (BERTO et al. 2014). Nesse sentido, poderia-se sugerir a possibilidade de duas espécies de *Isospora* distintas, cada uma parasitando um hospedeiro específico. No entanto, nas comparações morfométricas dos esporocistos, observaram-se equivalências em todos os aspectos morfométricos.

Estas diferenças significativas entre aspectos morfométricos dos oocistos são relatadas e relacionadas a fatores ambientais desde a década de 80 (FAYER, 1980), e em inúmeros trabalhos posteriores, incluindo, *I. lacazei* do pardal *P. domesticus*, na província de Córdoba, Espanha (GOMEZ et al., 1982), *E. opimi*, de tuco-tucos *Ctenomys* spp., na Bolívia (GARDNER; DUSZYNSKI, 1990), *T. parvula* de gansos cinzento *A. anser* (BERTO et al. 2008e), *Isospora sabiai* Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes, Berto, 2017 e *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira, Lopes, 2014 de sabiás do sudeste do Brasil (PINHO et al. 2017; GENOVEZ-OLIVEIRA et al. 2019). Vários fatores podem ter influenciado na existência do polimorfismo observado: (1) estresse, (2) nutrição, (3) imunidade do hospedeiro, (4) dose infectante (FAYER 1980, JOYNER 1982), (5) tempo de descarga dos oocistos durante o período patente (DUSZYNSKI, 1971; CATCHPOLE et al., 1975; JOYNER, 1982), e (6) plasticidade fenotípica, quando um coccídio ativa diferentes fenótipos em resposta ao seu ambiente (PARKER; DUSZYNSKI, 1986; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990).

Nesse sentido, pode-se supor que as condições ambientais encontradas no PNI, como: temperatura, umidade, altitude, período de muda e reprodução, pluviosidade e os impactos ambientais do deflorestamento no entorno do PNI podem ter influenciado na distribuição dos coccídios e nos parâmetros de eliminação dos oocistos de diferentes hospedeiros ou de mesmos hospedeiros submetidos a condições ambientais distintas.

Pode-se ainda supor que *I. parnaitatiaiensis* em *P. leucoptera* e *D. mentalis*, estejam em processo de especiação adaptando-se a esses respectivos hospedeiros, onde estaríamos verificando uma tendência inicial dos oocistos em *D. mentalis* serem mais subesféricos. No entanto, como esses hospedeiros, embora não tenham biótopos exatamente iguais, habitem o mesmo ambiente, infecções cruzadas e, assim, retrocruzamentos entre coccídios desses diferentes hospedeiros devem ocorrer. Essa suposição de polimorfismo por especiação aos diferentes hospedeiros foi introduzida por Gardner e Duszynki (1998) para os oocistos de *E. opimi*. Neste trabalho seis espécies de tuco-tucos do gênero *Ctenomys* de localidades e habitat diferentes da Bolívia foram analisados. Estes hospedeiros não compartilham o mesmo habitat

e são distribuídos de maneira bastante individual, porém no trabalho foi concluído que compartilham uma única espécie de coccídio, *E. opimi*. Devido a ampla distribuição geográfica, a grande diversidade taxonômica e a variação cromossômica dentro de Ctenomyidae, foi sugerido que a especiação de *E. opimi* está ativa e em desenvolvimento intenso. Segundo esses autores, *E. opimi* representa uma espécie primitiva de parasita infectando o clado da família Ctenomyidae, o qual tem conservado as características morfológicas de seus oocistos, porém apresenta polimorfismo devido a adaptação/especiação às diferentes espécies de *Ctenomys* e em *E. caviae* (FLAUSINO et al. 2014). Essas mesmas observações foram feitas para o polimorfismo de *I. sabiai* e *I. massardi* de *Turdus* spp. também no PNI (PINHO et al. 2017; GENOVEZ-OLIVEIRA et al. 2019). Nesses trabalhos, os oocistos das espécies hospedeiras com nichos ecológicos mais específicos, e por isso, mais isoladas no PNI foram mais diferentes morfometricamente. Nesse sentido, as diferenças morfométricas observadas nos oocistos dos hospedeiros isolados foram potencialmente justificadas pelo desfavorecimento da transmissão, o qual conseqüentemente favorece o processo de especiação na co-evolução parasita-hospedeiro (GENOVEZ-OLIVEIRA et al. 2019; BERTO; LOPES, 2020).

Os valores de  $R^2$  obtidos na regressão linear comparativa foram baixos, reafirmando o polimorfismo dos oocistos de *I. parnaitatiaiensis* (Figura 19, Tabela 11). Conforme a abordagem de BERTO et al. (2014b), a localização acima e mais inclinada da reta de regressão dos oocistos obtidos de *D. mentalis* demonstram que seus oocistos foram maiores e mais subsféricos em relação àqueles obtidos de *P. leucoptera*. Em contrapartida, na distribuição das medidas dos esporocistos pôde-se observar plena compatibilidade nas dimensões dos esporocistos recuperados dos dois hospedeiros de *I. parnaitatiaiensis*, uma vez que as retas e os pontos mantiveram-se próximos ou sobrepostos (BERTO et al. 2014b).

O estudo molecular dos oocistos resultou em diferença genotípica de 2,9% entre as seqüências do gene COI obtidas dos dois hospedeiros de *I. parnaitatiaiensis*, ou simplesmente a substituição de 5 nucleotídeos. Corroborando os resultados da ANOVA e da regressão linear, essa diferença deve estar relacionada às diferenças morfométricas observadas no tamanho e forma dos oocistos e, conseqüentemente associada a um processo de adaptação às espécies hospedeiras, ou seja, especiação. De qualquer forma, as diferenças morfológicas, morfométricas e genotípicas não foram consideradas suficientes para descrever uma nova espécie de *D. mentalis*, talvez apenas genótipos/morfotipos de *P. leucoptera* e *D. mentalis*.

A análise filogenética baseada nas seqüências do gene COI (Figura 20) revelou a monofilia de *I. parnaitataiensis* de *P. leucoptera* e *D. mentalis* com *Isospora* spp. de canários e sabiás, os quais são hospedeiros filogeneticamente próximos; entretanto, *I. parnaitataiensis* foi também próxima nesta monofilia com *Eimeria* spp. de roedores numa similaridade de 94-95%, os quais esperava-se estarem mais distantes na filogenia devido as diferenças morfológicas, biológicas e ecológicas destes coccídios e hospedeiros. Ao mesmo tempo, outras *Isospora* spp. de Passeriformes foram distantes na filogenia, tais como: (1) *I. parnaitataiensis* e *I. sagittulae*, as quais são registradas de mesmo hospedeiro *P. leucoptera* e localidade, o PNI; e (2) *Isospora manorinae* Yang, Brice, Jian, Ryan, 2016 de *Manorina flavigula* (Gould, 1840), que nas suas duas sequencias depositadas diferem em 8%, ou 59 pares de bases. Nestes dois casos, observa-se espécies de coccídios potencialmente próximas entre si, porém que se localizaram em grupos distintos e distantes na análise filogenética. Sendo assim, torna-se inviável fazer qualquer suposição filogenética com relação as *Isospora* spp. de Passeriformes, talvez devido a uma pequena quantidade de espécies sequenciadas e depositadas e/ou a inadequação do gene COI para estudos filogenéticos em *Isospora* spp. de Passeriformes.

Em conclusão, *I. parnaitataiensis* é identificada morfolologicamente e molecularmente neste trabalho, registrando um novo hospedeiro, *D. mentalis*, além do hospedeiro-tipo *P. leucoptera* no PNI.

## 5. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados pôde-se concluir que:

1. Pássaros das famílias *Thamnophilidae*, *Tyrannidae*, *Conopophagidae* e *Icteridae* são hospedeiros de diversas espécies de coccídios, em um nível de especificidade limitado a família de *Passeriformes*, no PNI, além de outras localidades na Região do Médio Paraíba Fluminense.
2. *Isospora guaxi* é descrita como nova espécie, sendo o sexto coccídio isosporóide relatado de um pássaro icterídeo. Além disso, *C. haemorrhous* é registrado como um novo hospedeiro para *I. bellicosa*.
3. *Isospora lopesi* é descrita como nova espécie, sendo a quarta espécie isosporóide relatada de um pássaro tiranídeo na Região Neotropical e a primeira a ser identificada molecularmente pelo sequenciamento do gene COI.
4. *Isospora sagittulae* é identificada de *P. leucoptera* no sudeste do Brasil, evidenciando a ampla dispersão de *I. sagittulae* desde a região transandina, passando pela Amazônia até a Mata Atlântica brasileira.
5. *Isospora borbai* é considerada nova para a ciência e a primeira espécie de coccídio registrada a partir da família *Conopophagidae*.
6. *Isospora parnaitatiaiensis* é identificada morfológicamente e molecularmente, registrando-se um novo hospedeiro, *D. mentalis*, além do hospedeiro-tipo *P. leucoptera* no PNI.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G. R.; BERTO, B. P.; CATENACCI, L.; NOGUEIRA, S. S. C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; LOPES, C. W. G. Eimerid coccidia from capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in southern Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p.323-328, 2008.
- AVENDAÑO, J. E.; CORTÉS-HERRERA, J. O.; BRICENˆO-LARA, E. R.; RINCÓN-GUARÍN, D. A. Crossing or bypassing the Andes: a commentary on recent range extensions of cis- Andean birds to the West of the Andes of Colombia. *Orinoquia*, v.17, p.207-214, 2013.
- AXIMOFF, I.; Rodrigues, R. C. Histórico dos incêndios florestais no Parque Nacional do Itatiaia. *Ciência Florestal*, v. 21, p. 83-92, 2011.
- AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. *BioStat: aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas*. Belém: Universidade Federal do Pará, 2007.
- BALL, S. J.; PITTILO, R. M.; LONG, P. L. Intestinal and extraintestinal life cycles of eimeriid coccidia. *Advances in Parasitology*, v. 28, p. 1-54, 1989.
- BARRETO, C. G.; CAMPOS, J. B.; ROBERTO, D. M.; ROBERTO, D. M.; TEIXEIRA, N.; ALVES, G. S. G; COELHO, W. *Plano de manejo Parque Nacional do Itatiaia – Análise da unidade de conservação*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2013.
- BARROS, W. D. *Parque Nacional do Itatiaia. Serviço de Informação Agrícola*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 1955.
- BARTA, J. R.; SCHRENZEL, M. D.; CARRENO, R.; RIDEOUT, B. A. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. *Journal of Parasitology*, v. 91, p.726-727, 2005.
- BARTH, R. *A Fauna do Parque Nacional do Itatiaia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Boletim de pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia, 1957.
- BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. P. The coccidian oocysts: a tough nut to crack! *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 416-423, 2006.

- BENCKE, G. A.; DIAS, R. A.; BUGONI, L.; AGNES, C. E.; FONTANA, C. S.; MAURÍCIO, G. N. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*, v. 100, p. 519-556, 2010.
- BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 54, p. 301-304, 2009b.
- BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. Two new *Isospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. *Parasitology Research*, v. 105, p. 635-639, 2009d.
- BERTO B. P.; LUZ H. B.; FLAUSINO W.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, v. 74, p. 75-80, 2009a.
- BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buffyfronted seedeater *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Passeriformes: Emberizidae) from South America. *Systematic Parasitology*, v. 73, p. 65-69, 2009c.
- BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Two New Coccidian Parasites of Green-Winged Saltator (*Saltator similis*) from South America. *Acta Protozoologica*, v. 47, p. 263-267, 2008b.
- BERTO, B. P.; BORBA, H. R.; LIMA, V. M.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. *Eimeria* spp. from Japanese quails (*Coturnix japonica*): new characteristic features and diagnostic tools. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 1441-1447, 2013a.
- BERTO, B. P.; CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; FERREIRA, A. M. R.; LOPES, C. W. G. Aflatoxin effect on the oocysts morphometry and contribution on the morphology of *Eimeria bateri* Bhatia, Pandey and Pande, 1965 of the Japanese quail *Coturnix japonica*, in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 235-238, 2008c.
- BERTO, B. P.; FERREIRA, I.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. *Isospora canaria* Box, 1975 (Apicomplexa: Eimeriidae) from canaries *Serinus canaria* Linnaeus (Passeriformes: Fringillidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, v. 85, p. 49-53, 2013b.

- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 conditioned in two distinct sites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 30, p. 215-219, 2008e.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Eimeria divinolimai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the Rufous casinornis *Casiornis rufus* Vieillot, 1816 (Passeriformes: Tyrannidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 33-35, 2008d.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Three New Coccidian Parasites of Brazilian Tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) from South America. *Acta Protozoologica*, v. 47, p. 77-81, 2008a.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; MCINTOSH, D.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, v. 80, p. 159-204, 2011a.
- BERTO, B. P.; LOPES, B. do B.; MELINSKI, R. D.; de SOUZA, A. H. N.; RIBAS, C. C.; de ABREU, I. F. H. T.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Coccidial dispersion across trans- and cis-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isoospora sagittulae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from nonsympatric hosts. *Canadian Journal of Zoology*, v. 92, p. 383-388, 2014a.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, 2019. [no prelo].
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In: RUIZ L.; IGLESIAS, L. (Eds.). *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease*. Nova Science Publishers: New York, 2013. 47-66 p.
- BERTO, B. P.; LUZ, H. R. *Parasitas de Aves Silvestres do Parque Nacional do Itatiaia*. 25. ed. Rio de Janeiro: Boletim de pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia, 2016.
- BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Two new hosts for *Isoospora tiesanguui* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 32, p. 168-171, 2010.
- BERTO, B. P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. Studies on coccidian oocysts

- (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, p. 1-15, 2014b.
- BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Isosporoid coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) parasites of tanagers (Passeriformes: Thraupidae) from the Marambaia Island, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, p. 798-805, 2011b.
- BIERREGAARD, J. R. O.; STOUFFER, P. C. Understory birds and dynamic habitat mosaics in Amazonian rainforest, *In*: LAURANCE, F. W.; BIERREGAARD, J. R. O. (Eds.). *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. Chicago: The University of Chicago press, 1997. p. 138-154.
- BIRD, D. M. *The Bird Almanac: A Guide to Essential Facts and Figures of the World's Birds*. Richmond Hill: Firefly Books, 2004.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015. Disponível em: <<http://www.birdlife.org>>. Acesso em: 13 maio 2016.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016. The IUCN red list of threatened species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 23 set. 2018.
- BLAKE, E. R. Family Icteridae. *In*: Paynter, R. A. Jr. (Ed.). *Check-list of Birds of the World*. Cambridge: Museum of Comparative Zoology, 1968. p. 138-202
- BOUGHTON, D. C.; BOUGHTON, R. B.; VOLK, J. Avian hosts of the genus *Isospora* (Coccidiida). *Ohio Journal of Science*, v. 38, p. 149-163, 1938.
- BOULARD, Y.; LANDAU, I.; GRULET, O.; BACCAM, D. Ultrastructure of chronic reticuloendothelial forms of *Isospora* of sparrows. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 62, p. 181-184, 1987.
- BOX, E. D. *Atoxoplasma* associated with an isosporan oocyst in canaries. *Journal of Protozoology*, v. 17, p. 391-396, 1970.
- BOX, E. D. Blood and tissue protozoa of the English sparrow (*Passer domesticus domesticus*) in Galveston, Texas. *Journal of Protozoology*, v. 13, p. 204-208, 1966.
- BOX, E. D. Exogenous stages of *Isospora serini* (Aragao) and *Isospora canaria* sp. n. in the canary (*Serinus canarius* Linnaeus). *Journal of Protozoology*, v. 22, p. 165-169, 1975.

- BOX, E. D. Influence of *Isospora* infections on potency of avian *Lankesterella* (*Atoxoplasma* Garhnam, 1950). *Journal of Parasitology*, v. 53, p. 1140-1147, 1967.
- BOX, E. D. *Isospora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. *Journal of Protozoology*, v. 28, p. 244-246, 1981.
- BOX, E. D. Life cycles of two *Isospora* species in the canary, *Serinus canarius* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, v. 24, p. 57-67, 1977.
- BRANDÃO, J. L. G. *O Conservacionismo em Ação: o Parque Nacional de Itatiaia e a Administração de Wanderbilt Duarte de Barros (1943-1957)*. 28. ed. Rio de Janeiro: Boletim de pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia, 2017.
- BRANDS, S. J. *Systema Naturae 2000, The Taxonomicon*, Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands, 2017. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl>>. Acesso em: 13 nov. 2017.
- BRAWNER, W. R.; HILL, G. E. Temporal variation in shedding of coccidial oocysts: implications for sexual-selection studies. *Canadian Journal of Zoology*, v. 77, p. 347-350, 1999.
- BROOKS, D. R.; MCLENNAN D. A. *Phylogeny, ecology, and behavior: A research program in comparative biology*. Chicago: University of Chicago Press, 1991.
- BROWN, J. L. Territorial behavior and population regulation in birds: a review and re-evaluation. *Wilson Bulletin*, v. 81, p. 293-329. 1969.
- BROWN, J. L. The evolution of diversity in avian territorial systems. *Wilson Bulletin*, v. 76, p. 160-169. 1964.
- BROWN, M. A.; BALL, S. J.; HOLMAN, D. The periodicity of isosporan oocyst discharge in the greenfinch (*Carduelis chloris*). *Journal of Natural History*, v. 35, p. 945-948, 2001.
- BRUMFIELD, R. T. Inferring the origins of lowland neotropical birds. *Auk*, v. 129, p. 367-376, 2012.
- CARRENO, R. A.; BARTA, J. R. An eimeriid origin of isosporoid coccidia with Stieda bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, v. 85, p. 77-83, 1999.
- CATCHPOLE, J.; NORTON, C. C.; JOYNER, L. P. The occurrence of *Eimeria weybridgensis* and other species of coccidia in lambs in England and Wales. *British*

- veterinary journal*, v. 131, p. 392-401, 1975.
- CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Listas das aves do Brasil, 2014. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 02 abr. 2018.
- CHESSER, R. T. Molecular systematics of New World suboscine birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 32, p. 11-24, 2004.
- CLARAMUNT, S. Discovering exceptional diversifications at continental scales: the case 551 of the endemic families of neotropical suboscine passerines. *Evolution*, v. 64, p. 2004-2019, 2010.
- COELHO, C. D.; BERTO, B. P.; NEVES, D. M.; DE OLIVEIRA, V. M.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Oocyst shedding by green-winged-saltator (*Saltator similis*) in the diagnostic of coccidiosis and *Isospora similisi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 64-70, 2013.
- DE LAS CASAS, J. C.; STILES, F. G.; BOLÍVAR, I. A.; MURILLO, J. I. Range extensions of two species of “red-breasted” meadowlarks (Icteridae: *Sturnella*) in Colombia. *Ornitología Colombiana*, v. 2, p. 37-40, 2004.
- DE SOUZA, P. N. B; BOMFIM, T. C. B do; HUBER, F; ABBOUD, L. C. S; GOMES, R. S. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 327-333, 2009.
- DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; CHRISTIE, D. A. *Handbook of the Birds of the World. Broadbills to Tapaculos*. Barcelona: Lynx Editions, 2003.
- DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D. A. *Handbook of Birds of the World*. Barcelona: Lynx Edicions, 1992.
- DEL HOYO, J; COLLAR, N. J.; CHRISTIE, D.A.; ELLIOTT, A. FISHPOOL, L. D. C., BOESMAN, P.; KIRWAN, G. M. *Handbook of Birds of the World and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World*. Barcelona-Cambridge, Lynx Edicions and BirdLife International, 2016.
- DEL HOYO, J; ELLIOT, A.; CHRISTIE, D. A. *Handbook of the birds of the world. Weavers to New World Warblers*. Barcelona: Lynx Edicions. 2010.
- DEL HOYO, J; ELLIOT, A.; CHRISTIE, D. A. *Handbook of the Birds of the World. Cotingas to Pipits and Wagtails*. Barcelona: Lynx Edicions. 2004.

- DOLNIK, O. Some aspects of the biology and host–parasite interactions of *Isospora* spp. (Protozoa: Coccidiida) of passerine birds. PhD dissertation, Carl von Ossietzky University, Oldenburg, 2002. Disponível em: <<http://docserv.bis.unioldenburg.de/publikationen/dissertation/2003/dolsom02/dolsom02.html>>. Acesso em: 12 jan. 2016.
- DOLNIK, O. The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. *Parasitology Research*, v. 100, p. 155-160, 2006.
- DOLNIK, O. V. Diurnal periodicity of oocysts release of *Isospora dilatata* (Sporozoa: Eimeriidae) from the common Starling (*Sturnus vulgaris*) in nature. *Parasitologiya*, v. 33, p. 74-80, 1999.
- DOLNIK, O. V.; DOLNIK, V. R.; BAIRLEN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, v. 98, p. 97-103, 2010.
- DOLNIK, O. V.; Palinauskas, V.; Bensch, S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, v. 95, p. 169-174, 2009.
- DUCA, C. G. S.; GUERRA, T. J.; MARINI, M. A. Territory size of three Antbirds (Aves, Passeriformes) in an Atlantic Forest fragment in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p. 692-698. 2006.
- DUSZYNSKI, D. W. Coccidian Parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from Insectivores: New Species from Shrew Moles (Talpidae) in the United States. *Journal of Protozoology*, v. 32, p. 577-580, 1985.
- DUSZYNSKI, D. W. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *Journal of Parasitology*, v. 57, p. 948-952, 1971.
- DUSZYNSKI, D. W.; UPTON, S. J.; COUCH, L. The Coccidia of the world, 1999. Disponível em: <<http://biology.unm.edu/coccidia/home.html>>. Acesso em: 1 out. 2015.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83, p. 333-336, 1997.
- EL-SHAHAWI, G. A.; EL-FAYOMI, H. M.; ABDEL-HALEEM, H. M. Coccidiosis of domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Egypt: light microscopic study.

- Parasitology Research*, v. 110, p. 251-258, 2012.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, p. 75-103, 1980.
- FITZPATRICK, J. W. Family Tyrannidae (Tyrant-flycatchers). In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; CHRISTIE, D. A. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World. Cotingas to Pipits and Wagtails*. 9. ed. Barcelona: Lynx Edicions, 2004. p. 170-463.
- FJELDSÅ, J. M.; IRESTEDT,; ERICSON, P. G. P. Molecular data reveal some major adaptational shifts in the early emáticos of the most diverse avian emáti, the Furnariidae. *Journal of Ornithology*, v. 146, p.1-13, 2005.
- FJELDSÅ, J. Diversification of the Neotropical Avifauna: disentangling the geographical patterns of persisting ancient taxa and phylogenetic expansions. *Ornitología Neotropical*, v. 23, p. 113-128, 2012.
- FLAUSINO, G.; BERTO, B. P.; McINTOSH, D.; FURTADO, T. T.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs. *Acta Protozoologica*, v. 53, p. 269-276, 2014;
- FRAGA, R. M. Family Icteridae (New World blackbirds). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; CHRISTIE, D. A. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World. Tanagers to New World Blackbirds*. Barcelona: Lynx Edicions, 2011. p. 684-807.
- GILL, H.; PAPERNA, I. Proliferative visceral *Isospora* (atoxoplasmosis) with morbid impact on the Israeli sparrow *Passer domesticus biblicus* Hartert, 1904. *Parasitology Research*, v. 103, p. 493-499, 2008.
- GIMENES, M. R.; ANJOS, L. Efeitos da fragmentação florestal sobre as comunidades de aves. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 25, p. 391-402. 2003.
- GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A. Survey of Diseases in Passeriform Birds Obtained From Illegal Wildlife Trade in São Paulo City, Brazil. *Journal of Avian Medicine Surgery*, v. 24, p. 199-209, 2010.
- GOMEZ, F. M.; NAVARRETE, I.; RODRIGUEZ, R. L. Influencia de los factores ambientales sobre diferentes poblaciones de *Isospora lacazei* Labbé, 1983 (Protozoa: Apicomplexa). *Revista Ibérica de Parasitología*, v. 42, p. 185-196, 1982.
- GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D. Les *Isospora* du moineau domestique; multiplicité des especes. *Annales de Parasitologie humaine et Compareè*, v. 57, p.



209-233, 1982.

GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. I: Compléments à l'étude systématique = *Isoospora* of sparrows. I: Complementary data on the systematics. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, v. 61, p. 155-160, 1986a.

GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. II: Etudes sur la biologie = *Isoospora* of sparrows. II: Studies on biology. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, v. 61, p. 161-192, 1986b.

GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. III: Action élective de la primaquine sur les formes d'attente = *Isoospora* of sparrows. III: Elective action of primaquine on latent stages. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, v. 61, p. 193-198, 1986c.

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

HARVEY, P. H.; PAGEL, M. D. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford: Oxford University Press, 1991.

HAWKINS, B. A.; FIELD, R.; CORNELL, H. V.; CURRIE, D. J.; GUÉGAN, J.; KAUFMAN, D. M.; KERR, J. T.; MITTELBAACH, G. G.; OBERDORFF, T.; O'BRIEN, E. M.; PORTER, E. E.; TURNER, J. R. G. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology*, v. 84, p. 3105-3117, 2003.

HONKALA, J.; NIIRANEN, S. *A birdwatching guide to South-East Brazil*. Santa Catarina: Portal do Bosque, 2010.

HOORN, C.; WESSELINGH, F.P.; TER H.; STEEGE, M.A.; BERMUDEZ, A.; MORA, J.; SEVINK, I.; SANMARTÍN, A.; SANCHEZ-MESEGUER, C.L.; ANDERSON, J.P.; FIGUEIREDO, C.; JARAMILLO, D.; RIFF, F.R.; NEGRI, H.; HOOGHIEMSTRA, J.; LUNDBERG, T.; STADLER, T.; SÄRKINEN, A.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape emáticos, and biodiversity. *Science*, v. 330, p. 927-931, 2010.

HUDMAN, S. P.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V. Effects of time of sampling on oocyst detection and effects of age and experimentally elevated testosterone on prevalence of coccidia in male dark-eyed Juncos. *Auk*, v. 117, p. 1048-1051, 2000.

- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/emát-tematicas-fauna-silvestre/centros-detriagem-de-animais-silvestres>>. Acesso em: 30 set. 2015.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Plano Emergencial para o Parque Nacional do Itatiaia*. Brasília: Diretoria de Ecossistemas, Departamento de unidades de conservação, 1994.
- IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística Mapa Brasil Climats, 2011. Disponível em: < [ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas\\_tematicos/mapas\\_murais/clima.pdf](ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/clima.pdf) >. Acesso em: 22 maio 2011.
- ICMBIO. Decreto N° 1.713, de 14 de junho de 1937, 2018a. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/itatiaia.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2018.
- ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia, 2018b. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>>. Acesso em: 16 jan. 2018.
- ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia, 2019. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>>. Acesso em: 09 fev. 2019.
- ILLERA, J. C.; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, Á.; HERNÁNDEZ-FLORES, C. N.; FORONDA, P. Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *Journal of Biogeography*, v. 42, p. 1858-1870, 2015.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2015. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 13 maio 2016.
- JARAMILLO, A.; BURKE, P. *New World Blackbirds*. New Jersey: Princeton University Press, 1999.
- JOYNER, L. P. Host and Site specificity. In: LONG, P. L. *The biology of the Coccidia*. Baltimore: University Park Press. 1982. p. 35-62.
- KAWAZOE, U.; GOUVEA, H.; JORGE, P.; CAPUTO, C. M. E.; PERDIGA ~O, J. C. A survey of intestinal coccidiosis from wild birds from the Itatiaia National Park, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Protozoology*, v. 36, 11<sup>a</sup>, 1989.
- KISSLING, W. D.; RAHBEK, C.; BÖHNING-GAESE, K. Food plant diversity as broad-scale determinant of avian frugivore richness. *Proceedings of the Royal Society*, v. 274, p. 799-808, 2007.

- KUNZ, W. When is a parasite species a species? *Trends in Parasitology*, v. 18, p. 121-124, 2002.
- LAINSON, R. *Atoxoplasma* Garnham, 1950, as a synonym for *Lankesterella* Labbé, 1899. Its life cycle in the English sparrow (*Passer domesticus domesticus*, Linn.). *Journal of Protozoology*, v. 6, p. 360-371, 1959.
- LAINSON, R. Observations on some avian coccidian (Apicomplexa: Eimeriidae) in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 303-311, 1994.
- LAINSON, R. Some Observations on the Life-Cycle of *Atoxoplasma*, with Particular Reference to the Parasite's Schizogony and its Transmission by the Mite *Dermanyssus gallinae*. *Nature*, v. 182, p. 1250-1251, 1958.
- LAINSON, R. The transmission of *Lankesterella* (= *Atoxoplasma*) in birds by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Journal of Protozoology*, v. 7, p. 321-322, 1960.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds. *Bulletin du Museum National D'Histoire Naturelle*, v. 11, p. 349-365, 1989.
- LEVINE, N. D. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). *Journal of Parasitology*, v. 68, p. 719-723, 1982a.
- LEVINE, N. D. *Veterinary Protozoology*. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1985.
- LONG, P. L. *The biology of the Coccidia*. London: Edward Arnold, 1982.
- LOPES, B. B.; BALTHAZAR, L. M. C.; COELHO, C. D.; BERTO, B. P.; NEVES, D. M.; LOPES, C. W. G. Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae). *Coccidia*, v. 1, p. 6-9, 2013b.
- LOPES, B. B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; GALVÃO, G. S., LOPES, C. W. G. The rubycrowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Coccidia*, v. 1, p. 2-5, 2013a.
- LOPES, B. B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; GALVÃO, G. S.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Isospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 59, p. 272-275, 2014.

- LÓPEZ, G.; FIGUEROLA, J.; SORIGUER, R. Time of day, age and feeding habits influence coccidian oocyst shedding in wild passerines. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 559-564, 2007.
- MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATRIB, M.; SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 281-289, 2009.
- MARINI Â. Foraging behaviour and diet of the Helmeted Manakin. *Condor*, v. 94, p. 151-158, 1992.
- MARTINAUD, G.; BILLAUDELLE, M.; MOREAU, J. Circadian variation in shedding of the oocysts of *Isospora turdi* (Apicomplexa) in blackbirds (*Turdus merula*): An adaptative trait against desiccation and ultraviolet radiation. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 735-739, 2009.
- MARTÍNEZ-PADILLA, J.; MILLÁN, J. Prevalence and intensity of intestinal parasitisation in a wild population of nestling eurasian kestrel *Falco tinnunculus*. *Ardeola*, v. 54, p. 109-115, 2007.
- MASELLO, J. F.; CHOCONI, R. G.; SEHGAL, R. N. M.; TELL, L.; QUILFELDT, P. Blood and intestinal parasites in wild Psittaciformes: a case study of burrowing parrots (*Cyanoliseus patagonus*). *Ornitologia Neotropical*, v. 17, p. 515-520, 2006.
- McALLISTER, C. T; UPTON, S. J. The coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of testudines, with descriptions of three new species. *Canadian Journal of Zoology*, v. 67, p. 2459-2467, 1989.
- McQUISTION, T. E. The prevalence of coccidian parasites in passerine birds from South Africa. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, v. 93, p. 221-227, 2000.
- MCQUISTION, T. E.; CAPPARELLA, A. *Isospora sagittulae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the spotted antbird (*Hylophylax naevioides*). *Transactions of the American Microscopical Society*, v. 111, p. 365-368, 1992.
- MILDE, K. Light and electron microscopic studies on isosporan parasites (Sporozoa) in sparrows (*Passer domesticus* L). *Protistologica*, v.15, p. 607-627, 1979.
- MISOF, K. Diurnal cycle of *Isospora* spp. oocyst shedding in Eurasian blackbirds (*Turdus merula*). *Canadian Journal of Zoology*, v. 82, p. 764-768, 2004.

- MMA. *Estabelece Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira. Portaria nº 126, de 27 de maio de 2004*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004
- MMA. Ministério do Meio ambiente, 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>> Acesso em: 19 mar. 2019.
- MODRÝ, D.; JIRKŮ, M. Three new species of coccidia (Apicomplexa: Eimeriorina) from the marble-throated skink, *Marmorosphax tricolor* Bavay, 1869 (Reptilia: Scincidae), endemic to New Caledonia with a taxonomic revision of *Eimeria* spp. from scincid hosts. *Parasitology Research*, v. 99, p. 419-428, 2006.
- MODRÝ, D.; JIRKŮ, M.; ŠUMBERA, R. Three new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the silvery mole rat *Heliophobius argenteocinereus* Peters, 1846 (Rodentia: Bathyergidae) from Malawi. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 1200-1203, 2005.
- MORIN-ADELINE, V.; VOGELNEST, L.; DHAND, N. K.; SHIELS, M.; ANGUS, W.; SLAPETA, J. Afternoon shedding of a new species of *Isospora* (Apicomplexa) in the endangered Regent Honeyeater (*Xanthomyza Phrygia*). *Parasitology*, v. 138, p. 713-724, 2011.
- MOYLE, R. G.; CHESSER, R. T.; BRUMFIELD, R. T.; TELLO, J. G.; MARCHESE, D. J.; CRACRAFT, J. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). *Cladistics*, v. 25, p. 386-405, 2009.
- NORIEGA, J. I.; CHIAPPE, L. M. An Early Miocene passeriform from Argentina. *Auk*, v. 110, p. 936-938, 1993.
- NORRIS, K.; EVANS, M. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology*, v. 11, p. 19-26, 2000.
- NORTON, C. C.; JOYNER, L. P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology*, v. 83, p. 269-279, 1981.
- NOWELL, F.; HIGGS, S. *Eimeria* species infecting wood mice (genus *Apodemus*) and the transfer of two species to *Mus musculus*. *Parasitology*, 98, p. 329-336, 1989.
- ODUM, E. P. *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- OGEDENGBE, J. D.; HANNER, R. H.; BARTA, J. R. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina,

- Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 843-850, 2011.
- OHLSON, J.I.; FJELDSA, J.; ERICSON, P.G.P. Tyrant flycatchers coming out in the open: phylogeny and ecological radiation of Tyrannidae (Aves, Passeriformes) *Zoologica Scripta*, v. 37, p. 315-335, 2008.
- OHLSON, J. I.; IRESTEDT, M.; ERICSON, P. G. P.; FJELDSA, J. Phylogeny and classification of the New World suboscines (Aves, Passeriformes). *Zootaxa*, v. 1, p. 1-35, 2013.
- PAP, P. L.; VÁGASI, C. I.; CZIRJÁK, G. A.; TITILINCU, A.; PINTEA, A.; OSVÁTH, G.; FULLOP, A; BARTA, Z. The effect of coccidian on the condition and immune profile of moulting house sparrows (*Passer domesticus*). *Auk*, v. 128, p. 330-339, 2011.
- PARKER, B. B.; DUSZYNSKI, D. W. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *Journal of Parasitology*, v. 72, p. 602-604, 1986.
- PARKES, K. C. A revision of the red-rumped cacique, *Cacicus haemorrhous* (Aves: Icteridae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, v. 83, p. 203-214, 1970.
- PELLEYRDY, L. Three new coccidia parasitic in Cuban birds (Protozoa: Sporozoa). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 13, p. 227-230, 1967.
- PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURICIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L. F.; BETINI, G. S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A. C.; LIMA, L. M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F. R.; BENCKE, G. A.; COHN-HAFT, M; FIGUEIREDO, L. F. A.; STRAUBE, F. C.; CESARI, E. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 23, p. 91-298, 2015.
- PINTO-LEDEZMA, J. N.; SIMON, L.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; VILLALOBOS, F. The geographical diversification of Furnariides: the role of forest versus open habitats in driving species richness gradients. *Journal of Biogeography*, v. 44, p. 1683-1693, 2016.
- RAMIREZ, L; BERTO, B. P.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; FLAUSINO, W.; MEIRELES, G. S.; RODRIGUES, J. S.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. *Eimeria*

- bareillyi* from the 60 domestic water buffalo, *Bubalus bubalis*, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 31, p. 261-264, 2009.
- REMSEN, J. V.; ARETA, J. I.; CADENA, C. D.; S. CLARAMUNT, JARAMILLO, A.; NORES, M.; PACHECO, J. F.; PÉREZ-EMÁN, J.; ROBBINS, M. B.; STILES, F. G.; STOTZ, D. F.; ZIMMER, K. J. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union, 2017. Disponível em: <<http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>>. Acesso em: 10 jan. 2017
- RIDGELY, R. S.; GWYNNE, J. A.; TUDOR, G.; ARGEL, M. *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*. São Paulo: Editora horizonte, 2015.
- RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. *Field guide to the songbirds of south America: the passerines*. Austin: University of Texas Press, 2004.
- RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. *The birds of South America. The suboscine passerines*. 1. ed. Texas: University of Texas Press, 1994.
- RODRIGUES, M. B.; SILVA, L. M.; LOPES, B. D. B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. *Zootaxa*, v. 4034, p. 193-196, 2015.
- RODRIGUES, M. B.; OLIVEIRA, J. L. G.; SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G. N.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) (Passeriformes: Thraupidae: Sporophilinae) and *Haplospiza unicolor* Cabanis, 1851 (Passeriformes: Thraupidae: Diglossinae) as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro, Lopes, 2005 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, v. 96, p. 423-431, 2018.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: FEP MVZ Editora, 2002.
- SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; GAFFNEY, P. M.; TOKARZ, D.; KEENER, L. L.; MCCLURE, D.; GRIFFEY, S.; MCALOOSE, D.; RIDEOUT, B. A. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 635-647, 2005.
- SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*, v. 36, p. 266-275, 1923.

- SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. *Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution*. New Haven: Yale University Press, 1990.
- SIBLEY, C. G.; MONROE JR., B. L. *Distribution and taxonomy of the birds of the world*. New Haven: Yale University Press, 1990.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- SIGRIST, T. *Avifauna Brasileira: The avis brasiliis field guide to the birds of Brazil*, 1. ed. São Paulo: Editora Avis Brasilis, 2009.
- SIGRIST, T. *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. 4. ed. São Paulo: Editora Avis Brasilis, 2014.
- SILVA, L. M.; RODRIGUES, M. B.; LOPES, B. D. B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. A new coccidian, *Isospora parnaitatiaiensis* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitology Research*, v. 115, p. 745-749, 2016.
- SILVA, L. M.; RODRIGUES, M. B.; PINHO, I. F.; LOPES, B. B.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G.; BERTO, B. P. Some remarks on the distribution and dispersion of Coccidia from icterid birds in South America: *Isospora guaxi* n. sp. and *Isospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique *Cacicus haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae) in southeastern Brazil. *Systematic Parasitology*, v. 94, p.151-157, 2017.
- SILVA-CARVALHO L. M.; PASTURA D. G. N.; GOMES J. V.; SIQUEIRA P. B.; RODRIGUES M. B.; LIMA V. M.; BERTO, B. P. *Isospora lopesi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, v. 95, p. 455–463, 2018a.
- SILVA-CARVALHO L. M.; PASTURA D. G. N.; RODRIGUES M. B.; GOMES J. V.; OLIVEIRA M. S.; SIQUEIRA P. B.; OLIVEIRA J. L. G.; SOARES S. S.; OLIVEIRA A. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P. *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella (1992) (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitology*



*Research*, v. 117, p. 2635-2641, 2018b.

- SILVA-CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, J. L. G.; OLIVEIRA, M. S.; RODRIGUES, M. B.; ABREU, S. T.; FERREIRA, C. N. O.; FRANCO, H. A.; FILHO, S. T.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. *Isospora borbai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from gnateaters *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America. *Acta Parasitologica*, 2019. [no prelo].
- SIMON, J. E.; PERES J.; RUSCHI P. A. A importância da Serra das Torres para a conservação de aves no estado do espírito santo, sudeste do Brasil. *Revista Científica FAESA*, v. 4, p. 47-62, 2008.
- SINCLAIR, B. J.; VERNON, P.; JACO KLOK, C.; CHOWN, S. L. Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends Ecology Evolution*, v. 18, p. 257-262, 2003.
- SKUTCH, A. F. *Antbirds and ovenbirds: their lives and homes*. 1. ed. Austin: University of Texas Press, 1996.
- SOULSBY, E. J. L. *Parasitología y enfermedades parasitárias*. 7. ed. México: Interamericana, 1987.
- STOTZ, D. F.; FITZPATRICK, J. W.; PARKER III, T. A.; MOSKOVITS, D. K. *Neotropical birds: ecology and conservation*. Chicago: Universtiy of Chicago Press, 1996.
- SWAINSON, W. An inquiry into the natural affinities of the Lanidae, or shrikes; preceded by some observations of the present state of Ornithology in this Country. *Zoological Journal*, v. 1, p. 289 - 307, 1824.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TELLO, J. G.; MOYLE, R. G.; MARCHESE, D. J.; CRACRAFT, J. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannides). *Cladistics*, v. 25, p. 429-467, 2009.
- TOBIAS, J. A.; BRAUN, J. D.; BRUMFIELD, R. T.; DERRYBERRY, E.P.; KIRSCHER, A. N. G.; SEDDON, N. The importance of suboscines birds as study systems in ecology and evolution. *Ornitología Neotropical*, v. 23, p. 261-274, 2012.

- TOKIWA, T.; KOJIMA, A.; SASAKI, S.; KUBOTA, R.; IKE, K. *Isospora lunaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic Java sparrow in Japan. *Parasitology International*, v. 66, p. 100-105, 2017.
- UPTON S. J.; WILSON, S. C.; NORTON, T. M.; GREINER, E. C. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Bali (Rothschild's) mynah *Leucopsar rothschildi* (Passeriformes: Sturnidae), and comments concerning the genera *Atoxoplasma* Garnham, 1950 and *Isospora*. *Systematic Parasitology*, v. 48, p. 47-53, 2001.
- UPTON, S. J. Suborder Eimeriorina Léger, 1911. In: LEE, J. J.; LEEDALE, G. F.; BRADBURY, P. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2. ed. London: Society of Protozoologists, 2000. p. 318-339.
- UPTON, S. J.; WHITAKER, B. New species of *Isospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from the troupial and whiteedged oriole (*Icterus* spp.) (Aves, Passeriformes, Icteridae). *Acta Parasitologica*, v. 45, p. 67-70, 2000.
- UPTON, S. J.; STAMPER, M. A.; WHITAKER, B. R. *Isospora bellicosa* sp. n. (Apicomplexa) from a Peruvian redbreasted meadowlark, *Sturnella bellicosa* (Passeriformes: Icteridae). *Archiv fur Protistenkunde*, v. 145, p. 132-134, 1995.
- VALKIU–NAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. London: Taylor and Francis, 2004. 932p.
- VASCONCELLOS, M. S. D.; BATISTA, L. C. S. O.; VIDAL, L. G. P.; PASSOS, M. M. Intensidade de infecção por *Isospora* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) em trinca-ferrosverdadeiros *Saltator similis* d'Orbigny, Lafresnaye (Passeriformes: Cardinalidae) mantidos em cativeiro no Município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Coccidia*, v. 1, p. 39-43, 2013.
- VASCONCELOS, T. C. B.; LONGA, C. S.; CAMPOS, S. D. E.; COSTA, C. H. C.; BRUNO, S. F. Coccidiose em *Sporophila maximiliani* (Passeriformes: Emberizidae): relato de dois casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, p. 261-264, 2012.
- WHITNEY, B. M. Family Conopophagidae (Gnateaters). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; CHRISTIE, D. (Eds.). *Handbook of the birds of the world, Broadbills to Tapaculos*. Barcelona: Lynx Edicions, 2003. p. 732-748.
- WIENS, J. A. *The ecology of bird communities*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

- WIENS, J. J.; GRAHAM, C. H. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology Evolution*, v. 36, p. 519-539, 2005.
- WILLIS, E. O. On the behavior of five species of Rhegmatorhina, Ant-following Antbirds of the Amazon basin. *Wilson Bulletin*, v. 81, p. 362-395, 1969.
- WILLIS, E. O. The composition of avian communities in remanescent woodlots in Southern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 33, p. 1-25, 1979.
- WILLIS, E. O.; ONIKI, Y. As aves e as formigas de correição. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia*, v. 8, p. 123-150, 1992.
- WILLIS, E. O. Effects of a cold wave on an Amazonian avifauna in the upper Paraguay drainage, Western Mato Grosso, and suggestions on Oscine-Suboscine relationships. *Acta Amazonica*, v. 3, p. 379-394, 1976.
- YAMAGISHI, S.; UEDA, K. Simultaneous territory mapping of male Fan - Tailed Warblers (*Cisticola juncidis*). *Journal of Field Ornithology*, v. 57, p. 193-199, 1986.
- YANG, R.; BRICE, B.; ELLIOT, A.; RYAN, U. *Isohora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, v. 159, p. 59-66, 2015.
- YANG, R.; BRICE, B.; JIAN, F.; RYAN, U. Morphological and molecular characterization of *Isohora manorinae* n. sp. in a yellow-throated miner (*Manorina flavigula wayensis*) (Gould, 1840). *Experimental Parasitology*, v. 163, p. 16-23, 2016.
- ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, v. 292, p. 686-693, 2001.
- ZIMMER, K.; ISLER, M. Family Thamnophilidae - typical antbirds. In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; CHRISTIE, D. A. *Handbook of the birds of the world: broadbills to tapaculos*. Barcelona: Lynx, 2003. p. 448-531.

## **7. ANEXOS**

## Anexo A



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45200-1	Data da Emissão: 08/08/2014 11:16	Data para Revalidação*: 07/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: COCCÍDIOS EM AVES SILVESTRES COMO BIOMARCADORES DE DISPERSÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA E EM SEU ENTORNO	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de aves e coleta de amostras	08/2014	06/2015
2	Identificação dos coccídios	09/2014	07/2015
3	Processamento das amostras	09/2014	07/2015
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	09/2014	07/2015
5	Estudo estatístico para caracterização dos oocistos	10/2014	07/2015
6	Estudo estatístico para correlação entre coccídios e impactos ambientais	04/2015	07/2015

#### Observações e ressalvas

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

#### Outras ressalvas

1	O PNI SÓ PERMITE USO DE REDE DE NEBLINA PARA COLETA DE AVES ,FEZES E OBSERVAÇÕES.
---	---

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Cleide Domingues Coelho	Pesquisador	880.565.547-34	73777617 IFP-RJ	Brasileira
2	Carlos Wilson Gomes Lopes	Coordenador	334.954.837-72	2606111 IFP-RJ	Brasileira
3	Bruno do Bornim Lopes	Pesquisador	081.242.587-16	11317007-0 I.F.P-RJ	Brasileira

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

Código de autenticação: 84371796



Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 45200-1	<b>Data da Emissão:</b> 08/08/2014 11:16	<b>Data para Revalidação*:</b> 07/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: COCCÍDIOS EM AVES SILVESTRES COMO BIOMARCADORES DE DISPERSÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA E EM SEU ENTORNO	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA	UC Federal
2	ITATIAIA	RJ	Entorno do Parque Nacional do Itatiaia (Maromba, etc.)	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	coleção

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

**Código de autenticação: 84371796**



Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 45200-1	<b>Data da Emissão:</b> 08/08/2014 11:16	<b>Data para Revalidação*:</b> 07/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: COCCÍDIOS EM AVES SILVESTRES COMO BIOMARCADORES DE DISPERSÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA E EM SEU ENTORNO	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

**Código de autenticação: 84371796**



Página 3/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 45200-1	<b>Data da Emissão:</b> 08/08/2014 11:16	<b>Data para Revalidação*:</b> 07/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: COCCÍDIOS EM AVES SILVESTRES COMO BIOMARCADORES DE DISPERSÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA E EM SEU ENTORNO	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

**Código de autenticação: 84371796**



Página 4/4



## Anexo B



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 49605-1</b>	<b>Data da Emissão: 18/06/2015 14:46</b>	<b>Data para Revalidação*: 17/07/2016</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de aves e coleta de amostras	08/2015	06/2016
2	Identificação dos coccídios	09/2015	07/2016
3	Processamento das amostras	09/2015	07/2016
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	10/2015	07/2016
5	Estudo estatístico para caracterização dos oocistos	12/2015	07/2016

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiariam a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Wilson Gomes Lopes	Pesquisador	334.954.837-72	2606111 IFP-RJ	Brasileira
2	Bruno do Bomfim Lopes	Discente de Doutorado	081.242.587-16	11317007-0 I.F.P.-RJ	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA	UC Federal

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

**Código de autenticação: 52541363**



Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 49605-1	<b>Data da Emissão:</b> 18/06/2015 14:46	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	coleção

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

**Código de autenticação: 52541363**



Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 49605-1	<b>Data da Emissão:</b> 18/06/2015 14:46	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

**Código de autenticação: 52541363**



Página 3/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 49605-1	<b>Data da Emissão:</b> 18/06/2015 14:46	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

**Código de autenticação: 52541363**



Página 4/4

## Anexo C



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras	08/2016	07/2019
2	Estudo estatístico	10/2016	07/2019
3	Captura de aves e coleta de amostras	07/2016	06/2019
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	11/2016	07/2019
5	Identificação dos coccídios	09/2016	07/2019

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

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

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 1/3



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleita (Aves)	Rede de neblina

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção

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

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 2/3



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 3/3

## Anexo D



Seropédica 16 de abril de 2015

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 036/2014 intitulado **“COCCÍDIOS EM AVES SILVESTRES COMO BIOMARCADORES DE DISPERSÃO E IMPACTOS AMBIENTAIS.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Carlos Wilson Gomes Lopes. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 16 de abril de 2015, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott  
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva  
Vice-Coordenador CEUA-IV



## Anexo E



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE


COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL", protocolo nº 008/2015 sob responsabilidade do pesquisador Bruno Pereira Berto, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, em reunião de 05/11/2015.

Vigência do Projeto	02/01/2016 a 20/12/2016
Nº da solicitação ou autorização SISBIO	42798-1
Atividade(s)	Captura, Coleta de fezes
Espécies/ Grupos Taxonômicos	Aves ( <i>Várias espécies</i> )
Local(is)	Parque Nacional do Itatiaia/RJ

We certify that the protocol nº 008/2015, entitled "IDENTIFICAÇÃO E INTENSIDADE DE INFECÇÃO DE COCCÍDIOS (PROTOZOA: APICOMPLEXA) EM AVES NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ, BRASIL", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Biology Institute of the Federal Rural University of Rio de Janeiro in 05/11/2015.

  
Prof. Fábio Fagundes da Rocha  
Coordenador CEUA/ICBS/UFRRJ  
Prof. Fábio Fagundes da Rocha  
SIAPÉ 1519567

## Anexo F



Comissão de Ética no  
Uso de Animais  
Instituto de Veterinária



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO", protocolada sob o CEUA nº 6606250616, sob a responsabilidade de **Bruno Pereira Berto** e equipe; *Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 17/10/2016.

We certify that the proposal "TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIA FROM WILD BIRDS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL", utilizing 500 Birds (males and females), protocol number CEUA 6606250616, under the responsibility of **Bruno Pereira Berto** and team; *Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/17/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2016](#) a [08/2019](#) Área: [Biologia Animal](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Aves](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [1 a 240 meses](#) N: [500](#)

Linhagem: [não se aplica](#) Peso: [10 a 10000 g](#)

Resumo: A Mata Atlântica é um dos biomas mais importantes para ser preservado na biodiversidade do planeta, sendo as regiões das baixadas do litoral do Sudeste brasileiro, onde está inserido o Estado do Rio de Janeiro, as mais prioritárias para conservação. A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as principais ameaças, as quais, além dos impactos diretos a fauna, flora e microbiota, indiretamente favorecem a transmissão de parasitas e a susceptibilidade das aves. Neste contexto, surge a importância do conhecimento dos parasitas de aves silvestres, principalmente de alguns grupos pouco estudados, como os protozoários coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida), os quais são de extrema importância, tanto em termos de biodiversidade, quanto em sua dinâmica e especificidade. Neste sentido, este projeto visa identificar e quantificar as espécies de coccídios de aves silvestres em áreas de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, os quais fomentarão estudos complementares sobre a dinâmica do parasitismo entre famílias, hábitos, condições ambientais, etc. As expectativas são que os estudos dos oocistos revelem espécies novas, redescrições e novos hospedeiros, verificando a transmissão de coccídios entre aves de famílias distintas e possibilitando a elaboração de chaves dicotômicas de identificação. As distintas características ambientais e diferentes nichos ecológicos poderão influenciar na distribuição das espécies de coccídios, densidades e nas morfologia e morfometria dos oocistos. Desta forma, espécies distintas, padrões morfométricos e/ou morfológicos dos oocistos, e densidades serão associadas a cada condição ambiental, dado biométrico/biológico e nicho ecológico da ave hospedeira. Finalmente, as identificações e/ou elevadas densidades em determinada família, espécie ameaçada/endêmica ou aves em determinado ambiente poderão orientar ou priorizar a conservação de determinada ave e/ou localidade.

Local do experimento: Ambiente Silvestre

Seropédica, 17 de outubro de 2016



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

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



*Fabio B. Scott*

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro

*J.P.P.*

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro

## Some remarks on the distribution and dispersion of *Coccidia* from icterid birds in South America: *Isospora guaxi* n. sp. and *Isospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique *Cacicus haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae) in southeastern Brazil

Lidiane Maria da Silva · Mariana Borges Rodrigues · Irlane Faria de Pinho · Bruno do Bomfim Lopes · Hermes Ribeiro Luz · Ildemar Ferreira · Carlos Wilson Gomes Lopes · Bruno Pereira Berto

Received: 27 May 2016 / Accepted: 19 November 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** A new species of coccidian, *Isospora guaxi* n. sp., and *Isospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) are recorded from red-rumped caciques *Cacicus haemorrhous* (L.) in the Parque Nacional do Itatiaia, Brazil. *Isospora guaxi* n. sp. has sub-spheroidal oocysts, measuring on average  $30.9 \times 29.0 \mu\text{m}$ , with smooth, bi-layered wall c.  $1.9 \mu\text{m}$  thick. Micropyle and oocyst

residuum are absent, but a polar granule is present. Sporocysts are ellipsoidal, measuring on average  $19.3 \times 13.8 \mu\text{m}$ . Stieda body is knob-like and sub-Stieda body is prominent and compartmentalized. Sporocyst residuum is composed of scattered granules. Sporozoites are vermiform, with one refractile body and a nucleus. *Isospora bellicosa* has sub-spheroidal to ovoidal oocysts, measuring on average  $27.1 \times 25.0 \mu\text{m}$ , with smooth, bi-layered wall c.  $1.5 \mu\text{m}$  thick. Micropyle and oocyst residuum are absent, but one or two polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal, measuring on average  $18.1 \times 10.9 \mu\text{m}$ . Stieda body is knob-like and sub-Stieda body is rounded to rectangular. Sporocyst residuum is composed of a cluster of compact or diffuse granules. Sporozoites are vermiform, with one refractile body and a nucleus. *Isospora bellicosa* was originally described from the Peruvian meadowlark *Sturnella bellicosa* deFilippi, a *trans*-Andean icterid which is allopatric with the *cis*-Andean *C. haemorrhous*. Therefore, in conclusion, this current study reveals the dispersion of coccidia from Icteridae across the Andes Mountains, besides describing the sixth isosporoid coccidium infecting an icterid bird.

L. M. da Silva · M. B. Rodrigues · I. F. de Pinho  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465  
km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

B. do Bomfim Lopes  
Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e  
Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica,  
Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

H. R. Luz · C. W. G. Lopes  
Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de  
Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica,  
Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

I. Ferreira · B. P. Berto (✉)  
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica,  
Rio de Janeiro 23897-000, Brazil  
e-mail: bertobp@ufrj.br

### Introduction

The red-rumped cacique, *Cacicus haemorrhous* (L.) belongs to the family Icteridae. It occurs exclusively in

Neotropical forests of the Amazon region; southeast and midwest regions of Brazil; Paraguay; northeastern Argentina; Colombia; and east of the Andes (Parkes, 1970; BirdLife International, 2015; IUCN, 2015). This species breeds in colonies, weaving nests in the form of suspended bag at the end of tree branches (Feekes, 1981; Sick, 1997).

Species of the family Icteridae are widely distributed, but restricted to the New World, with exception of some species vagrant in Europe, such as the bobolink *Dolichonyx oryzivorus* (L.), the rusty blackbird *Euphagus carolinus* (Müller), the baltimore oriole *Icterus galbula* (L.), the brown-headed cowbird *Molothrus ater* (Boddaert) and the yellow-headed blackbird *Xanthocephalus xanthocephalus* (Bonaparte) (BirdLife International, 2015; IUCN, 2015).

Similar to other families of Passeriformes, the icterids can be parasitised by isosporoid coccidia. Currently, the *Isoospora* spp. recorded from passerines of this family are: (i) *Isoospora divitis* Pellérdy, 1967 from the Cuban blackbird *Dives atrovirens* (d'Orbigny) in Cuba (Pellérdy, 1967); (ii) *Isoospora cacici* Lainson, 1994 from the yellow-rumped cacique *Cacicus cela cela* (L.) in Amazonian Brazil (Lainson, 1994); (iii) *Isoospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 from the Peruvian meadowlark *Sturnella bellicosa* deFilippi in Peru (Upton et al., 1995); (iv) *Isoospora icterus* Upton & Whitaker, 2000 from the Venezuelan troupial *Icterus icterus* (L.) in USA (Upton & Whitaker, 2000); and (v) *Isoospora graceannae* Upton & Whitaker, 2000 from the white-edged oriole *Icterus graceannae* Cassin in USA (Upton & Whitaker, 2000).

In this context, this study describes a new species of *Isoospora* and *I. bellicosa* from red-rumped caciques *C. haemorrhous* in the Parque Nacional do Itatiaia (PNI) in southeastern Brazil, demonstrating parasite transmission between allopatric icterids that inhabit opposite sides of the Andes.

## Materials and methods

One expedition was conducted in November 2015 in the PNI, which is a protected area with a high degree of vulnerability located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo. A total of eight *C. haemorrhous* were captured with mist nets at an altitude of 592 m (22°27'48"S, 44°36'10"W). The birds were kept in

individual boxes and feces collected immediately after defecation. After identification of the species, the bird was released and stool samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) solution at 1:6 (v/v). Samples were carried to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature for one week. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014a). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope equipped with a digital camera Eurocam 5.0. Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), specifically Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

## Family Eimeriidae Minchin, 1903 Genus *Isoospora* Schneider, 1881

### *Isoospora guaxi* n. sp.

*Type-host*: Red-rumped cacique *Cacicus haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae).

*Type-locality*: Parque Nacional do Itatiaia (22°27'48"S, 44°36'10"W), southeastern Brazil.

*Type-specimens*: Phototypes and line drawings are deposited and available (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Photographs of the type-host specimens (syntypes) are deposited in the same collection. The repository number is P-64/2016.

*Site in host*: Unknown.

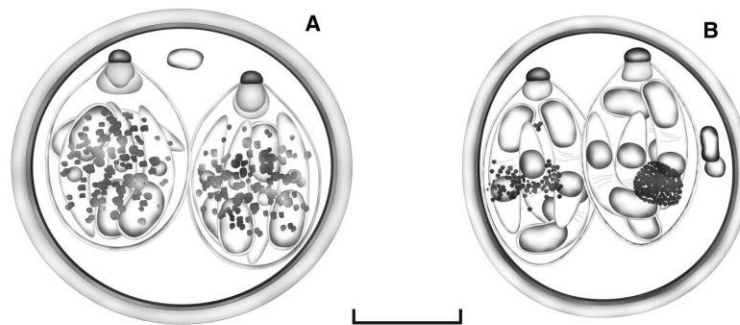
*Prevalence*: 63% (5 out of 8 birds infected).

*Etymology*: The specific epithet is derived from the common local name for the host, which is 'guaxe'.

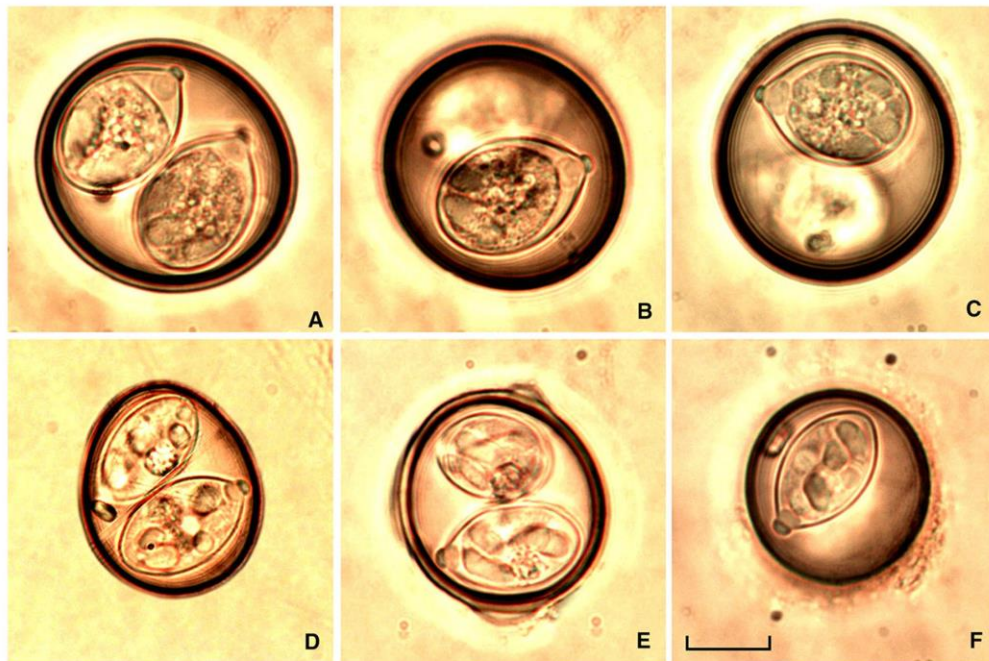
### Description (Figs. 1A; 2A–C)

#### *Sporulated oöcyst*

Oöcysts (n = 18) sub-spheroidal, 28–34 × 27–32 (30.9 × 29.0); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1



**Fig. 1** Composite line drawings of sporulated oocysts of *Isospora guaxi* n. sp. (A) and *Isospora bellicosa* (B) ex *Cacicus haemorrhous*. Scale-bar: 10  $\mu$ m



**Fig. 2** Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora guaxi* n. sp. (A–C) and *Isospora bellicosa* (D–F) ex *Cacicus haemorrhous*. Scale-bar: 10  $\mu$ m

(1.06). Wall bi-layered, 1.8–2.1 (1.9) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle and oocyst residuum both absent; single polar granule present.

#### *Sporocyst and sporozoites*

Sporocysts (n = 17) ellipsoidal, 17–21  $\times$  12–15 (19.3  $\times$  13.8); L/W ratio 1.3–1.6 (1.41). Stieda body

present, knob-like, 1.0 high, 2.0 wide; sub-Stieda body present, prominent and compartmentalized with a dense and central portion, rounded or irregular, 2.5 high, 2.0 wide, and a pale portion, rounded or trapezoidal, 3.0 high, 4.0 wide; para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, composed of many scattered granules of different sizes. Sporozoite vermiform with single posterior refractile body and centrally located nucleus.

#### *Isoospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995

**Host:** Red-rumped cacique *Cacicus haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae).

**Locality:** Parque Nacional do Itatiaia (22°27'48"S, 44°36'10"W), southeastern Brazil.

**Material studied:** Phototypes and line drawings are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Photographs of the type-host specimens (symbiotypes) are deposited in the same collection. The repository number is 65/2016.

**Site in host:** Unknown.

**Prevalence:** 4/8 birds infected (50%).

**Description** (Figs. 1B; 2D–F)

##### *Sporulated oöcyst*

Oöcyst ( $n = 24$ ) sub-spheroidal to ovoidal, 24–32 × 23–27 (27.1 × 25.0); length/width (L/W) ratio 1.0–1.2 (1.08). Wall bi-layered, 1.4–1.7 (1.5) thick, outer layer smooth,  $c.2/3$  of total thickness. Micropyle and oöcyst residuum both absent; 1 or 2 polar granules present.

##### *Sporocyst and sporozoites*

Sporocysts ( $n = 13$ ), ellipsoidal, 16–21 × 10–12 (18.1 × 10.9); L/W ratio 1.5–1.7 (1.65). Stieda body present, knob-like, 1.5 high, 2.5 wide; sub-Stieda body present, rounded to rectangular, 1.5 high, 2.5 wide; para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, composed of a cluster of compact or diffuse granules. Sporozoite vermiform with one posterior refractile body and centrally located nucleus.

## Discussion

According to Duszynski & Wilber (1997) and an extensive bibliography of coccidia of passerines (Berto et al., 2011), the new species should be compared in detail with the coccidian species which are feature-similar and belong to the same family of the host. Therefore, a comparison was carried out with *Isoospora* spp. described from Icteridae (Table 1). The oöcysts of *I. guaxi* n. sp. have similar size only with *I. icterus*; however, the new species can be distinguished by its sub-Stieda body being compartmentalized. This characteristic feature of compartmentalization of the sub-Stieda body is only shared with *I. graceannae*; however, *I. guaxi* has larger oöcysts and sporocysts without splintered granules scattered.

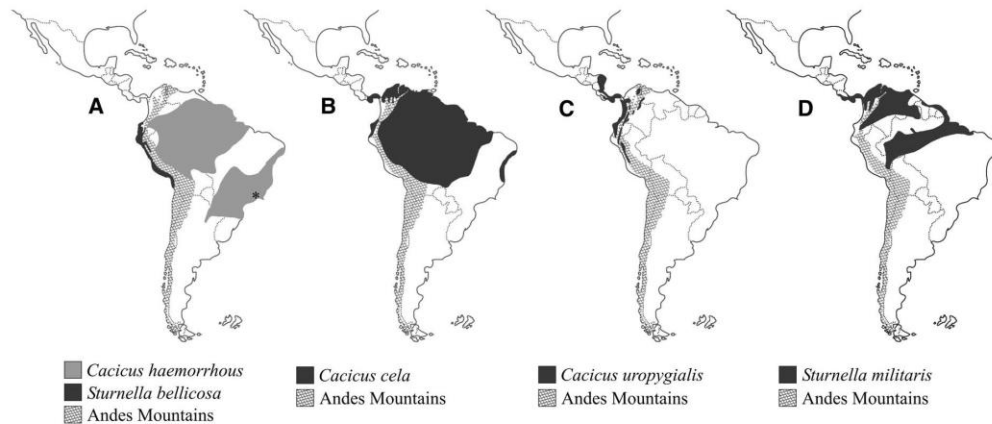
The second morphotype observed in this study was very similar to the morphology described for *I. bellicosa*, except for the shape of oöcysts, which were more ellipsoidal in the description of Upton et al. (1995). However, it would be unwise to consider a new species only based on a slight morphometric difference of the oöcyst, which can be derived from natural polymorphism or a result of environmental and host factors (Fayer, 1980; Gardner & Duszynski, 1990). In any case, it is noteworthy that *I. bellicosa* was originally described from *S. bellicosa* which is allopatric with *C. haemorrhous*. Figure 3A demonstrates the geographic ranges of these icterids *trans*-Andean *S. bellicosa* and *cis*-Andean *C. haemorrhous* with emphasis on the geographical barrier, the Andes Mountains, which separates the populations of these icterids. Similarly, Berto et al. (2014b) report *Isoospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 from two new *cis*-Andean hosts, *Gymnophithys salvini* (Berlepsch) and *Willisornis poecilinotus* (Cabanis), which are allopatric with the *trans*-Andean host type *Hylophylax naevioides* (Lafresnaye).

The main assumption introduced by Berto et al. (2014b) for dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds can be reiterated in the current work. In this thought, icterids with *trans*- and *cis*-Andean distributions could have been infected with *I. bellicosa* in the *trans*-Andean region and transmitted to *C. haemorrhous* in the *cis*-Andean region, dispersing *I. bellicosa* across the Andes. *Cacicus uropygialis* Lafresnaye (Fig. 3B), *C. cela* (Fig. 3C) and *Sturnella militaris* (L.) (Fig. 3D) are congeneric species that have *trans*- and *cis*-Andean distributions sympatric with *S.*

**Table 1** Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from bird hosts of the Icteridae

Species	Host	Oöcyst			Sporocyst			Reference
		Shape	Length × Width	L/W ratio	Length × Width	L/W ratio	Stieda body	
<i>Isoospora guaxi</i> n. sp.	<i>Cacicus haemorrhous</i> (L.)	sub-spheroidal	28–34 × 27–32 (30.9 × 29.0)	1.0–1.1 (1.06)	17–21 × 12–15 (19.3 × 13.8)	1.3–1.6 (1.41)	knob-like, 1.0 × 2.0	Present study
<i>Isoospora bellicosa</i> Upton, Stampfer & Whitaker, 1995	<i>Cacicus haemorrhous</i> (L.) <i>Sturnella bellicosa</i> deFilippi	sub-spheroidal to ovoidal	24–32 × 23–27 (27.1 × 25.0)	1.0–1.2 (1.08)	16–21 × 10–12 (18.1 × 10.9)	1.5–1.7 (1.65)	knob-like, 1.5 × 2.5	Present study
<i>Isoospora divitis</i> Pellérdy, 1967	<i>Dives atrovialaceus</i> (d'Orbigny)	sub-oblond	26–32 × 21–26 (29.4 × 23.5)	1.1–1.4 (1.25)	17–19 × 10–11 (17.8 × 10.7)	1.5–1.8 (1.67)	large, 1.5 × 2.5	Upton et al. (1995)
<i>Isoospora cacici</i> Lainson, 1994	<i>Cacicus cela</i> (L.)	sub-spheroidal	22–30 × 20–28	–	(17 × 13)	–	conspicuous	Pellérdy (1967)
<i>Isoospora icterus</i> Upton & Whitaker, 2000	<i>Icterus icterus</i> (L.)	sub-spheroidal	22–28 × 20–26 (26.5 × 23.7)	1.0–1.2 (1.1)	17–19 × 11–14 (17.7 × 12.5)	1.2–1.5 (1.4)	prominent, stopper shaped	Lainson (1994)
<i>Isoospora graccamae</i> Upton & Whitaker, 2000	<i>Icterus graccamae</i> Cassin	sub-spheroidal	27–32 × 25–30 (28.9 × 27.2)	1.0–1.1 (1.06)	17–19 × 12–14 (17.8 × 12.8)	1.3–1.5 (1.39)	nipple-like, 1.5 × 2.0	Upton & Whitaker (2000)
			20–26 × 19–25 (23.9 × 22.3)	1.0–1.2 (1.07)	14–16 × 10–11 (15.5 × 10.7)	1.4–1.5 (1.44)	stout, 1.0 × 1.0	Upton & Whitaker (2000)





**Fig. 3** Geographic range of several *Cacicus* spp. and *Sturnella* spp. in South America [adapted from De las Casas et al. (2004), BirdLife International (2015) and IUCN (2015)]. Hosts of *Isospora bellicosa* are Peruvian meadowlarks *Sturnella bellicosa* and red-rumped caciques *Cacicus haemorrhous*. *Sturnella bellicosa* is allopatric with *C. haemorrhous*, besides being separated by the Andes (A). Yellow-rumped cacique *Cacicus cela* (B), scarlet-rumped cacique *Cacicus uropygialis* (C) and red-breasted blackbird *Sturnella militaris* (D) are examples of *trans*- and *cis*-Andean icterid birds that are sympatric with *S. bellicosa* and (or) *C. haemorrhous*. The asterisk indicates the approximate location of the collection point of the current study

*bellicosa* and *C. haemorrhous*; therefore, these species are examples of possible dispersers of *I. bellicosa* across the Andes. Additionally, it is noteworthy that some ornithological studies have demonstrated the ability of several passerines to cross or bypass the Andes Mountains especially in recent decades, as a consequence of the accelerated rate of habitat loss and fragmentation along the Andean slopes and adjacent lowlands, coupled with the effect of global warming on the geographical ranges of the species (De las Casas et al., 2004; Avendaño et al., 2013).

It is also important to note that the red-rumped caciques infected in the current work were captured in southeastern Brazil (Fig. 3A), at the opposite end side of South America. This south-eastern population of *C. haemorrhous* is allopatric with the north-western population, which is close to the populations of *Sturnella* spp. In this sense, it is concluded that *Cacicus* spp., such as *C. cela*, or other icterids susceptible to *I. bellicosa* that have geographical ranges in central Brazil should have transmitted *I. bellicosa* to the south-eastern population of *C. haemorrhous*.

In conclusion, *I. guaxi* is considered as new to science and the sixth isosporoid coccidium reported from an icterid bird. Additionally, a new host for *I. bellicosa* is recorded once sporulated oöcysts with

similar features were recovered from *C. haemorrhous* supporting parasite transmission between allopatric birds of same family and different genera that inhabit opposite sides of the Andes.

**Acknowledgements** We are thankful to the staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento.

**Funding** This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** Field collecting permits were issued to B.P. Berto by SISBIO/ICMBio (license No. 49605–1) and CEUA/ICBS/UFRRJ (protocol No. 008/2015).

#### References

- Avendaño, J. E., Cortés-Herrera, J. O., Briceño-Lara, E. R., & Rincón-Guarín, D. A. (2013). Crossing or bypassing the Andes: a commentary on recent range extensions of *cis*-

- Andean birds to the West of the Andes of Colombia. *Orinoquia*, 17, 207–214.
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
- Berto, B. P., Lopes, B. do B., Melinski, R. D., de Souza, A. H. N., Ribas, C. C., de Abreu, F. H., et al. (2014a). Coccidial dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isoospora sagittulae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from nonsympatric hosts. *Canadian Journal of Zoology*, 92, 383–388.
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014b). Studies on coccidian oöcysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 1–15.
- BirdLife International (2015). <http://www.birdlife.org>. Last accessed 13 May, 2016.
- De las Casas, J. C., Stiles, F. G., Bolívar, I. A., & Murillo, J. I. (2004). Range extensions of two species of “red-breasted” meadowlarks (Icteridae: Sturnella) in Colombia. *Ornitología Colombiana*, 2, 37–40.
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336.
- Fayer, R. (1980). Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. *Veterinary Parasitology*, 6, 75–103.
- Feeckes, F. (1981). Biology and organization of two sympatric caciques, *Cacicus c. cela* and *Cacicus h. haemorrhous* (Icteridae, Aves) in Suriname. *Ardea*, 69, 83–107.
- Gardner, S. L., & Duszynski, D. W. (1990). Polymorphism of eimerian oöcysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *Journal of Parasitology*, 76, 805–811.
- IUCN. (2015). International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. <http://www.iucnredlist.org>. Last accessed 13 May, 2016.
- Lainson, R. (1994). Observations on some avian coccidian (Apicomplexa: Eimeriidae) in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 303–311.
- Parkes, K. C. (1970). A revision of the red-rumped cacique, *Cacicus haemorrhous* (Aves: Icteridae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 83, 203–214.
- Pellérdy, L. (1967). Three new coccidia parasitic in Cuban birds (Protozoa: Sporozoa). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 13, 227–230.
- Sick H. 1997. *Ornitologia Brasileira. Uma Introdução*. Brasília: Editora Nova Fronteira, 862 p.
- Upton, S. J., Stamper, M. A., & Whitaker, B. R. (1995). *Isoospora bellicosa* sp. n. (Apicomplexa) from a Peruvian red-breasted meadowlark, *Sturnella bellicosa* (Passeriformes: Icteridae). *Archiv für Protistenkunde*, 145, 132–134.
- Upton, S. J., & Whitaker, B. (2000). New species of *Isoospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from the troupial and white-edged oriole (*Icterus* spp.) (Aves, Passeriformes, Icteridae). *Acta Parasitologica*, 45, 67–70.



***Isohora lopesi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae)  
from the eastern white-throated spadebill *Platyrrhinus  
mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae)  
in South America**

Lidiane Maria da Silva-Carvalho · Danilo Giovanni Narciso Pastura ·  
Jennifer Vieira Gomes · Priscyenne Barreto Siqueira · Mariana Borges Rodrigues ·  
Viviane Moreira de Lima · Bruno Pereira Berto

Received: 9 January 2018 / Accepted: 3 April 2018 / Published online: 2 May 2018  
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

**Abstract** A species of *Isohora* Schneider, 1881 (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) considered as new to science is described and characterised molecularly from the eastern white-throated spadebill *Platyrrhinus mystaceus* Vieillot in the Parque Nacional do Itatiaia, southeastern Brazil. *Isohora lopesi* n. sp. has oöcysts that are subspheroidal to ovoidal, 18–24 × 18–22 (20.6 × 19.7) µm, with smooth, bilayered wall, c. 1.5 µm thick. Micropyle and oöcyst residuum are absent, but one polar granule is present.

Sporocysts are ellipsoidal, 12–16 × 8–11 (14.4 × 8.6) µm. The Stieda body is flattened to half-moon-shaped and sub-Stieda body is rounded. Sporocyst residuum is present, consisting of numerous spherules of different sizes. Sporozoites are vermiform with anterior and posterior refractile bodies and nucleus. Molecular analysis was conducted at the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene. This new isolate exhibited similarity greater than 98% with *Isohora* spp. isolates from spectacled warblers *Sylvia conspicillata* Temminck, 1820. This is the fourth isosporoid coccidian described from New World tyrannid birds, but is the first to have a complementary molecular characterisation.

This article was registered in the *Official Register of Zoological Nomenclature* (ZooBank) as A03A911C-95B2-404A-A8D4-D3BDDFF598468. This article was published as an Online First article on the online publication date shown on this page. The article should be cited by using the doi number. This is the Version of Record.

### Introduction

The Brazilian territory has a rich diversity in its avifauna. In the latest listing of bird species records, 29 species were added reaching 1,872 species occurring in Brazil (CBRO, 2014). The eastern white-throated spadebill *Platyrrhinus mystaceus* Vieillot is one of the smallest species that inhabits the interior of conserved forests. It has a wide geographical range from Mexico to Bolivia and Argentina. In Brazil, it is distributed from the northeast to the south (Sick, 1997; BirdLife International, 2016).

According to the Brazilian Committee of Ornithological Records (CBRO, 2014), *P. mystaceus* is classified in the order Passeriformes, suborder

L. M. da Silva-Carvalho · M. B. Rodrigues  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465  
km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

D. G. N. Pastura · J. V. Gomes · P. B. Siqueira  
Curso de Graduação em Ciências Biológicas,  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465  
km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

V. M. de Lima · B. P. Berto (✉)  
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica,  
Rio de Janeiro 23897-000, Brazil  
e-mail: berto.ufrj@gmail.com

Tyranni, parvorder Tyrannida, superfamily Tyrannoidea and family Platyrinchidae, which includes four other *Platyrinchus* spp., *Neopipo cinnamomea* (Lawrence) and *Calyptura cristata* (Vieillot) in Brazil. In contrast, the BirdLife International (2016), which is currently based on the checklist of del Hoyo et al. (2016), and Brands (2017), classifies *P. mystaceus* in the family Tyrannidae, which is much more comprehensive with 450 species worldwide.

Similar to other passerines, spadebills, tyrants, flycatchers and other tyrannid birds can be parasitised by coccidia. Boughton et al. (1938) and Kawazoe et al. (1989) reported *Isoospora* spp. from the eastern phoebe *Sayornis phoebe* (Latham) and the blue-billed black-tyrant *Knipolegus cyanirostris* (Vieillot); however, these coccidian species were not described or named. Since the 2000s, *Isoospora* spp. were described from New World tyrannid birds, i.e. *Isoospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009, *Isoospora mionectesi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2009 and *Isoospora attilae* Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015, originally described from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin), the greyhooded flycatcher *Mionectes rufiventris* Cabanis, and the grey-hooded attila *Attila rufus* (Vieillot), respectively. The hosts of these three species inhabited the same locality, the Marambaia Island in the southeastern Brazil (Berto et al., 2009a, b; Rodrigues et al., 2015).

The aim of this study was to examine the faeces from eastern white-throated spadebills *P. mystaceus* to determine what coccidian parasites were present. These *P. mystaceus* specimens were captured in the Parque Nacional do Itatiaia (PNI), a protected area with a high degree of vulnerability located in the Serra da Mantiqueira on the border of three states in southeastern Brazil, Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo.

## Materials and methods

### Sample collection

Five expeditions were conducted in the PNI boundaries between March 2015 and October 2016. Sampling occurred in March 2015 (22°27'38"S, 44°35'34"W); May 2015 (22°26'17"S, 44°37'33"W); March 2016 (22°19'46"S, 44°32'11"W); July 2016 (22°26'16"S, 44°18'33"W) and October 2016

(22°27'38"S, 44°35'34"W). A total of 14 *P. mystaceus* were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes and faeces collected immediately after defecation. After identification of the species, the birds were photographed and released and stool samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% ( $K_2Cr_2O_7$ ) solution at 1:6 (v/v).

### Morphological analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 days or until ~70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e. Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

### Molecular analyses

The oöcysts identified with the characteristic features of the new species under light microscopy, were isolated, resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the purified oöcysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oöcysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of c.302 bp in size. The

internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of *c.*257 bp in size. The PCR reaction contained 10 µl of 5× Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of 10 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 47°C for 45 s, and 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analysed and edited using the program Chromas 2.6.

#### DNA sequence analyses

The newly generated sequences were compared to those for *Isoospora* spp. and other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for *Isoospora* spp. at the *cox1* sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura et al., 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) and Maximum Parsimony (MP) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

## Results

Fourteen *P. mystaceus* were examined and three were positive for coccidia. All observed oöcysts were characteristic of *Isoospora*. This material is described below.

### Family Eimeriidae Minchin, 1903 Genus *Isoospora* Schneider, 1881

#### *Isoospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto n. sp.

*Type-host*: *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae), eastern white-throated spadebill.

*Type-locality*: Parque Nacional do Itatiaia (22°27'S, 44°35'W), southeastern Brazil.

*Type-specimens*: Photosyntypes, line drawing, and oöcysts in 70% ethanol are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under the accession number MZURPTZ2017003. Phototypes and line drawings are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labioc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-79/2017. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

*Site in host*: Unknown.

*Prevalence*: 21% (3 out of 14 birds infected).

*Representative DNA sequence*: One representative *cox1* sequence was deposited in the GenBank database under the accession number MF438267.

*ZooBank registration*: To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN, 2012), details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *Isoospora lopesi* is urn:lsid:zoobank.org:act:ED3F1187-FB31-439E-B5E2-9F3C0A050BE0.

*Etymology*: The specific name is derived from the family name of the Brazilian parasitologist Dr Carlos Wilson Gomes Lopes, given in his honor for his contribution to the study of Protozoa.

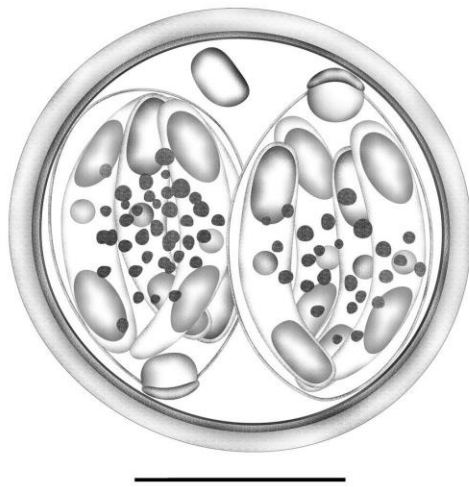
#### Description (Figs. 1, 2)

##### *Sporulated oöcyst*

Oöcysts (n = 25) subspheroidal to ovoidal, 18–24 × 18–22 (20.6 × 19.7); length/width (L/W) ratio 1.0–1.2 (1.05). Wall bi-layered, 1.3–1.6 (1.5) thick, outer layer smooth, *c.*2/3 of total thickness. Micropyle and oöcyst residuum both absent, but one polar granule is present.

*Sporocyst and sporozoites*

Sporocysts (n = 24) 2, ellipsoidal, 12–16 × 8–11 (14.4 × 8.6); L/W ratio 1.5–1.9 (1.7). Stieda body present, flattened to half-moon-shaped, 1.0 × 2.5; sub-Stieda body present, rounded, 2.0 × 2.5; para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites 4, vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and centrally located nucleus.



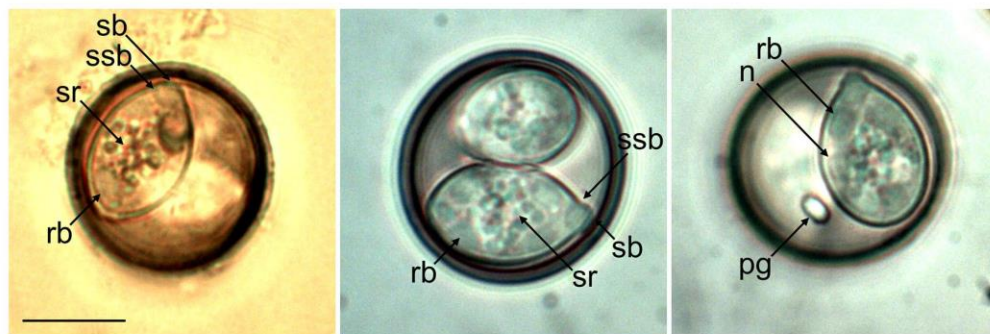
**Fig. 1** Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isospora lopesi* n. sp. ex *Platyrrinchus mystaceus*. Scale-bar: 10 μm

Remarks

Following the evidence that demonstrate specificity at the familial level reported in papers on the taxonomy of coccidians of Passeriformes (Duszynski & Wilber, 1997; Berto et al., 2011; Silva et al., 2016), *I. lopesi* n. sp. was compared in detail with coccidian species that are morphologically similar and parasitise birds belonging to the same host family. To date, three *Isospora* spp. are recorded from hosts of the Tyrannidae (Table 1). *Isospora mionectesi* has oocysts and sporocysts larger than *I. lopesi*. The oocysts of *I. attilae* and *I. feroxis* have similar size and shape to *I. lopesi* n. sp.; however, it can be easily distinguished by the flattened to half-moon-shaped Stieda body. In addition, sporocysts of *I. lopesi* n. sp. are considerably more elongated than those of *I. feroxis* which is morphometrically demonstrated by the shape index (1.7 vs 1.4). *Isospora attilae* possesses sporocysts overlapping the size range for *I. lopesi* n. sp. However, the sporocyst in *I. attilae* is more tapered at the end of the Stieda body and has a smaller sporocyst residuum (Berto et al., 2009a, b; Rodrigues et al., 2015).

Phylogenetic analysis

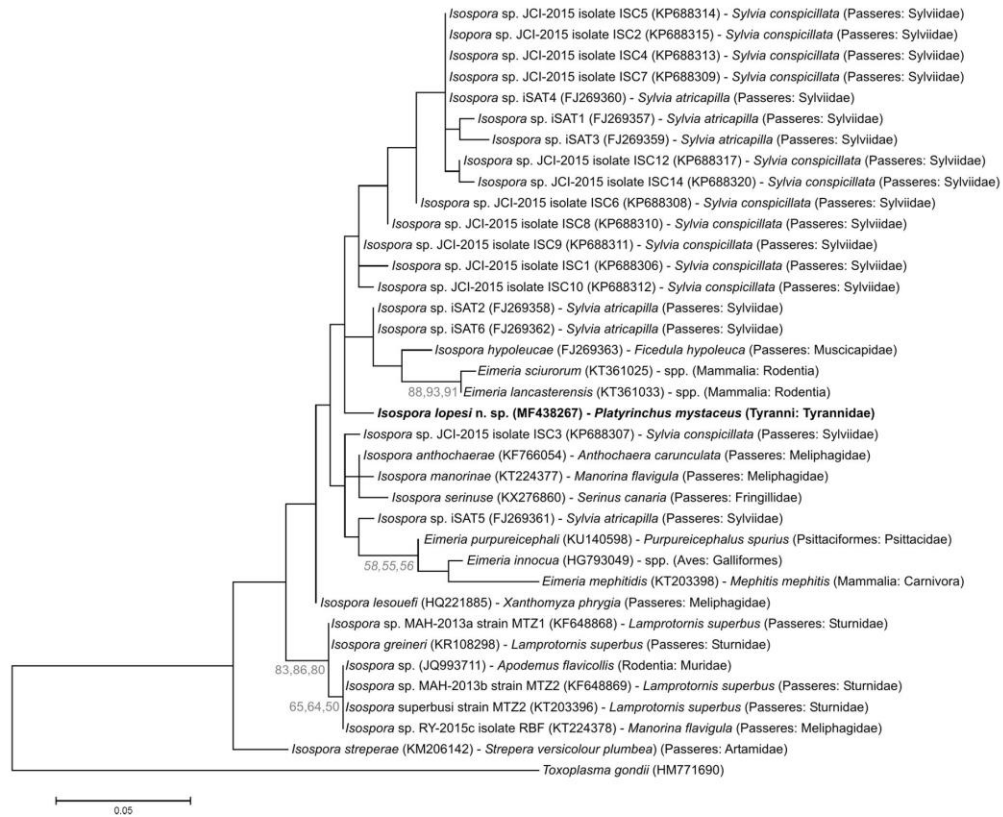
DNA amplification of the oocysts of *I. lopesi* n. sp. showed a clear band of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 30 sequences for avian *Isospora* spp. and five sequences for *Eimeria* spp. available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. *Isospora lopesi* n. sp.



**Fig. 2** Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora lopesi* n. sp. ex *Platyrrinchus mystaceus*. Abbreviations: pg, polar granule; sb, Stieda body; ssb, sub-Stieda body; sr, sporocyst residuum; rb, refractile body; n, nucleus. All to same scale. Scale-bar: 10 μm

**Table 1** Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from New World tyrannid birds (Tyrannidae)

Species	Host	Oöcyst					Sporocyst					Reference	
		Shape	Size (µm)	Shape index	Polar granule	Shape	Size (µm)	Shape index	Stieda body	Sub-stieda body	Sporocyst residuum		
<i>Isoospora feroxis</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009	<i>Mniotilta ferox</i> (Gmelin)	Subspheroidal	18–20 × 7–20 (18.7 × 18.0)	1.0–1.1 (1.1)	2	Usually	Ovoidal	11–13 × 8–10 (11.7 × 8.5)	1.0–1.5 (1.4)	Ovoidal, flattened	Prominent	Diffuse	Berto et al. (2009a)
<i>Isoospora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis	Ellipsoidal	23–31 × 9–23 (28.3 × 21.2)	1.2–1.4 (1.3)	1 or 2	1 or 2	Elongate-ellipsoidal	17–22 × 0–13 (19.7 × 11.7)	1.6–1.8 (1.7)	Rounded	Prominent	Subspherical, compact	Berto et al. (2009b)
<i>Isoospora atillae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot)	Subspheroidal to ellipsoidal	18–22 × 18–21 (20.3 × 19.0)	1.0–1.2 (1.07)	1 or 2	1 or 2	Ellipsoidal	12–15 × 7–9 (13.5 × 7.9)	1.6–1.9 (1.7)	Knob-like	Rounded to trapezoidal	Diffuse	Rodrigues et al. (2015)
<i>Isoospora lopesi</i> n. sp.	<i>Platyrrinchus mystacicus</i> Vieillot, 1818	Subspheroidal to ovoidal	18–24 × 8–22 (20.6 × 19.7)	1.0–1.2 (1.05)	1	1	Ellipsoidal	12–16 × 8–11 (14.4 × 8.6)	1.5–1.9 (1.7)	Flattened to half-moon-shaped	Rounded	Diffuse	Present study



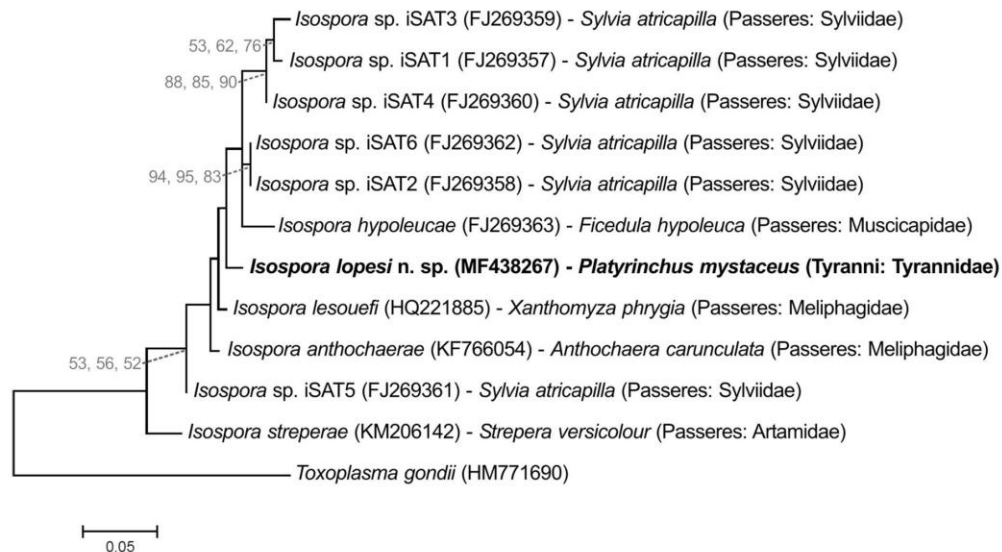
**Fig. 3** Maximum likelihood tree estimated from the *cox1* sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1,000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining, Maximum Likelihood and Maximum Parsimony, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

grouped with 16 *Isospora* spp. isolates from *Sylvia* spp., *Isospora hypoleucae* Dolnik, Rönn & Bensch, 2009 and two *Eimeria* spp. from rodents but with no statistical support. Among these, the new species showed the highest similarity of 98.5% and 98.0% with *Isospora* sp. isolates from the spectacled warbler *Sylvia conspicillata* Temminck (GenBank: KP688311 and KP688312; see Illera et al., 2015). In a second analysis, a subset of 215 bp long *cox1* gene sequences for 10 *Isospora* spp. was used (Fig. 4). In this analysis, *I. lopesi* n. sp. was resolved as a basal sister taxon to a clade comprising *Isospora hypoleucae* Dolnik, Rönn & Bensch, 2009 and five *Isospora* sp. isolates from the Eurasian blackcaps *Sylvia atricapilla* (Linnaeus) with similarities of 96.1% and 95.1–97.5%, respectively.

### Discussion

*Isospora lopesi* n. sp. is the first coccidian parasite of the Tyrannidae to have its *cox1* sequence deposited in the GenBank database. As shown in the tree in Fig. 3, most of the available *cox1* sequences for *Isospora* spp. from hosts of the Passeriformes are from the families Sylviidae, Meliphagidae and Sturnidae. All these families belongs to the suborder Passeres, while *P. mystaceus* belongs to the suborder Tyranni (suboscines), which contains families of primitive passerines that are phylogenetically distant from families of Passeres. Despite this, *I. lopesi* n. sp. exhibited high similarity with isolates of *Isospora* spp. from hosts of the Sylviidae (KP688311 and KP688312; 98.5% and





**Fig. 4** Maximum likelihood tree estimated from the 215 bp long *cox1* sequence dataset for *Isospora* spp. Numbers at nodes represent bootstrap support (1,000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining, Maximum Likelihood and Maximum Parsimony, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

98.0%). We predict that when more *cox1* sequences of *Isospora* spp. from hosts in the Tyranni are deposited in the GenBank database, this tree would rearrange to form one or more clades of *Isospora* spp. from suboscines, where *I. lopesi* n. sp. would be placed.

The 28S and 18S rRNA genes have been recognized as useful loci to differentiate *Isospora* spp. from passerines and to estimate their interspecific relationships (Yang et al., 2015, 2016; Tokiwa et al., 2017). Furthermore, the 18S rRNA is the most common locus used for molecular characterisation of coccidian parasites as evidenced by the large number of 18S rRNA sequences from coccidia on GenBank. However, in the present study the *cox1* gene was chosen for genotyping because it is indicated as the most suitable for phylogenetic studies by having a higher resolving power than the 18S rRNA gene in delineating recent speciation events (Yang et al., 2015; Ogedengbe et al., 2011). In addition, in recent studies of Yang et al. (2015, 2016) with genotyping at 18S, 28S and *cox1* loci of *Isospora* spp. from passerines, it was emphasised that the *cox1* PCR primers originally used by Dolnik et al. (2009), which generate 215 bp amplicons, may be more reliable for species delimitation of *Isospora* spp. In this sense, the primers of Dolnik et al.

(2009) were chosen for genotyping of *I. lopesi* in the present study. Following Yang et al. (2015, 2016), phylogenetic analyzes were initially constructed comparing *I. lopesi* n. sp. with the most similar *cox1* sequences of varying lengths deposited in GenBank (Fig. 3) and, subsequently, only with *Isospora* sequences with a length of c.215 bp (Fig. 4).

The Tyrannidae is one of the largest families of New World passerine birds (BirdLife International, 2016); however, a few coccidian species are reported from this family (Berto & Lopes, 2013). The study of coccidia from hosts of the Tyrannidae becomes more relevant because two species of *Eimeria*, which is an uncommon coccidian parasite genus of Passeriformes, are described from birds of this family (Berto et al., 2008, 2009a). Allied to this, it is also important to know which of *Isospora* spp. have an extra-intestinal cycle, as species with this cycle are recognized to be more pathogenic causing the so-called atoxoplasmosis (Berto et al., 2011). These extra-intestinal *Isospora* spp. were previously identified and/or named as *Lankesterella* Labbé, 1899 or *Atoxoplasma* Garnham, 1950, until Box (1981) associated the extra-intestinal merogony in canaries with an *Isospora* infection. In this way, all blood forms

described as *Atoxoplasma* and *Lankesterella* in passerines were redescribed as *Isoospora* (see Berto et al., 2011). Currently, with the molecular study and with the increasing number of *Isoospora* spp. sequences on GenBank, it is possible to identify if a species with morphological and molecular description possesses an extra-intestinal cycle through the molecular detection by PCR/sequencing in samples of blood from passerines (Dolnik et al., 2009; Hafeez et al., 2014). The identification of extra-intestinal species which may have the potential to cause severe coccidiosis (atoxoplasmosis) may help classify hosts and/or families more or less susceptible to the disease, and therefore, guide decision-making for conservation, principally in protected areas.

Based on the morphological features described above, *I. lopesi* is considered as new to science and the fourth isosporoid coccidian species reported from a New World tyrannid bird. In addition, this is the first coccidian parasite of a host of the Tyranni to have a molecular characterisation of the *cox1* gene.

**Acknowledgements** We are thankful to the staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento.

**Funding** This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** Field collecting permits were issued by BPB by SISBIO/ICMBio (license No. 49605–1) and CEUA/ICBS/UFRRJ (protocol No. 008/2015). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

#### References

- Berto, B. P., Flausino, W., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2008). *Eimeria divinolimai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the *Casiornis rufus* Vieillot, 1816 (Passeriformes: Tyrannidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, 33–35.
- Berto, B. P., Flausino, W., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009a). *Isoospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. *Acta Parasitologica*, 54, 301–304.
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W. L., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2013). Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In: Ruiz, L., & Iglesias, L. (Eds), *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease*. New York: Nova Science Publishers, pp. 47–66.
- Berto, B. P., Luz, H. R., Flausino, W., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009b). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 74, 75–80.
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 1–15.
- BirdLife International (2016). <http://www.birdlife.org>. Accessed 13 November 2017.
- Boughton, D. C., Boughton, R. B., & Volk, J. (1938). Avian hosts of the genus *Isoospora* (Coccidiida). *Ohio Journal of Science*, 38, 149–163.
- Box, E. D. (1981). *Isoospora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. *Journal of Protozoology*, 28, 244–246.
- Brands, S. J. (2017). *Systema Naturae 2000*, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. <http://taxonomicon.taxonomy.nl>. Accessed 13 November 2017.
- CBRO. (2014). *Listas das aves do Brasil*. <http://www.cbro.org.br>. Accessed 13 November 2017.
- del Hoyo, J., Collar, N. J., Christie, D. A., Elliott, A., Fishpool, L. D. C., Boesman, P., & Kirwan, G. M. (2016). *HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World*. Barcelona-Cambridge: Lynx Edicions and BirdLife International, 904 pp.
- Dolnik, O. V., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2009). Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174.
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336.
- Hafeez, M. A., Stasiak, I., Delnatte, P., El-Sherry, S., Smith, D. A., & Barta, J. R. (2014). Description of two new *Isoospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). *Parasitology Research*, 113, 3287–3297.
- ICZN. (2012). *International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication*. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 69, 161–169.
- Illera, J. C., Fernández-Álvarez, Á., Hernández-Flores, C. N., & Foronda, P. (2015). Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *Journal of Biogeography*, 42, 1858–1870.

- Kawazoe, U., Gouvea, H., Jorge, P., Caputo, C. M. E., & Perdigão, J. C. (1989). A survey of intestinal coccidiosis from wild birds from the Itatiaia National Park, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Protozoology*, *36*, 11A.
- Ogedengbe, J. D., Hanner, R. H., & Barta, J. R. (2011). DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*, *41*, 843–850.
- Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. D. B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2015). A new species of *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. *Zootaxa*, *4034*, 193–196.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 pp.
- Silva, L. M., Rodrigues, M. B., Lopes, B. D. B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2016). A new coccidian, *Isoospora paraitatiaensis* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyrgilena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitology Research*, *115*, 745–749.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*, 1596–1599.
- Tokiwa, T., Kojima, A., Sasaki, S., Kubota, R., & Ike, K. (2017). *Isoospora lunaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic Java sparrow in Japan. *Parasitology International*, *66*, 100–105.
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., & Ryan, U. (2015). *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma *domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, *159*, 59–66.
- Yang, R., Brice, B., Jian, F., & Ryan, U. (2016). Morphological and molecular characterization of *Isoospora manorinae* n. sp. in a yellow-throated miner (*Manorina flavigula wayensis*) (Gould, 1840). *Experimental Parasitology*, *163*, 16–23.



## *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region

Lidiane M. Silva-Carvalho<sup>1</sup> · Danilo G. N. Pastura<sup>2</sup> · Mariana B. Rodrigues<sup>1</sup> · Jennifer V. Gomes<sup>2</sup> · Mariana S. Oliveira<sup>3</sup> · Priscyane B. Siqueira<sup>2</sup> · Jhon Lennon G. Oliveira<sup>3</sup> · Sabrina S. Soares<sup>3</sup> · Águida A. Oliveira<sup>4</sup> · Viviane M. Lima<sup>4</sup> · Ildemar Ferreira<sup>4</sup> · Bruno P. Berto<sup>4</sup>

Received: 26 April 2018 / Accepted: 1 June 2018 / Published online: 9 June 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

In the current study, *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992 (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) is reported from white-shouldered fire-eyes *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818) in the Atlantic Forest in southeastern Brazil. To date, this coccidian species was described from antbirds in Ecuador and Brazilian Amazon. In this sense, oocysts and measurements of the description of *I. sagittulae* from Amazonian antbirds were required from the deposit for comparison between samples from the Amazon and Atlantic Forest. The morphology was similar in all aspects, despite the polymorphism associated with the oocyst shape. DNA sequences for the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) locus of the oocysts had similarity of 100%. Therefore, these strong morphological, molecular, and ecological equivalences ensure the unique identification of *I. sagittulae*. Finally, this finding reveals the wide distribution of *I. sagittulae* in the Neotropical region and indicates that other antbirds in the Brazilian Cerrado should disperse *I. sagittulae* to the Amazon and Atlantic Forest.

**Keywords** Taxonomy · Morphology · Phylogeny · Oocysts · Geographic ranges · Parque Nacional do Itatiaia

### Introduction

Thamnophilidae is a family of insectivorous passerine birds that comprises 241 species restricted to the plains and low-altitude forests of the Caribbean Islands, Mesoamerica, and

South America. Evidently, due to the large number of species, it is a highly polymorphic family, but it is predominantly composed of wild birds with insectivorous feeding habits (Sick 1997; CBRO 2014; BirdLife International 2016).

Despite this apparent restriction at low altitudes and the limitation of their distributions to geographical barriers in the Neotropical region, some antbirds appear to cross strong geographical barriers, or at least they have populations that are not limited or blocked by these geographical barriers (Sick 1997; BirdLife International 2016).

The possibility of antbirds crossing strong geographical barriers was assumed by Berto et al. (2014a), which evidenced a coccidian dispersion across *trans*- and *cis*-Andean regions by antbirds that inhabit both regions and possibly cross the Andes mountains. The eimeriid coccidia of birds has predominantly oral-fecal transmission; i.e., it occurs through the ingestion of oocysts, which are the infective stages of the coccidia shed in the feces of the host. Therefore, the transmission of coccidia necessarily occurs when susceptible hosts inhabit the same environment. In Berto et al. (2014a), the coccidian parasite

Section Editor: Berit Bangoura

✉ Bruno P. Berto  
berto.ufirj@gmail.com

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

<sup>2</sup> Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

*Isoospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 was reported from white-throated antbirds *Oneillornis salvini* (Berlepsch, 1901) (syn. *Gymnopathys salvini*) and from scale-backed antbirds *Willisornis poecilinotus* (Cabanis, 1847) in Brazilian Amazon, in the *cis*-Andean region; however, this parasite had been originally described from *Hylophylax naeviooides* Lafresnaye, 1847, a thamnophilid bird that has a *trans*-Andean distribution in Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, and Panama (McQuiston and Capparella 1992). In this sense, it was presumed that the transmission occurred through antbirds with both *trans*- and *cis*-Andean distributions, as *Cercomacra tyrannina* Sclater, 1855 and *Formicivora grisea* (Boddaert, 1783), which could have maintained and transmitted *I. sagittulae* across the Andes.

In this context, the current work aims to contribute to the knowledge on the identification, distribution, and dispersion of *I. sagittulae* in thamnophilid birds in the Neotropical region, reporting the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818) as a new host in the Atlantic Forest of southeastern Brazil and thus demonstrating the wide dispersion of *I. sagittulae*, in addition to morphologically and molecularly comparing the samples of the Amazon and Atlantic Forest.

## Materials and methods

### Sample collection

A total of 12 expeditions were conducted in 2 different localities in southeastern Brazil: (1) Parque Nacional do Itatiaia, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo (ICMBIO 2016), and (2) Caçaria at the Municipality of Pirai in the State of the Rio de Janeiro. A total of 20 white-shouldered fire-eye *P. leucoptera* were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes with clean ground paper. After identification of the species, the bird was photographed and released. A fresh droplet of feces from each individual bird was placed in an individually centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% ( $K_2Cr_2O_7$ ) solution.

### Obtaining the Amazon samples

Oocysts in 70% ethanol and the original measurements of *I. sagittulae* from *O. salvini* and *W. poecilinotus* identified in Berto et al. (2014a), which were deposited in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios (<http://r1.ufrjr.br/labicoc/colecao.html>) at UFRRJ under repository number 52/2014, were required for morphological and molecular comparison.

## Morphological analyses

Samples were carried to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (specific gravity 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014b). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements, were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eurekam 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

## Statistical evaluation

Two parametric statistical methods were employed after previous evaluation of the data by D'Agostino's test of normality: (1) analysis of variance (ANOVA) was used to compare measurements of the length, width, and shape index of the oocysts and sporocysts recovered from *O. salvini*, *W. poecilinotus*, and *P. leucoptera*. The statistical package Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007) was used to calculate the mean, variance, degree of freedom, and *p* value (Sampaio 2002; Berto et al. 2014b) and (2) linear regression to determine the distribution of oocysts recovered from *O. salvini* and *W. poecilinotus* in Amazon and *P. leucoptera* in Atlantic Forest using methods proposed by Norton and Joyner (1981) and subsequently modified by Berto et al. (2014b). The graphs and coefficient of regression line were obtained using the software Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, WA).

## Molecular analyses

The oocysts of *I. sagittulae* from *O. salvini*, *W. poecilinotus*, and *P. leucoptera* were isolated on the microscopic slide, resuspended in PBS, and washed by centrifuging until the supernatant become clear (Dolnik et al. 2009). DNA was extracted from the purified oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers CO1bF1 5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A and CO1bR1 5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA produced a PCR product size of ~302 pb. The internal primers CO1bF2 5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C and CO1bR2 5'-ATA GTA

TGT ATC ATG TAR WGC AA produced an amplicon size of ~257 pb. The PCR reaction contained 10  $\mu$ L of 5 $\times$  Green GoTaq $\text{®}$  Flexi Buffer, 3  $\mu$ L of 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu$ L of 10 mM dNTPs, 0.4  $\mu$ M of each primer, 1.25 units of GoTaq $\text{®}$  DNA polymerase, and 3  $\mu$ L of DNA (for primary reaction) or 3  $\mu$ L primary PCR product (for secondary reaction). Both primary and secondary PCRs were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94  $^\circ\text{C}$  for 5 min; followed by 35 cycles of 94  $^\circ\text{C}$  for 30 s, 47  $^\circ\text{C}$  for 45 s, and 72  $^\circ\text{C}$  for 1 min; and a final extension of 72  $^\circ\text{C}$  for 5 min. The amplicons from the second round PCRs were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All the PCR products were sequenced using forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6.

#### DNA sequence analyses

The newly generated sequences were compared to each other and with other coccidian parasite sequences available on GenBank using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for *Isospora*

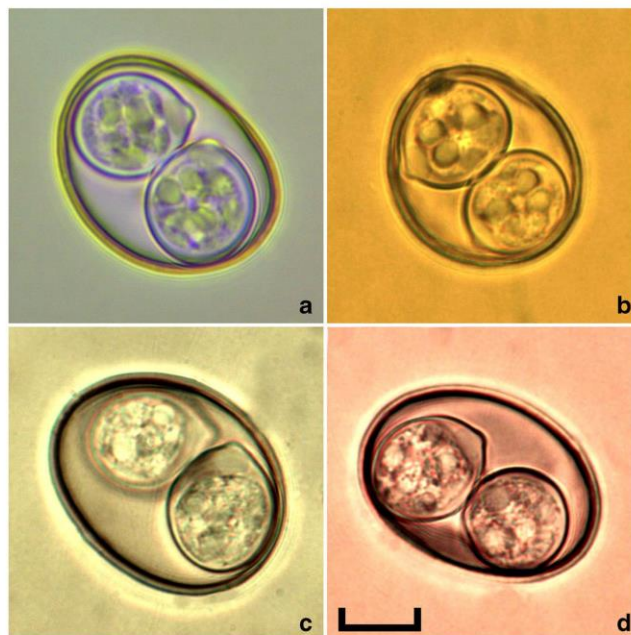
spp. at the *cox1* locus with additional isolates from GenBank/EMBL/DDBJ. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, version 7; Arizona State University, Tempe, AZ, USA). The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) methods, and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

## Results

### Prevalence and morphology

Nine of 18 *P. leucoptera* captured in the Parque Nacional do Itatiaia were positive for *I. sagittulae*. The two *P. leucoptera* captured in Cacaria were negative. Its oocysts (Fig. 1c, d) were irregularly ovoidal to ellipsoidal,  $30.8 (29\text{--}33) \times 24.4 (22\text{--}26) \mu\text{m}$ , with shape index of 1.3 (1.2–1.5). Oocyst wall bilayered and smooth, 1.1  $\mu\text{m}$ . Micropyle, oocyst residuum is absent, but 1–3 (usually 2) polar granules are present. Sporocysts subspherical to ovoidal,  $15.9 (14\text{--}17) \times 13.4 (12\text{--}$

**Fig. 1** Photomicrographs of *Isospora sagittulae* recovered from white-throated antbirds *Oneillornis salvini* (a), common scale-backed antbirds *Willisornis poecilinotus* (b), and white-shouldered fire-eyes *Pyrgilena leucoptera* (c, d). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$



**Table 1** Morphometry of *Isospora sagittulae* oocysts recovered from antbirds (Thamnophilidae)

Host	Locality	n <sup>a</sup>	Oocysts			Sporocysts		
			Length (µm)	Width (µm)	Shape index <sup>b</sup>	Length (µm)	Width (µm)	Shape index <sup>b</sup>
<i>Hylophylax naevioides</i> (Lafresnaye, 1847)	Northwestern Ecuador	21	25–30 (27.5)	21–24 (21.8)	1.27	13–16 (14.8)	12–13 (12.4)	1.1–1.3 (1.19)
<i>Oneillornis salvini</i> (Berlepsch, 1901)	Brazilian Amazon	8	27–31 (29.5) a	21–24 (22.8) a,b	1.2–1.3 (1.29) a	14–17 (15.5) a	12–14 (12.9) a	1.1–1.3 (1.20) a
<i>Willisornis poecilinotus</i> (Cabanis, 1847)	Brazilian Amazon	7	27–28 (27.2) b	20–25 (22.0) a	1.1–1.4 (1.25) a	13–16 (14.6) a	12–13 (12.3) a	1.1–1.2 (1.19) a
<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1818)	Brazilian Atlantic Forest	27	29–33 (30.8) a	22–26 (24.4) b	1.2–1.5 (1.27) a	14–17 (15.9) a	12–15 (13.4) a	1.1–1.3 (1.19) a

Different letters in each column denote statistically significant differences ( $P < 0.01$ ) by ANOVA

<sup>a</sup>Total number of oocysts measured

<sup>b</sup>Length/width ratio

15 µm, with shape index of 1.2 (1.1–1.3). Stieda body thin and flattened, 0.5 high × 2.0 wide. Substieda body triangular to rounded, 2.5 high × 5.0 wide. Parastieda body absent. Sporocyst residuum composed of scattered granules. Sporozoites with a prominent posterior refractile body and a small nucleus.

**Material deposited**

Photovouchers and oocysts in 70% ethanol are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2017005. Photovouchers are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 86/2017. Photographs of the host specimens are deposited in the same collection.

**Comparative morphometry**

Comparative analyses by ANOVA between the oocysts and sporocysts of *I. sagittulae* recovered from *O. salvini*, *W. poecilinotus*, and *P. leucoptera* revealed some significant differences in the size of the oocysts (Table 1). These significant differences and the high irregularity of the shape of the oocysts are also observed in the distribution of measurements in linear regression (Fig. 2).

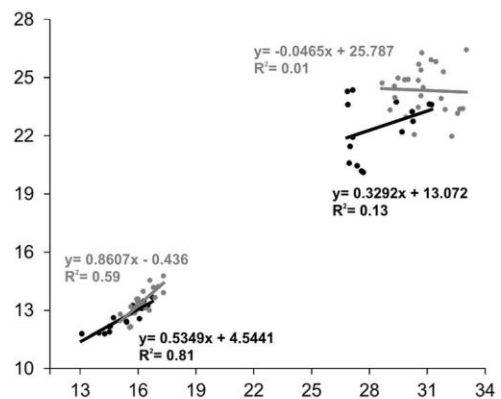
**DNA sequences**

DNA amplification of the oocysts of *I. sagittulae* showed a clear band around ~250 bp. DNA sequences of the oocysts recovered from *P. leucoptera* and *W. poecilinotus* had

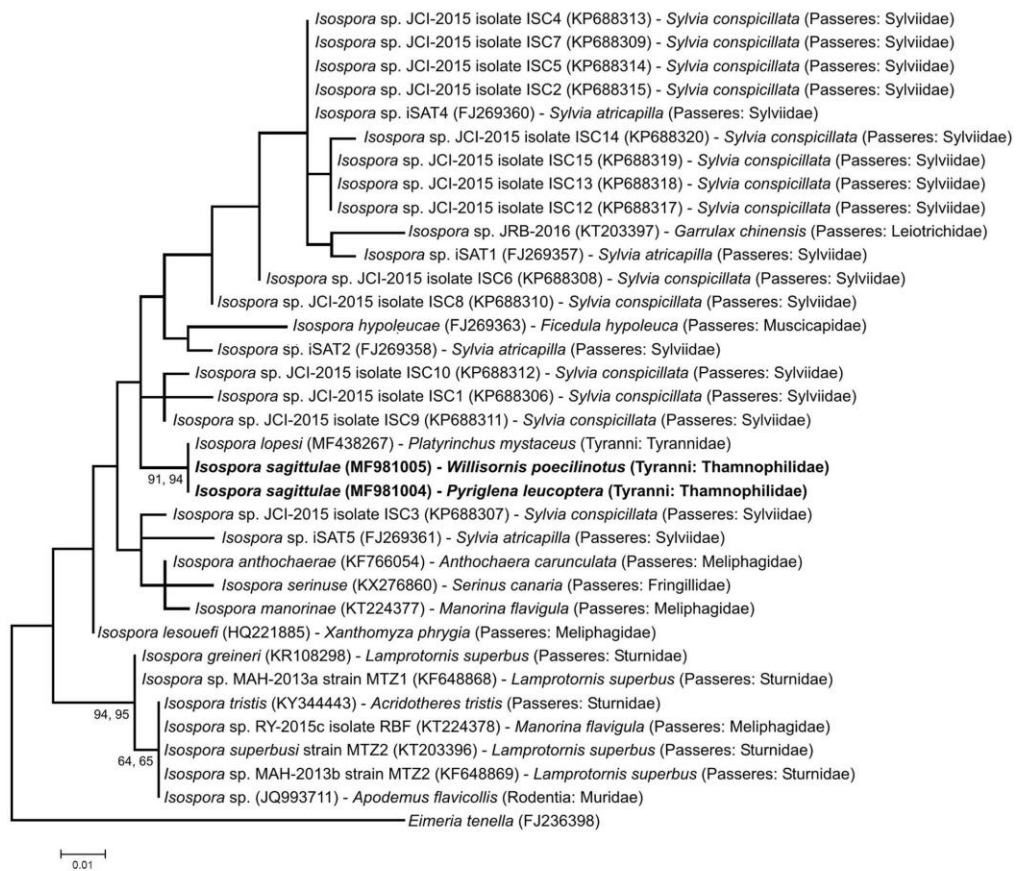
similarity of 100%, and have been deposited in GenBank under the accession numbers MF981004 and MF981005, respectively.

**Phylogenetic analysis**

Phylogenetic analysis included 32 sequences from *Isospora* spp. available in GenBank (Fig. 3). *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isospora sagittulae* from *W. poecilinotus* and *P. leucoptera* sat in a clade with the highest similarity of 99.5% with *Isospora lopesi* Silva-Carvalho and Berto, 2018 (Silva-Carvalho et al. 2018) deposited under accession number MF438267.



**Fig. 2** Comparative linear regressions of oocysts (above) and sporocysts (below) of *Isospora sagittulae* recovered from *O. salvini* and *W. poecilinotus* in Amazon (black) and *P. leucoptera* in Atlantic Forest (gray)



**Fig. 3** Maximum likelihood tree estimated from the *cox1* gene sequences of *Isospora* spp. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

## Discussion

### Morphological and morphometric characterization of the oocysts from the Amazon and Atlantic Forest

In the current work, a larger number of oocysts of *I. sagittulae* was observed (Table 1), which allowed to verify the irregularity in the size and shape of their oocysts. Observing the linear regression in Fig. 2, it is verified that the data points are distant from the regression line, indicating irregularity in the distribution of measurements. In addition, the very low  $R^2$  values obtained from both samples from Amazon and Atlantic Forest of Brazil clearly reveal the polymorphism of the oocysts of *I. sagittulae* (Berto et al. 2014b). This irregular shape was also morphologically observed in some oocysts, mainly in some

with boomerang-like shape (Fig. 1a, c) or other irregular shapes.

This polymorphism has already been related in the literature as being intrinsic to a coccidian species, derived from the different positions of the oocysts during the measurements and/or related to several environmental and host factors, such as stress, nutrition, immunity of the host, the infecting dose, the time of oocysts discharge during the patent period, and phenotypic plasticity (Fayer 1980; Parker and Duszynski 1986; Gardner and Duszynski 1990; Berto et al. 2014b).

### Molecular identification and species delimitation

The genotypic similarity of 100% for the *cox1* locus observed between the samples from *W. poecilinotus* and *P. leucoptera* corroborates with the morphological similarity between these



same samples; therefore, these results emphasize that the oocysts recovered from the hosts of Amazon and Atlantic Forest in Brazil belong to the same species, *I. sagittulae*. The *cox1* gene was chosen for genotyping in the current study because it has been indicated as the most suitable for phylogenetic studies by having a higher resolving power than the 18S rRNA gene in delineating recent speciation events (Yang et al. 2015; Ogedengbe et al. 2011). In addition, in recent studies of Yang et al. (2015, 2016) with genotyping at 18S, 28S, and *cox1* loci of *Isoospora* spp. from passerines, it was emphasized that the *cox1* PCR primers originally used by Dolnik et al. (2009), which generate 215-bp amplicons, may be more reliable for species delimitation of *Isoospora* spp.

The delimitation of coccidian species has been overestimated or underestimated in some works. This discussion was raised by Silva et al. (2016), who highlighted studies where about 1% of genotypic difference resulted in separation in two species, and others where about 3% of genotypic difference did not result in species separation. We agree with Silva et al. (2016), who based the species identification in the guidelines of Duszynski and Wilber (1997), where oocysts should be compared with coccidian species that are feature-similar and belong to the same host family; furthermore, we understand that a species must be identified and classified according to all its morphological, biological, ecological, and molecular characteristics. In other words, according to Kunz (2002), the criterion for identification of new species cannot be just on the basis of a certain number of base exchanges within DNA sequence. Anyway, the strong morphological, molecular, and ecological (host specificity) equivalences of the oocysts observed in the present work ensure the unique identification of *I. sagittulae*.

### Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis (Fig. 3) revealed that *I. sagittulae* is closer (about 99.5%) to *I. lopesi*, and more distant (about ~97%) from *Isoospora* spp. isolated from an Old World warbler, *S. conspicillata* (Illera et al. 2015), which is phylogenetically and geographically distant from the thamnophilid hosts of *I. sagittulae* (delHoyo et al. 2016). Together with the results of Silva-Carvalho et al. (2018), this result evidences the tendency of the formation of a clade containing *Isoospora* spp. of primitive passerines (suborder Tyranni), which should be confirmed while more *Isoospora* spp. from Tyranni are sequenced by *cox1* gene. In this way, this observation strengthens the coevolution concept of the coccidian parasites and its hosts (Odum 1998).

### Distribution and dispersion of *I. sagittulae* in the Neotropical region

Additionally, the results of the current study reinforce the assumption of dispersion of *I. sagittulae* across the Andes,

introduced by Berto et al. (2014a). The morphological and molecular identification of *I. sagittulae* in southeastern Brazil reveals the wide dispersion of *I. sagittulae* in Brazil; therefore, it is assumed that *I. sagittulae* is distributed throughout the Neotropical region where antbirds occur.

Just as in Berto et al. (2014a), the hosts for *I. sagittulae* in the current work are not sympatric. *Oneillornis salvini* and *Willisornis poecilinotus* are endemic to the Amazon, while *P. leucoptera* is endemic to the Atlantic Forest. As shown in Fig. 4, the Cerrado biome is located between these two biomes and, consequently, between the geographic ranges of these species. Thus, it is assumed that antbirds in the Cerrado must also be parasitized by *I. sagittulae* and thus they can transmit and disperse *I. sagittulae* to antbirds in the Amazon and Atlantic Forest. Examples of antbirds that are distributed in the Cerrado and could fulfill this function would be the plain antvireo *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823), the black-bellied antwren *Formicivora melanogaster* (Pelzeln, 1868), the rusty-backed antwren *Formicivora rufa* (Wied, 1831), the black-capped antwren *Herpsilochmus atricapillus* (Pelzeln, 1868), the great antshrike *Taraba major* (Vieillot, 1816), the barred antshrike *Thamnophilus doliatus*



**Fig. 4** Geographic range of the thamnophilid hosts of *Isoospora sagittulae* in the Neotropical region (based on data from BirdLife International 2016). Only *Oneillornis salvini* and *Willisornis poecilinotus* are sympatric with each other in the Amazon. *Hylophylax naevioides* is separated by the Andes. The new host *Pyriglena leucoptera* has geographic range in the Atlantic Forest in southeastern Brazil, and is separated from the populations of the Amazonian hosts by the Cerrado biome

(Linnaeus, 1764), the planalto slaty antshrike *Thamnophilus pelzelni* (Hellmayr, 1924), and the rufous-winged antshrike *Thamnophilus torquatus* (Swainson, 1825) (BirdLife International 2016). Among these species, *D. mentalis*, *T. major*, and *T. dolius* can be highlighted because they have *trans*-Andean and *cis*-Andean distributions, including the Brazilian biomes of Atlantic Forest, Cerrado, and Amazon (BirdLife International 2016); therefore, these species are potential dispersers of *I. sagittulae* in the Neotropical region.

## Conclusions

In conclusion, based on all the results reported in the current study, *P. leucoptera* is recorded as a new host for *I. sagittulae* in the Atlantic Forest in southeastern Brazil, revealing the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical region; in addition, *I. sagittulae* is molecularly identified from *P. leucoptera* and *W. poecilinotus*, in Atlantic Forest and Amazon, respectively, corroborating with the previous morphological identifications.

**Acknowledgements** This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMbio (licenses 42798-1, 45200-1, 49605-1, 54951-1) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014, ICBS-008/2015, IV-6606250616). We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento, and the landowner at Cacaria in the Municipality of Pirai, RJ, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

## References

- Ayres M, Ayres-Junior M, Ayres DL, Santos AAS (2007) BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas. Belém, Mamirauá 364pp
- Berto BP, Lopes BB, Melinski RD, Souza A, Ribas C, Abreu F, Ferreira I, Lopes CWG (2014a) Coccidial dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts. *Can J Zool* 92:383–388
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014b) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1–15
- BirdLife International (2016) The IUCN red list of threatened species. Available from: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 02 Apr 2018
- CBRO (2014) Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Listas das aves do Brasil. Available from: <http://www.cbro.org.br>. Accessed 02 Apr 2018
- delHoyo J, Collar NJ, Christie DA, Elliott A, Fishpool LDC, Boesman P, Kirwan GM (2016) HBW and BirdLife international illustrated checklist of the birds of the world. Lynx Edicions and BirdLife International, Barcelona 904pp
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333–336
- Fayer R (1980) Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Vet Parasitol* 6:75–103
- Gardner SL, Duszynski DW (1990) Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *J Parasitol* 76:805–811
- ICMbio (2016) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 02 Apr 2018
- Illera JC, Fernández-Álvarez Á, Hernández-Flores CN, Foronda P (2015) Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *J Biogeogr* 42:1858–1870
- Kunz W (2002) When is a parasite species a species? *Trends Parasitol* 18: 121–124
- McQuiston TE, Capparella A (1992) *Isospora sagittulae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the spotted antbird (*Hylophylax naevioides*). *Trans Am Microsc Soc* 111:365–368
- Norton CC, Joyner LP (1981) *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology* 83:269–279
- Odum EP (1998) Ecologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 434pp
- Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *Int J Parasitol* 41: 843–850
- Parker B, Duszynski D (1986) Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *J Parasitol* 72:602–604
- Sampaio IBM (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. FEP MVZ Editora, Belo Horizonte 265pp
- Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro 862 pp
- Silva LM, Rodrigues MB, Lopes BB, Berto BP, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG (2016) A new coccidian, *Isospora parnaitatiaensis* n. Sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyrgilena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitol Res* 115:745–749
- Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Siqueira PB, Rodrigues MB, Lima VM, Berto BP (2018) *Isospora lopei* n. Sp. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Syst Parasitol* [in press]
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. Sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59–66
- Yang R, Brice B, Jian F, Ryan U (2016) Morphological and molecular characterization of *Isospora manorinae* n. Sp. in a yellow-throated miner (*Manorina flavigula wayensis*) (Gould, 1840). *Exp Parasitol* 163:16–23



## *Isospora borbai* n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnateaters *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America

Lidiane Maria da Silva-Carvalho<sup>1</sup> · Jhon Lennon Genovez-Oliveira<sup>2</sup> · Mariana de Souza Oliveira<sup>2</sup> ·  
Mariana Borges Rodrigues<sup>1</sup> · Saulo Tavares Abreu<sup>3</sup> · Carlos Nei Ortúzar-Ferreira<sup>4</sup> · Heider Alves Franco<sup>5</sup> ·  
Sergio Thode-Filho<sup>6,7</sup> · Águida Aparecida de Oliveira<sup>8</sup> · Viviane Moreira de Lima<sup>8</sup> · Ildemar Ferreira<sup>8</sup> ·  
Bruno Pereira Berto<sup>8</sup>

Received: 24 October 2018 / Accepted: 6 May 2019  
© Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2019

### Abstract

**Background** The gnateaters *Conopophaga* spp. are insectivorous passerines commonly observed in high and humid forests, where they remain lodged in thin branches and, sometimes, they fly to the ground to catch insects. The insectivorous feeding habit is related to low prevalence and density of coccidians in passerines; however, several coccidian species are recorded for families of insectivorous passerines.

**Purpose** This study aimed to examine the feces from gnateaters *Conopophaga* spp. captured in the municipality of Barra Mansa and in the Itatiaia National Park, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil, to determine what coccidian parasites were present.

**Methods** Nine gnateaters were captured with mist nets. Coccidian oocysts were recovered from the fecal samples by flotation in Sheather's saturated solution. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made in optical microscopy and digitally edited. The molecular analysis included the study of the sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene, with phylogenetic reconstructions based on the neighbor-joining and maximum likelihood analysis.

**Results** Four *Conopophaga* spp. were positive for oocysts. An *Isospora* sp. considered as new to science is described and identified from *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818) and *Conopophaga lineata* (Wied, 1831). *Isospora borbai* n. sp. has oocysts that are subspheroidal, 17–22 × 15–22 (20.2 × 19.1) μm, with rough, bilayered wall, c. 1.7 μm thick. Micropyle present, but without micropyle cap. Oocyst residuum absent, but one or two polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal, 12–15 × 8–11 (14.1 × 9.1) μm. The Stieda body is knob-like to half-moon-shaped and sub-Stieda body is rounded. Sporocyst residuum is present, composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites are vermiform with refractile body and nucleus. Molecular analysis at the *cox1* gene exhibited similarity greater than 99% with *Isospora* spp. isolates from other Neotropical passerine birds.

**Conclusion** Based on the morphological and molecular features, *I. borbai* is considered as new to science and the first coccidian species recorded from Conopophagidae.

**Keywords** Morphology · Molecular biology · Taxonomy · Phylogeny · Coccidia · Oocysts · Neotropical birds ·  
Thamnophilida · Médio Paraíba Region · Parque Nacional do Itatiaia

✉ Bruno Pereira Berto  
berto.ufrj@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 11 June 2019

### Introduction

The parvorder Thamnophilida (Passeriformes: Tyranni) is divided into three families: Thamnophilidae, Melanopareiidae and Conopophagidae. The family Conopophagidae brings together two genera: *Conopophaga* Vieillot, 1816 and *Pittasoma* Cassin, 1860. In Brazil, seven *Conopophaga* spp.

are reported; however, the two *Pittasoma* spp. are restricted to Colombia, Costa Rica, Panama and Ecuador [4, 12].

The gnateaters *Conopophaga* spp. are small, with a long tarsus, short tail and rounded wing. Most species have an elongated, usually white, post-ocular stripe. They are terrestrial insectivores commonly observed in high and humid forests, where they remain lodged in thin branches and, sometimes, they fly to the ground to catch insects [13].

The insectivorous feeding habit was previously related to the low prevalence and density of *Isospora* spp. in passerines [7]; however, several species of coccidia are recorded for families of insectivorous passerines [1]. In this context, the aim of this study was to examine the feces from gnateaters *Conopophaga* spp. captured in different localities in the Médio Paraíba region of the State of Rio de Janeiro, South-eastern Brazil, to determine what coccidian parasites were present.

## Materials and Methods

### Sample Collection

A total of five expeditions were conducted in two different localities in the Médio Paraíba Region in the State of the Rio de Janeiro, Southeastern Brazil: (1) Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira [9]; and (2) an Atlantic forest fragment area at the Municipality of Barra Mansa. A total of five black-cheeked gnateater *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818) (all from Itatiaia National Park) and four rufous gnateater *Conopophaga lineata* (Wied, 1831) (two from Itatiaia National Park and two from Barra Mansa) were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes and feces collected immediately after defecation. After identification of the species, the birds were photographed and released and stool samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) solution at 1:6 (v/v).

### Morphological Analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25 °C) for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber [8] and Berto et al. [2]. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and

measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

### Molecular Analyses

An individual oocyst identified with the characteristic features of the new species under light microscopy was isolated and resuspended in PBS [5]. DNA was extracted from the oocyst using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. To fully lyse the oocyst, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. [5] and Yang et al. [19]. The external primers COIBF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIBR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of c.302 bp in size. The internal primers COIBF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIBR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR contained 10 µl of 5×Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of 10 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analysed and edited using the program Chromas 2.6.

### DNA Sequence Analyses

The newly generated sequences were compared to those for *Isospora* spp. and other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for

*Isoospora* spp. at the *cox1* sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 [18]. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

## Results

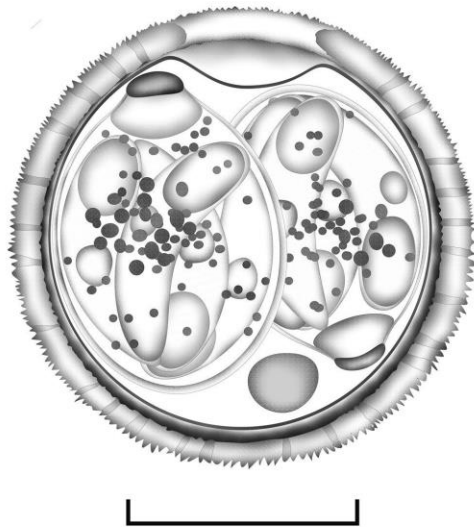
Nine *Conopophaga* spp. were examined and four were positive for coccidia (two *C. melanops* and one *C. lineata* from Itatiaia National Park; and one *C. lineata* from Barra Mansa). All observed oocysts were characteristic of *Isoospora*. This material is described below.

Family Eimeriidae Minchin, 1903.

Genus *Isoospora* Schneider, 1881.

***Isoospora borbai* Silva-Carvalho et Berto n. sp.** (Figures 1, 2).

Oocysts ( $n = 32$ ) subspheroidal,  $17\text{--}22 \times 15\text{--}22$  ( $20.2 \times 19.1$ ); length/width ( $L/W$ ) ratio 1.0–1.1 (1.06). Wall bi-layered, 1.5–2.1 (1.7) thick, outer layer rough,  $c.2/3$  of total thickness. Micropyle present, without micropyle cap or wrinkles; however, generally with slight invagination of the inner layer. Oocyst residuum absent, but one or two



**Fig. 1** Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isoospora borbai* n. sp. from *Conopophaga* spp. Scale-bar: 10  $\mu$ m



**Fig. 2** Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isoospora borbai* n. sp. from *Conopophaga* spp. Inner (il) and outer (ol) layers of the oocyst wall, *m* micropyle, *pg* polar granule, *sb* Stieda, *ssb* sub-Stieda bodies, *sr* sporocyst residuum, *sz* sporozoite, *rb* refractile body. All to same scale. Scale-bar: 10  $\mu$ m

Table 1 Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from the parvorder Thamnophilida

Coccidia	Hosts		References	Oocysts			Sporocysts							
	Species	Family		Shape	Measurements (µm)	Shape index	Wall	Polar granule	Shape	Measurements (µm)	Shape index	Stieda body	Substieda body	Residium
<i>Isoospora sagittatae</i> [11]	<i>Hylophylax naevoides</i> (Lafresnaye, Cap-1847)	Thamnophilidae	McQuisition and Caparella [11]	Ovoidal to ellipsoidal	25-30 × 21-24 (27.5 × 21.8)	1.27	Bilayered, smooth	Present, 1-3	Subspheroidal to ovoidal	13-16 × 12-13 (14.8 × 12.4)	1.19	Present, thin and dense	Present, triangular	Diffuse
				Ovoidal to ellipsoidal	27-31 × 20-24 (28.4 × 22.4)	1.27	Bilayered, smooth	Present, 1-3	Subspheroidal to ovoidal	13-17 × 12-14 (15.0 × 12.6)	1.2	Thin and flattened, rounded, 0.5 × 2.0	Triangular to rounded, 2.5 × 5.0	Diffuse
<i>Isoospora parnaitaiensis</i> Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, [14]	<i>Pyrgilena leucoparvula</i> (Viellot, 1818)	Thamnophilidae	Silva-Carvalho et al. [16]	Ovoidal to ellipsoidal	29-33 × 22-26 (30.8 × 24.4)	1.27	Bilayered, smooth	Present, 1-3	Subspheroidal to ovoidal	14-17 × 12-15 (15.9 × 13.4)	1.19	Thin and flattened, rounded, 0.5 × 2.0	Triangular to rounded, 2.5 × 5.0	Diffuse
				Ellipsoidal	22-27 × 18-21 (23.8 × 19.4)	1.23	Bilayered, smooth	Present, 1-2	Ellipsoidal	13-16 × 8-10 (14.6 × 9.3)	1.6	Nipplelike to knob-like, 1.0 × 2.0	Rounded to rectangular, 1.5 × 2.0	Compact

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts		References	Oocysts			Sporocysts							
	Species	Family		Shape	Measurements ( $\mu\text{m}$ )	Shape index	Wall	Polar granule	Shape	Measurements ( $\mu\text{m}$ )	Shape index	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Isospora borbai</i> Silva-Carvalho and Berto n. sp.	<i>Conopophaga melanops</i> (Viellot, 1818); <i>Conopophaga lineata</i> (Wied, 1831)	Conopophagidae	Current work	Subspheroidal	17–22 × 15–22 (20.2 × 19.1)	1.06	Bilayered, rough	Present, 1–2	Ellipsoidal	12–15 × 8–11 (14.1 × 9.1)	1.56	Knob-like to half-moon-shaped, 1.0 × 2.5	Rounded, 2.0 × 3.5	Diffuse

(frequently one subspheroidal) polar granules are present. Sporocysts ( $n=25$ ) ellipsoidal, 12–15 × 8–11 (14.1 × 9.1);  $L/W$  ratio 1.4–1.7 (1.56). Stieda body present, knob-like to half-moon-shaped, 1.0 × 2.5; sub-Stieda present, rounded, 2.0 × 3.5; para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites vermiform, with posterior refractile body and centrally located nucleus.

*Type-host* *Conopophaga lineata* (Wied, 1831) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae), rufous gnatcatcher.

*Other host* *Conopophaga melanops* (Viellot, 1818) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae), black-cheeked gnatcatcher.

*Type locality* Parque Nacional do Itatiaia (22°27'S, 44°35'W), southeastern Brazil.

*Other locality* Barra Mansa (22°29'S, 44°09'W), southeastern Brazil.

*Type specimens* Photosyntypes, line drawing, and oocysts in 70% ethanol are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under the accession number MZURPTZ2018008. Phototypes and line drawings are also deposited and available (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-91/2018. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

*Site in host* Unknown.

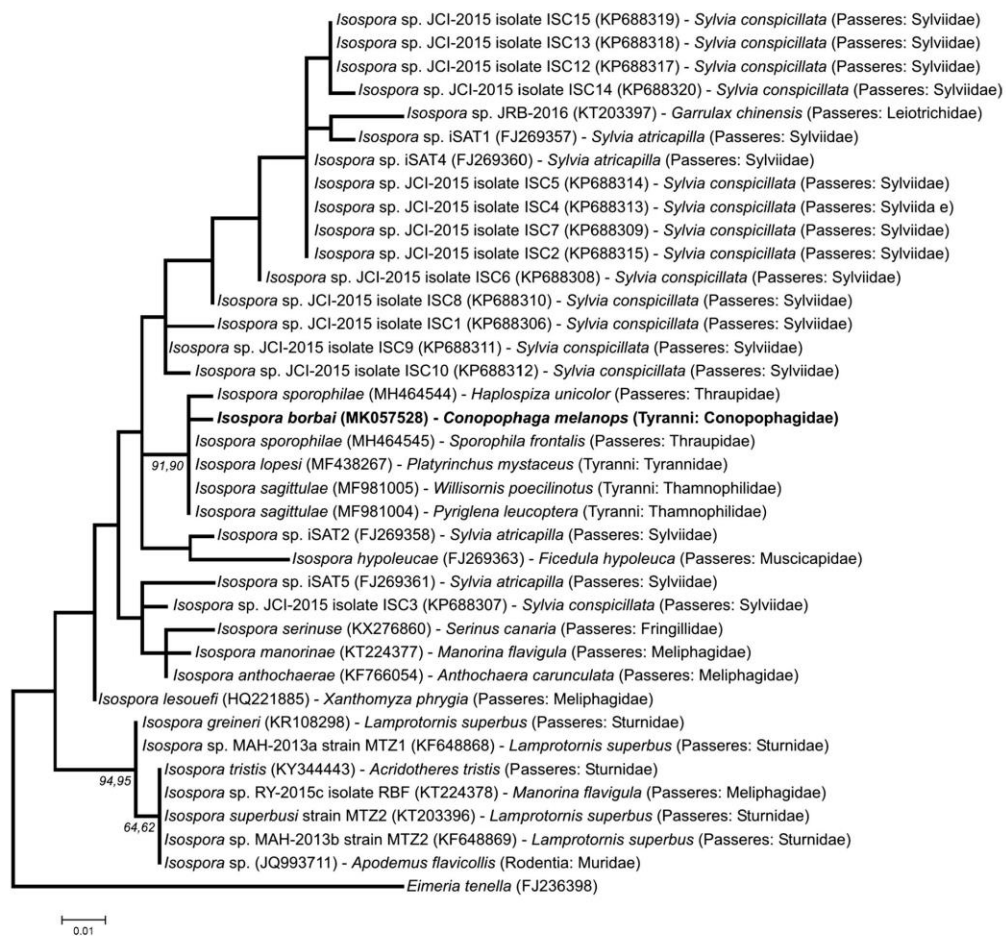
*Prevalence* 44% (four out of nine birds infected).

*Representative DNA sequence* One representative *cox1* sequence was deposited in the GenBank database under the accession number MK057528.

*ZooBank registration* To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature [10], details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *Isospora borbai* is urn:lsid:zoobank.org:act:D3BE104D-300F-4251-981C-393CD86800F7.

*Etymology* The specific name is derived from the family name of the Brazilian parasitologist Dr Hécio Resende Borba, given in his honor for his contribution to the study of antiparasitic activity of plants.

*Remarks* To date, only two *Isospora* spp. are recorded from hosts of the parvorder Thamnophilida (Table 1). *Isospora sagittulae* McQuiston, Capparella, [11] and *Isospora paraitatiaensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015 were recorded from antbirds of the family Thamnophilidae; therefore, no *Isospora* sp. is recorded from the families Conopophagidae and Melanopareiidae until now. As shown in Table 1, *I. borbai* is easily differentiated from these two *Isospora* spp. from Thamnophilidae, due to



**Fig. 3** Maximum likelihood tree estimated from the *cox1* sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

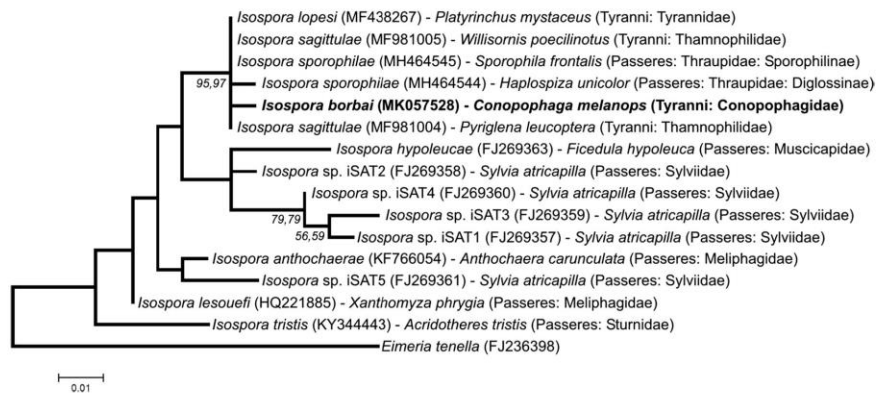
hood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

their smaller size, subspheroidal shape, micropyle and rough outer layer of the oocyst wall.

**Phylogenetic analysis** DNA amplification of an individual oocyst of *I. borbai* n. sp. recovered from a *C. melanops* from Itatiaia National Park showed a clear band of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 36 sequences for avian *Isospora* spp. available on GenBank (Fig. 4). *Eimeria tenella* (Railliet, Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isospora borbai* sat in a clade with the highest similarity of 99.0–99.5% with *Isospora lopesi* Silva-Carvalho et Berto, 2018 [15], *Isospora sagittulae* McQuiston et Capparella, 1992 [16] and *Isospora*

*sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro et Lopes, 2005 [17] (Fig. 3). In a second analysis, a subset of 215 bp long *cox1* gene sequences for 14 *Isospora* spp. was used (Fig. 4). In this analysis, *I. borbai* was again grouped with *I. lopesi*, *I. sagittulae* and *I. sporophila*, next to the other clade with *Isospora hypoleucae* Dolnik, Rönn et Bensch, [6] (Dolnik et al. [5]) and *Isospora* isolates from Eurasian blackcaps *Sylvia atricapilla* (Linnaeus, 1758) (Dolnik et al. [5]) with similarities of 95.7% and 94.8–97.1%, respectively.





**Fig. 4** Maximum likelihood tree estimated from the 215 bp long *cox1* sequence dataset for *Isospora* spp. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for Neigh-

bor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

## Discussion

*Isospora borbai* is the first coccidian species to be described from the family Conopophagidae. Duszynski and Wilber [8] advise that new coccidian species should be compared morphologically with all species recorded in the family of the host; therefore, due to the lack of descriptions of coccidians from conopophagids, *I. borbai* was compared with the coccidians from the parvorder Thamnophilida. In this sense, *I. borbai* was compared to *I. sagittulae* and *I. parnaitatiensis*, which are the only coccidian species recorded from the parvorder Thamnophilida, specifically from the family Thamnophilidae (Table 1). In any case, the oocysts of *I. borbai* are quite distinctive because they have a rough wall with a micropyle, which are unusual characteristic features in *Isospora* spp.

The phylogenetic analysis (Figs. 3, 4) brings together *I. borbai* with *I. sagittulae*, which are also parasites from the parvorder Thamnophilida, and *I. lopesi*, parasite of eastern white-throated spadebills *Platyrinchus mystaceus* Vieillot, 1818 that also belong to the suboscines (suborder Tyranni). In contrast, this standard approach related to taxonomic groups of hosts is incompatible with the presence of the genotypes of *I. sporophila* in this monophyletic group; since this coccidian is a parasite of buffy-fronted seedeaters *Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869) and uniform finches *Haplospiza unicolor* Cabanis, 1851, which are passerines of the family Thraupidae and suborder Passeri. Thus, this phylogenetic analysis maintains the assumption raised in Rodrigues et al. [17] that this monophyletic group is related with coccidia of neotropical birds, and not necessarily related to taxonomic groups of hosts.

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. borbai* is considered as new to science and the first coccidian species recorded from a gnateater (Conopophagidae).

**Acknowledgements** We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento, and the landowner at Santa Rita de Cássia in the Municipality of Barra Mansa, RJ, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions. This study was supported by Grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 42798; 45200; 49605; 54951) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

## References

- Berto BP, Lopes CWG (2013) Distribution and dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: Ruiz L, Iglesias L (eds) Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease. Nova Science Publishers, New York, pp 47–66
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 23:1–1. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Berto BP, Lopes BD, Melinski RD, Souza A, Ribas C, Abreu F, Ferreira I, Lopes CWG (2014) Coccidian dispersion across *trans-* and *cis-*Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts. Can J Zool 92:383–388. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0277>

4. BirdLife International (2016) The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 23 Sep 2018
5. Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
6. Dolnik OV, Bensch S (2009) *Isospora hypoleuca* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian parasite found in the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Parasitology* 136(8):841–845. <https://doi.org/10.1017/s0031182009006131>
7. Dolnik OV, Dolnik VR, Bairlein F (2010) The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98:97–104. <https://doi.org/10.5253/078.098.0112>
8. Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
9. ICMBIO (2018) Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 23 Sep 2018
10. ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys* 219:1–10. <https://doi.org/10.3897/zookeys.219.3994>
11. McQuiston TE, Capparella A (1992) *Isospora sagittulae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the spotted antbird (*Hylophylax naevioides*). *Trans Am Microscop Soc* 111:365–368. <https://doi.org/10.2307/3226711>
12. Piacentini VQ, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, Bravo GA, Brito GRR, Naka LN, Olmos F, Posso S, Silveira LF, Betini GS, Carrano E, Franz I, Lees AC, Lima LM, Pioli D, Schunck F, Amaral FR, Bencke GA, Cohn-Haft M, Figueiredo LFA, Straube FC, Cestari E (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia* 23:90–298
13. Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 p
14. Silva LM, Rodrigues MB, do Lopes BB, Berto BP, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG (2016) A new coccidian, *Isospora parnaitatiaensis* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitol Res* 115:745–749. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4798-z>
15. Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Siqueira PB, Rodrigues MB, Lima VM, Berto BP (2018) *Isospora lopesi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Syst Parasitol* 95:455–463. <https://doi.org/10.1007/s11230-018-9795-z>
16. Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Rodrigues MB, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Oliveira JLG, Soares SS, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2018) *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella (1992) (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitol Res* 117:2635–2641. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5955-y>
17. Rodrigues MB, Oliveira JLG, Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2019) The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro & Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil. *Syst Parasitol* 96:423–431. <https://doi.org/10.1007/s11230-019-09859-7>
18. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
19. Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Lidiane Maria da Silva-Carvalho<sup>1</sup> · Jhon Lennon Genovez-Oliveira<sup>2</sup> · Mariana de Souza Oliveira<sup>2</sup> · Mariana Borges Rodrigues<sup>1</sup> · Saulo Tavares Abreu<sup>3</sup> · Carlos Nei Ortúzar-Ferreira<sup>4</sup> · Heider Alves Franco<sup>5</sup> · Sergio Thode-Filho<sup>6,7</sup> · Águida Aparecida de Oliveira<sup>8</sup> · Viviane Moreira de Lima<sup>8</sup> · Ildemar Ferreira<sup>8</sup> · Bruno Pereira Berto<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup> Curso de Graduação em Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup> Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Pinheiral, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>6</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>7</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>8</sup> Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23890-000, Brazil

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil**

Lidiane Maria da Silva-Carvalho • Jhon Lennon Genovez-Oliveira • Mariana de Souza Oliveira • Águida Aparecida de Oliveira • Viviane Moreira de Lima • Ildemar Ferreira • Bruno Pereira Berto

Received: / Accepted:

L. M. da Silva-Carvalho

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

J. L. Genovez-Oliveira • M. de S. Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

Á. A. de Oliveira • V. M. Lima • I. Ferreira • B. P. Berto (✉)

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil  
e-mail: [berto.ufrj@gmail.com](mailto:berto.ufrj@gmail.com)

**Abstract** *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 was identified from a new host, the plain antvireo *Dysithamnus mentalis* (Temminck), and also from the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* Vieillot, in its type-locality, the Itatiaia National Park in the southeastern Brazil, providing a preliminary genotypic characterization by sequencing the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene. The oöcysts recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis* were polymorphic and have genotypic differences that were not considered sufficient for the description of new species, but only different genotypes and morphotypes of *I. parnaitatiaiensis* related to each host. These morphological and molecular variations were associated with a process of speciation active and in adaptive development to their respective host species.

## Introduction

Thamnophilidae Swainson is composed of small birds frequently observed capturing ants and other arthropods in dense vegetation. Due to this insectivorous behavior, they are recognized as ‘antbirds’. In South America, two major areas of distribution for this family are the Atlantic Forest and Amazon biomes (Wiens, 1989; Zimmer & Isler, 2003).

Passerines can be parasitized by several parasites, both surface, blood or intestinal, being the coccidians of *Isoospora* spp. the most frequently reported. However, until recently the only species of *Isoospora* Schneider, 1881 described from thamnophilid birds was *Isoospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992, which parasitized spotted antbirds *Hylophylax naevioides* Lafresnaye in Ecuador. This species was later reported from white-throated antbirds *Oneillornis salvini* (Berlepsch) and common scale-backed antbirds *Willisornis poecilinotus* Cabanis in the Brazilian Amazon, and, more recently, from white-shouldered fire-eyes *Pyriglena leucoptera* Vieillot in the Atlantic Forest, revealing that this species has a wide distribution in the Neotropical region (McQuiston & Capparella, 1992; Berto et al., 2014a; Silva-Carvalho et al., 2018).

The species *Isoospora parnaitataiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira, Lopes, 2015 became the second species of *Isoospora* to be recorded from Thamnophilidae when it was described parasitizing white-shouldered fire-eyes *P. leucoptera* in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in southeastern Brazil, and, in the current work, this same coccidian species is identified from plain antvireos *Dysithamnus mentalis* (Temminck) and also *P. leucoptera* in its type-locality, the Itatiaia National Park, providing a preliminary genotypic characterization by sequencing the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene.

## Materials and methods

### *Sample collection*

A total of 19 expeditions were conducted in the Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO, 2016), in August (22°26'19"S, 44°37'23"O), November (22°26'57"S, 44°36'25"W) and December (22°27'20"S, 44°36'28"W)

2014; March (22°27'38"S, 44°35'34"W), April (22°27'52"S, 44°36'26"W), May (22°26'17"S, 44°37'33"W), July (22°27'4"S, 44°36'51"W), and November (44°36'10"S, 22°27'48"W) 2015; March (22°19'46"S, 44°32'11"W), June (22°26'57"S, 44°36'25"O), July (22°26'15"S, 44°18'33"O), and October (22°27'38"S, 44°35'34"W) 2016; April (22°26'15"S, 44°18'33"W), May (22°27'20"S, 44°36'28"W), June (22°27'4"S, 44°36'51"W), July (22°26'15"S, 44°18'33"W), and November (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2017; May (22°27'40"S, 44°35'32"W), and August (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2018. A total of 41 *P. leucoptera* and 37 *D. mentalis* were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes and faeces collected immediately after defecation. After identification of the species, the bird was photographed and released, and stool samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) solution at 1:6 (v/v).

#### *Morphological analyses*

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 days or until ~70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014b). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eurekam 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e. Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

#### *Morphometric analyses*

Two parametric statistical methods were employed in the morphometric data of the oöcysts after previous evaluation of the data by D'Agostino's test of normality. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare measurements of the length, width and length/width (L/W) ratio of the oöcysts and sporocysts recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis*. The statistical package Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007) was used to calculate the mean, variance, degrees of freedom and P-value (Sampaio, 2002; Berto et al., 2014b). Linear regression was used to determine the distribution of oöcysts recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis* using

1 methods proposed by Norton & Joyner (1981) and subsequently modified by Berto et al.  
2 (2014b). The graphs and coefficient of regression line were obtained using the software  
3 Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, Washington).  
4  
5

#### 6 *Molecular analyses*

7 The oöcysts identified with the same characteristic features under light microscopy, were  
8 isolated, resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear  
9 (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the purified oöcysts using the Qiagen DNeasy  
10 Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions.  
11 In order to fully lyse the oöcysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA  
12 extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as  
13 previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers  
14 COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT  
15 AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers  
16 COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG  
17 TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µL  
18 of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) (1x), 0.25 µL of each primer (0.2  
19 µM), 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3µl primary PCR product (for the secondary  
20 reaction) and 9 µL of Nuclease Free Water. Both primary and secondary PCR were conducted  
21 using the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for  
22 30 s, 47°C for 45 s, and 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons  
23 from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification  
24 (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and  
25 reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied  
26 Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the  
27 sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

#### 48 *DNA sequence analyses*

49 Sequences were compared to each other and with other coccidian parasites available on the  
50 GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees  
51 were constructed for *Isoospora* spp. at the COI sequences for additional isolates from GenBank.  
52 Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura et al.,  
53 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ) and Maximum  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Likelihood (ML) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

## Results

Fifteen *P. leucoptera* and nine *D. mentalis* were positive for coccidia. All observed oöcysts were characteristic of *Isoospora*. This material is described below.

### Family Eimeriidae Minchin, 1903

#### Genus *Isoospora* Schneider, 1881

#### *Isoospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015

*Hosts*: *Pyriglena leucoptera* Vieillot (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae), white-shouldered fire-eye; *Dysithamnus mentalis* (Temminck) (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae), plain antvireo.

*Locality*: Parque Nacional do Itatiaia (22°27'S, 44°35'W) in southeastern Brazil.

*Specimens*: Photomicrographs and oöcysts recovered from *D. mentalis* in 2.5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> solution (Williams et al., 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2019020. Photomicrographs and line drawing are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 103/2019. Photographs of the host specimens are deposited in the same collection.

*Site in host*: Unknown.

*Prevalence*: 31% (24/78) in total; 37% (15/41) for *P. leucoptera*; and 24% (9/37) for *D. mentalis*.

*Representative DNA sequence*: Representative COI sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers MT233550 (from *D. mentalis*) and MT233551 (from *P. leucoptera*).

## Description (Figs. 1, 2)

*Sporulated oöcyst*

Oöcysts (n = 161) subspheroidal to ellipsoidal, 20–31 × 17–25 (25.3 × 21.1); L/W ratio 1.0–1.5 (1.21). Wall bi-layered, 1.0–1.8 (1.5) thick, outer layer smooth, *c.* 2/3 of total thickness.

Micropyle and oöcyst residuum both absent, but 1–3 polar granules are present.

*Sporocyst and sporozoites*

Sporocysts (n = 161) 2, ellipsoidal, 13–20 × 8–11 (16.0 × 9.8); L/W ratio 1.5–1.9 (1.63). Stieda body present, nipple- or knob-like, 1.0–1.4 × 1.9–2.5 (1.1 × 2.1); sub-Stieda body present, rounded to irregular rectangle, 1.2–1.1 × 2.2–13.2 (1.8 × 2.7); para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, usually as a distinctly ovoidal to ellipsoidal body consisting of numerous small granules that appear to be membrane-bounded. Sporozoites 4, vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and nucleus.

## Remarks

The morphometry of *Isospora* spp. recorded in Thamnophilidae and of *I. parnaitataiensis* recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis* in the current study are shown in the Tables 10 and 11. In Fig. 1, it is observed that the oöcysts from *P. leucoptera* and *D. mentalis* have the same morphological characteristic features, which coincide with the original description of *I. parnaitataiensis* (Table 1). In addition to this, the only species described in Thamnophilidae is *I. sagittulae*, which was originally described in *H. naevioides* in Ecuador and later reported from *O. salvini*, *W. poecilnotus* and *P. leucoptera* (McQuiston & Capparella 1992; Berto et al. 2014a; Silva-Carvalho et al., 2018). *Isospora sagittulae* (Table 1) differs from *I. parnaitataiensis* in having larger oöcysts with sporocysts subspherical to ovoidal and Stieda body flattened. Therefore, *I. sagittulae* is easily distinguished from *I. parnaitataiensis*. The morphometric study (Table 2) shows that the oöcysts of *D. mentalis* were statistically larger and more subspherical than oöcysts of the original and current study from *P. leucoptera*. In contrast, the sporocysts were equivalent in all morphometric aspects (Table 2). Linear regression (Fig. 2) graphically shows the results of the morphometric study, in addition to showing the polymorphism of *I. parnaitataiensis* from the two hosts, as highlighted by low values of R<sup>2</sup>.



### Phylogenetic analysis

1  
2 DNA amplification of the oöcysts of *I. parnaitataiensis* showed a clear band of *c.*250 bp. DNA  
3  
4 sequences of the oöcysts recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis* had similarity of 97.1%  
5  
6 or the substitution of 5 nucleotides. Phylogenetic analysis included 24 sequences for avian  
7  
8 *Isoospora* spp. available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908)  
9  
10 was used as the outgroup. *Isoospora parnaitataiensis* from *P. leucoptera* and *D. mentalis* was  
11  
12 recovered in a clade with the highest similarity of 98.5% with *Isoospora serinuse* Yang, Brice,  
13  
14 Elliot & Ryan, 2015 from the island canary *Serinus canaria* (Linnaeus).  
15  
16  
17

### Discussion

18  
19  
20  
21  
22 Morphological results reveal that the oöcysts of *I. parnaitataiensis* are polymorphic in the  
23  
24 characteristics of the sporocyst, Stieda and sub-Stieda bodies. In none of these cases was  
25  
26 possible to observe a morphotype related a sample and/or host, since these different types were  
27  
28 observed in the same sample and, sometimes, in the same oöcyst (Fig. 1). This polymorphism  
29  
30 exposes the importance and complexity of identifying coccidian species.

31  
32 ANOVA (Table 2) shows significant differences in the morphometric aspects associated  
33  
34 with oöcysts. Observing the means and ranges of the oöcyst lengths and L/W ratios, it can be  
35  
36 concluded that the oöcysts obtained from *P. leucoptera* were smaller and more ellipsoidal than  
37  
38 those of the new host *D. mentalis* (Berto et al. 2014b). In this sense, it would be suggested the  
39  
40 possibility of two distinct species of *Isoospora*, each parasitizing a specific host; however, in the  
41  
42 morphometric comparisons of sporocysts, equivalences were observed in all morphometric  
43  
44 aspects.

45  
46 These significant differences between morphometric aspects of oöcysts have been  
47  
48 reported and related to environmental factors since the 1980s (Fayer, 1980), in addition to  
49  
50 numerous later works, including: (1) *Isoospora lacazei* from house sparrows *Passer domesticus*  
51  
52 (Linnaeus), in the province of Cordoba, Spain (Gomez et al., 1982); (2) *Eimeria opimi* Lambert,  
53  
54 Gardner, Duszynski, 1988, from rodent species of the genus *Ctenomys* Blainville, in Bolivia  
55  
56 (Gardner & Duszynski, 1990); (3) *Tyzzeria parvula* (Kotlan, 1933) Klimes, 1963 from greylag  
57  
58 geese *Anser anser* Linnaeus (Berto et al. 2008); (4) *Isoospora sabiai* Pinho, Rodrigues, Silva,  
59  
60 Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes & Berto, 2017 and *Isoospora massardi*  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 from thrushes *Turdus* spp. of southeastern  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
Brazil (Pinho et al., 2017; Genovez-Oliveira et al., 2020). Several factors can have influenced in  
the observed polymorphism: (1) stress, (2) nutrition, (3) host immunity, (4) infective dose  
(Fayer, 1980; Joyner, 1982), (5) oöcyst discharge time during the patent period (Duszynski,  
1971; Catchpole et al., 1975; Joyner, 1982), and (6) phenotypic plasticity, when a coccidia  
activates different phenotypes in response to its environment (Parker & Duszynski, 1986;  
Gardner & Duszynski, 1990).

In this sense, it can be assumed that the variations in the environmental conditions in the  
Itatiaia National Park, such as: temperature, humidity, altitude, seedling and reproduction period,  
rainfall and the environmental impacts of deforestation around the Itatiaia National Park, may  
have influenced in the morphological aspects of the oöcysts from different hosts or from the  
same hosts submitted to these different environmental conditions.

It is also worth mentioning that *I. parnaitatiaiensis* in *P. leucoptera* and *D. mentalis*, may  
be in process of speciation adapting to these respective hosts, where there would be an initial  
tendency for oöcysts in *D. mentalis* to be more subspherical (Berto and Lopes, 2020). Although  
these hosts do not have exactly the same biotopes, they inhabit the same environment; therefore,  
interspecific transmissions, that is, transmissions of oöcysts between these different hosts should  
be frequent. This assumption of polymorphism by adaptation to different hosts was introduced  
by Gardner and Duszynki (1990) for the *E. opimi* oöcysts. In their work, six *Ctenomys* spp. from  
different locations and habitats in Bolivia were analyzed. These hosts do not share the same  
habitat but have intercession in their geographical distributions that allow interspecific  
transmissions. This observation allowed the authors identify a single coccidian species, *E. opimi*,  
despite the polymorphism observed in oöcysts. Due to the wide geographical distribution, the  
great taxonomic diversity and the chromosomal variation within Ctenomyidae, it has been  
concluded that the speciation of *E. opimi* is active and in intense development. In other words,  
according to Gardner and Duszynki (1990), *E. opimi* is a primitive species of parasite infecting  
the clade of the Ctenomyidae family, which has conserved the morphological characteristics of  
its oöcysts, but presents polymorphism due to adaptation/speciation to different *Ctenomys* spp.  
These same observations were made for the polymorphism of *I. sabiai* and *I. massardi* from  
*Turdus* spp. also in the Itatiaia National Park (Pinho et al., 2017; Genovez-Oliveira et al., 2020).  
In these studies, the oöcysts of the host species with more specific ecological niches, and  
therefore more isolated in the Itatiaia National Park, were more different morphometrically. In  
this sense, the largest morphometric differences observed in the oöcysts of the isolated hosts

were potentially justified by the infrequency of transmission to other host species, which consequently favors the process of speciation in the parasite-host coevolution (Genovez-Oliveira et al., 2020; Berto and Lopes, 2020).

The  $R^2$  values from the comparative linear regression were low, confirming the polymorphism of the oöcysts of *I. parnaitataiensis* (Figure 2, Table 2). According to the approach of Berto et al. (2014b), the superior and more sloped location of the regression line of the oöcysts obtained from *D. mentalis* indicate that its oöcysts were larger and more subspherical in relation to those from *P. leucoptera*. On the other hand, in the distribution of sporocyst measurements, it can be observed equivalence in the dimensions of the sporocysts recovered from the two hosts of *I. parnaitataiensis*, since the regression lines and datapoints remained close or overlapping (Berto et al. 2014b).

The molecular study of oöcysts resulted in a genotypic difference of 2.9% between the sequences of the COI gene from the two hosts of *I. parnaitataiensis*, or simply the substitution of 5 nucleotides. Corroborating the results of ANOVA and linear regression, this difference must be associated to the morphometric differences observed in the size and shape of the oöcysts and, consequently, associated with a process of adaptation to host species, that is, speciation. Anyway, the morphological, morphometric and genotypic differences were not considered sufficient to describe a new species of *D. mentalis*, perhaps only genotypes/morphotypes of *P. leucoptera* and *D. mentalis* (Kunz, 2002).

Phylogenetic analysis based on the sequences of the COI gene (Fig. 3) showed a monophyly of *I. parnaitataiensis* from *P. leucoptera* and *D. mentalis* with *Isoospora* spp. from canaries and thrushes, which are phylogenetically close hosts; however, *I. parnaitataiensis* was also close in this monophyly with *Eimeria* spp. of rodents in a similarity of 94-95%, which were expected to be more distant in phylogeny due to the morphological, biological and ecological differences of these coccidia and hosts. At the same time, other *Isoospora* spp. of Passeriformes were distant in phylogeny, such as: (1) *Isoospora parnaitataiensis* and *I. sagittulae*, which are recorded from the same host *P. leucoptera* and locality, the Itatiaia National Park; and (2) *Isoospora manorinae* Yang, Brice, Jian & Ryan, 2016 from *Manorina flavigula* (Gould), which in their two deposited sequences differ by 8%, or 59 nucleotides. In these two cases, coccidian species that are potentially close to each other are observed, but they are located in distinct and distant groups in the phylogenetic analysis. These results do not allow a conclusion on the phylogeny of *Isoospora* spp. de Passeriformes, perhaps due to a small number of sequenced and

deposited species and/or the non-suitability of the COI gene for phylogenetic studies in *Isospora* spp. of Passeriformes.

In conclusion, *I. parnaitaiensis* is identified morphologically and molecularly in the current work, recording a new host, *D. mentalis*, in addition to the type-host *P. leucoptera* in the Itatiaia National Park, southeastern Brazil.

**Acknowledgements** We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

**Funding** This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (grant 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant 303899/2019-0) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (grant E-26/202.797/2019).

#### **Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45200-1; 49605-1; 54951-1) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

#### **References**

Ayres, M., Ayres-Junior, M., Ayres, D. L., & Santos, A. A. S. (2007). *BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas*. Belém: Mamirauá, 364 pp.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Berto, B. P., Flausino, W., Almeida, C. R. R., & Lopes, C. W. G. (2008). Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oöcysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 conditioned in two distinct sites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, *30*, 215–219.
- Berto, B. P., Lopes, B. B., Melinski, R. D., de Souza, A. H. N., Ribas, C. C., Abreu, I. F. H. T., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2014a). Coccidial dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isospora sagittulae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from nonsympatric hosts. *Canadian Journal of Zoology*, *92*, 383–388.
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014b). Studies on coccidian oöcysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *23*, 1–15.
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology* [in press]
- Catchpole, J., Norton, C. C., & Joyner, L. P. (1975). The occurrence of *Eimeria weybridgeensis* and other species of coccidia in lambs in England and Wales. *British Veterinary Journal*, *131*, 392–401.
- Dolnik, O. V., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2009). Individual oöcysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, *95*, 169–174.
- Duszynski, D. W. (1971). Increase in size of *Eimeria separata* oöcysts during patency. *Journal of Parasitology*, *57*, 948–952.
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, *83*, 333–336.
- Fayer, R. (1980). Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, *6*, 75–103.
- Gardner, S. L., & Duszynski, D. W. (1990). Polymorphism of eimerian oöcysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *Journal of Parasitology*, *76*, 805–811.
- Genovez-Oliveira, J. L., Souza Oliveira, M., Thode-Filho, S., Cardozo, S. V., Oliveira, Á. A., Lima, V. M., Ferreira, I., & Berto, B. P. (2020). Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology International*, *75*, 102040.

- Gomez, F. M., Navarrete, I., Rodriguez, R. L. (1982). Influencia de los factores ambientales sobre diferentes poblaciones de *Isospora lacazei* Labbé, 1983 (Protozoa: Apicomplexa). *Revista Ibérica de Parasitología*, 42, p. 185–196.
- ICMBIO. (2016). *Parque Nacional do Itatiaia*. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 13 march 2020.
- Joyner, L. P. (1982). Host and Site specificity. In: Long, P. L. (Ed), *The biology of the Coccidia*. Baltimore: University Park Press. pp. 35–62.
- Kunz, W. (2002). When is a parasite species a species? *Trends in Parasitology*, 18, 121–124.
- McQuiston, T. E.; Capparella, A. (1992). *Isospora sagittulae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the spotted antbird (*Hylophylax naevioides*). *Transactions of the American Microscopical Society*, 111, 365–368.
- Norton, C. C., & Joyner, L. P. (1981). *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: Oöcysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology*, 83, 269–279.
- Parker, B. B.; Duszynski, D. W. (1986). Polymorphism of eimerian oöcysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *Journal of Parasitology*, 72, 602–604.
- Pinho, I. F., Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. D. B., Oliveira, M. S., Ferreira, M. A., et al. (2017). Characterization and distribution of *Isospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Journal of Parasitology*, 103, 285–291.
- Sampaio, I. B. M. (2002). *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP MVZ Editora, 265 pp.
- Silva-Carvalho, L. M., Pastura, D. G. N., Rodrigues, M. B., Gomes, J. V., Oliveira, M. S., Siqueira, P. B., et al. (2018). *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella (1992) (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitology Research*, 117, 2635–2641.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., & Ryan, U. (2015). *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66.

Wiens, J. A. (1989). The ecology of bird communities. Cambridge: Cambridge University Press, 539 pp.

Williams, R. B., Thebo, P., Marshall, R. N., & Marshall, J.A. (2010). Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, 76, 69–76.

Zimmer, K.; Isler, M. (2003). Family Thamnophilidae - typical antbirds. In: Del Hoyo, J.; Elliott, A.; Christie, D. A. (Eds), Handbook of the birds of the world: broadbills to tapaculos. Londres: Lynx, pp. 448–531.

### Figure Legends

**Fig. 1** Photomicrographs of sporulated oöcysts of *Isospora parnaitataiensis* recovered from white-shouldered fire-eyes *Pyriglena leucoptera* (A–D) and plain antvireos *Dysithamnus mentalis* (E–H). *Scale-bar*: 10 µm

**Fig. 2** Comparative linear regressions of oöcysts (above) and sporocysts (below) of *Isospora sporophilae* recovered from *Pyriglena leucoptera* (black) and *Dysithamnus mentalis* (grey).

**Fig. 3** Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1,000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

## Cover letter

---

**Paper entitled:** "Polymorphism and genetic diversity of *Isoospora parnaitataiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil"

**Authors:** Lidiane Maria da Silva-Carvalho, Jhon Lennon Genovez-Oliveira, Mariana de Souza Oliveira, Águida Aparecida de Oliveira, Viviane Moreira de Lima, Ildemar Ferreira and Bruno Pereira Berto

**Type of paper:** Original Research Paper

---

In this work *Isoospora parnaitataiensis*, which was originally described from the white-shouldered fire-eyes *Pyriglena leucoptera* Vieillot, was morphologically and molecularly identified from two a new hosts, the plain antvireo *Dysithamnus mentalis* (Temminck), in a preserved Atlantic Forest area corresponding to the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia). The oöcysts recovered from *P. leucoptera* and *D. mentalis* were polymorphic and have genotypic differences that were not considered sufficient for the description of new species, but only different genotypes and morphotypes of *I. parnaitataiensis* related to each host. It is original research and contributes significantly new information to the scientific literature and to our knowledge of coccidia in birds.

All authors agree to its submission and the Corresponding author has been authorized by co-authors; this article has not been published before and is not concurrently being considered for publication elsewhere; and this article does not violate any copyright or other personal proprietary right of any person or entity and it contains no abusive, defamatory, obscene or fraudulent statements, nor any other statements that are unlawful in any way.

---



**Table 1** Comparative morphology of *Isospora* spp. recorded from New World and birds (Thamnophilidae)

Species	Host	Oocyst				Sporocyst					Reference
		Shape	Size (µm)	Shape index	Polar granule	Shape	Size (µm)	Shape index	Stieda body	Sub-Stieda body	
	<i>Hylophylax naevioides</i> Lafresnaye	ovoidal to ellipsoidal	25–30 × 21–24 (27.5 × 21.8)	1.27 (1.3–1.4)	present, 1–3	subspheroidal to ovoidal	13–16 × 12–13 (14.8 × 12.4)	1.19 (1.1–1.3)	present, thin and dense	present, triangular	McQuistion & Capparella (1992)
<i>Isospora sagittulae</i> McQuistion & Capparella, 1992	<i>Oneillornis salvini</i> (Berlepsch); <i>Willisornis poecilnotus</i> Cabanis	ovoidal to ellipsoidal	27–31 × 20–24 (28.4 × 22.4)	1.27 (1.1–1.4)	present, 1–3	subspheroidal to ovoidal	13–17 × 12–14 (15.0 × 12.6)	1.2 (1.1–1.3)	thin and flattened, 0.5 × 2.0	triangular to rounded, 2.5 × 5.0	Berto et al. (2014a)
	<i>Pyriglena leucoptera</i> Vieillot	ovoidal to ellipsoidal	29–33 × 22–26 (30.8 × 24.4)	1.27 (1.2–1.5)	present, 1–3	subspheroidal to ovoidal	14–17 × 12–15 (15.9 × 13.4)	1.19 (1.1–1.3)	thin and flattened, 0.5 × 2.0	triangular to rounded, 2.5 × 5.0	Silva–Carvalho et al. (2018)
<i>Isospora parnaitatiaiensis</i> Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015	<i>P. leucoptera</i>	ellipsoidal	22–27 × 18–21 (23.8 × 19.4)	1.23 (1.1–1.5)	present, 1–2	ellipsoidal	13–16 × 8–10 (14.6 × 9.3)	1.6 (1.5–1.7)	nipple- or knob-like, 1.0 × 2.0	rounded to rectangle, 1.5 × 2.0	Silva et al. (2015)
	<i>P. leucoptera</i> ; <i>Dysithammus mentalis</i> (Temminck)	subspheroidal to ellipsoidal	20–31 × 17–25 (25.3 × 21.1)	1.21 (1.0–1.5)	present, 1–3	ellipsoidal	13–20 × 8–11 (16.0 × 9.8)	1.63 (1.5–1.9)	nipple- or knob-like, 1.1 × 2.1	rounded to irregular rectangle, 1.8 × 2.7	current study

1

**Table 2.** Morphometry of *Isospora parnaitatiaiensis* oocysts recovered from antbirds from Southeastern Brazil.

Host	n <sup>i</sup>	Oocysts			Linear Regression		Sporocysts			Linear Regressions	
		Length (µm)	Width (µm)	Shape index <sup>ii</sup>	R <sup>2iii</sup>	Equation (y =) <sup>iv</sup>	Length (µm)	Width (µm)	Shape index <sup>ii</sup>	R <sup>2</sup>	Equation (y =)
<i>Pyriglena leucoptera</i>	77	24.9	20.1	1.24	0.16	0.3121x + 12.356	15.9	9.8	1.63	0.53	0.3723x + 3.833
		(21–28) <sup>a</sup>	(17–24) <sup>a</sup>	(1.0–1.5) <sup>a</sup>			(13–20) <sup>a</sup>	(8–11) <sup>a</sup>	(1.5–1.9) <sup>a</sup>		
<i>Dysithammus mentalis</i>	84	25.8	21.9	1.18	0.44	0.5276x + 8.3547	16.1	9.9	1.63	0.27	0.249x + 5.8477
		(20–31) <sup>b</sup>	(18–25) <sup>b</sup>	(1.0–1.3) <sup>b</sup>			(14–19) <sup>a</sup>	(8–11) <sup>a</sup>	(1.5–1.9) <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> Different letters in each column denote statistically significant differences (P<0.01) by ANOVA.

<sup>i</sup> Total number of oocysts measured.

<sup>ii</sup> Length/Width ratio.

<sup>iii</sup> coefficient of determination.

<sup>iv</sup> coefficient of the regression line.

1



