

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO**

**TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES**  
**DO SUDESTE BRASILEIRO: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE**  
***Isospora* SPP. (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) NO PARQUE**  
**NACIONAL DO ITATIAIA, RJ**

**JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO  
SUDESTE BRASILEIRO: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Isospora* SPP.  
(APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ**

**JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA**

*Sob a orientação do Professor*

**Dr. Bruno Pereira Berto**

*e co-orientação da Professora*

**Dr. Viviane Moreira de Lima**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Mestre em Biologia  
Animal**, no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal.

**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)

L48t Lennon Genovez de Oliveira, Jhon , 1991-  
TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES  
SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO: IDENTIFICAÇÃO  
MOLECULAR DE Isospora SPP. (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE)  
NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA, RJ / Jhon Lennon  
Genovez de Oliveira. - Seropédica, 2020.  
64 f.: il.

Orientador: Bruno Pereira Berto.  
Coorientadora: Viviane Moreira de Lima.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós graduação em  
biologia animal, 2020.

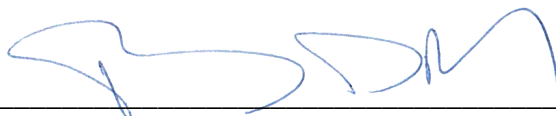
1. Parasitologia. 2. Oocistos. 3. Taxonomia. 4.  
Morfologia. 5. Biologia Molecular. I. Pereira Berto,  
Bruno, 1984-, orient. II. Moreira de Lima, Viviane ,  
1974-, coorient. III Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Programa de Pós graduação em biologia  
animal. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA**


Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/02/2020**



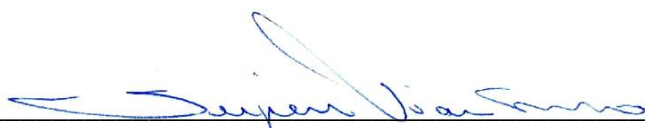
---

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



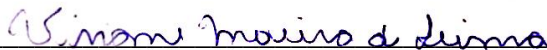
---

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



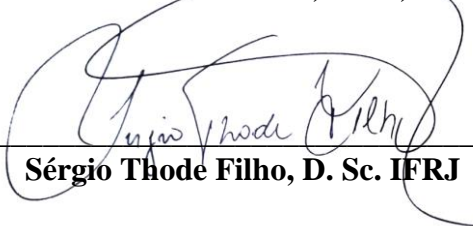
---

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



---

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



---

**Sérgio Thode Filho, D. Sc. IFRJ**

## **DEDICATÓRIA**

*A Jesus Cristo, que me trouxe aqui e me deu forças para continuar até o final.*

*A minha amada família, meus pais Luciano Maia de Oliveira, Silvana da Silva Genovez e meu irmão Patrick Genovez de Oliveira, que são a minha base e meus exemplos a serem seguidos.*

*Aos queridos professores orientadores, Bruno Pereira Berto e Viviane Moreira de Lima, pessoas enviadas por Deus que estarão pra sempre na minha história.*

*A professora Águida Aparecida de Oliveira, pelos ensinamentos e companheirismo durante esse período de laboratório.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a conclusão desse trabalho, em especial aos discentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Mariana Oliveira e Lucas de Assis Andrade e ao Professor Sérgio Thode Filho pelo companheirismo nos trabalhos de coleta. Agradeço, também, a todos do laboratório 22 pela amizade e por fazerem meus dias de trabalho mais alegres.

Agradeço ao Professor Sergian Cardozo, que lá traz, na graduação, disse que trabalhava em conjunto com um laboratório da UFRRJ, lembrei disto quando me formei e vim procurar este laboratório.

Agradeço ao professor Ildemar Ferreira, por ter me ajudado a ingressar no mestrado.

Agradeço a Caroline de Azevedo por sempre estar comigo me dando força e conselhos.

Ao coordenador de pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia Léo Nascimento por sempre disponibilizar o parque para coletas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## **BIOGRAFIA**

**JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA** filho de Luciano Maia de Oliveira e Silvana da Silva Genovez, nascido do município de Seropédica, Rio de Janeiro. Iniciou sua vida acadêmica em 2012, ao ingressar no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UNIGRARIO. Ao terminar a Licenciatura Ingressou no Mestrado em 2018 na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

*"Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito.*

*Romanos, cap. 8. v. 28,*

*Bíblia Sagrada.*



## RESUMO

GENOVEZ-OLIVEIRA, Jhon Lennon. **Taxonomia e ecologia de coccídios de aves silvestres do sudeste brasileiro: Identificação molecular de *Isospora* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.** 2019. 60p. Dissertação Biologia Animal - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

Os coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida) são protozoários parasitas frequentemente observados em amostras fecais de aves silvestres, os quais têm extrema importância para a biodiversidade, especificidade hospedeira e conservação. O presente estudo teve como objetivo identificar morfolologicamente e molecularmente coccídios de aves silvestres capturadas no Parque Nacional do Itatiaia, que é uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade no interior do Estado do Rio de Janeiro. Foram capturados e identificados 76 pássaros de 2 famílias distintas. Duas espécies de coccídios foram identificadas: *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008 do novo hospedeiro *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) (Passeriformes: Thraupidae) e *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira, Lopes, 2014 de novos hospedeiros *Turdus* spp. (Vieillot, 1818) (Passeriformes: Turdidae). Os oocistos destas espécies foram morfolologicamente semelhantes a descrição original, porém, em *I. massardi*, os oocistos exibiram diferentes padrões de tamanho associados a cada hospedeiro *Turdus* spp. A análise molecular foi conduzida no gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COI) e no gene nuclear para o RNA da subunidade menor do ribossomo (18S). *Isospora sepetibensis* é o primeiro parasita coccidiano de um traupídeo do Novo Mundo a ter uma identificação molecular do gene COI. *Isospora massardi* exibiu uma diferença genotípica de 3% nas sequências de COI entre *Turdus* spp., a qual fundamentou uma discussão ecológica que associa as diferenças morfométricas e genotípicas a um processo de co-especiação parasita-hospedeiro.

**Palavras chave:** oocistos; coccídios; taxonomia; morfologia; biologia molecular; genotipagem; filogenia; Parque Nacional do Itatiaia; Brasil

## ABSTRACT

GENOVE-OLIVEIRA, Jhon Lennon. **Taxonomy and ecology of wild bird rabbits from southeastern Brazil: Molecular identification of *Isospora* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in Itatiaia National Park, RJ.** 2019. 60p. Dissertation Animal Biology - Institute of Biological and Health Sciences. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

Coccidia (Apicomplexa: Eucoccidiorida) are parasitic protozoa frequently observed in wild bird species, which are extremely important for biodiversity, specifically housing and conservation. This study aimed to identify morphologically and molecularly wild bird coccidia captured in Itatiaia National Park, which is a highly vulnerable protected area in the interior of Rio de Janeiro State. 76 members from 2 different families were captured and identified. Two species of coccidia were identified: *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008 of the new host *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) (Passeriformes: Thraupidae) and *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvao, Ferreira, Lopes, 2014 from new hosts *Turdus* spp. (Vieillot, 1818) (Passeriformes: Turdidae). The cysts of these species were morphologically similar to the original description; however, in *I. massardi*, the cysts exhibited different size patterns associated with each hosted *Turdus* spp. Molecular analysis was performed on the cytochrome c oxidase (COI) subunit 1 gene and the nuclear ribosome minor subunit (18S) RNA gene. *Isospora sepetibensis* is the first coccidial parasite of a New World traupid to have a molecular identification of the COI gene. *Isospora Massardi* exhibited a 3% genetic difference in COI sequences between *Turdus* spp., which is an ecological discussion that associates morphometric and genotypic differences with a parasite-host co-specification process.

**Keywords:** oocysts; coccidia; taxonomy; morphology; molecular biology; genotyping; phylogeny; Itatiaia National Park; Brazil

## LISTA DE TABELAS

Págs.

<b>Tabela 1.</b> Morfologia Comparada de <i>Isospora sepetibensis</i> , registrados de diferentes Traupídeos hospedeiros e localidades no sudeste do Brasil.....	<b>33</b>
<b>Tabela 2.</b> Morfologia comparada de <i>Isospora</i> spp. registrados em Turdidae do Novo Mundo.....	<b>54</b>
<b>Tabela 3.</b> Morfometria de oocistos de <i>Isospora massardi</i> recuperados de <i>Turdus</i> spp. do sudeste do Brasil.....	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Isospora</i> sp. de acordo com Wiser (2000) .....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Desenho em linha de um oocisto esporulado (Apicomplexa: Eucoccidiorida: Eimeriidae) detalhando as principais estruturas que devem ser	

observadas, medidas e caracterizadas: (ow) diâmetro menor do oocisto; (ol) diâmetro maior do oocisto; (pg) grânulo polar; (or) resíduo do oocisto; parede do oocisto (row) áspera ou (sow) lisa; micrópila (mil) na camada interna ou (mol) externa; (mc) capuz polar; (sw) diâmetro menor do esporocisto; (sl) diâmetro maior do esporocisto; (sb) corpo de Stieda; (ssb) corpo de Substieda; (psb) corpo de Parastieda; resíduo do esporocisto (csr) compacto ou (dsr) difuso; (sp) esporozoíto; corpo refrátil do esporozoíto (prb) posterior e (arb) anterior; (n) núcleo do esporozoíto; e (str) estrias no esporozoíto. Reproduzido de Berto *et al.* (2014) ..... 18

**Figura 3.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora sepetibensis* de *Trichothraupis melanops*. Abreviações: camadas interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto; micrópilo (m); grânulo polar (pg); Organismos de Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); esporozoíto (sz); corpo refratário (rb). Tudo na mesma escala. Barra de escala: 10 µm..... 29

**Figura 4.** Árvore de probabilidade máxima estimada a partir das sequências *cox1*. Números nos nós representam suporte de autoinicialização (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para associação de vizinhos e Máxima Verossimilhança, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local..... 31

**Figura 5.** Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir do conjunto de dados da sequência *cox1* de 215 pb de comprimento para *Isospora* spp. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para associação de vizinhos e probabilidade máxima, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local..... 32

**Figura 6.** Desenho de *Isospora massardi*, uma espécie de coccídio recuperada de sabiás *Turdus* spp. Barra de escala = 10 µm..... 42

**Figura 7.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora massardi*, uma espécie de coccídio recuperada de (A-C) *Turdus albicollis*, (D-E) *Turdus flavipes* e

(F-G) *Turdus rufiventris* do sudeste do Brasil. Observe o grânulo polar (pg), o corpo de Stieda (sb), o corpo de sub-stieda (ssb), o resíduo de esporocisto (sr), o corpo refrátil (rb) e o núcleo (n). Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ..... 43

**Figura 8.** Regressões lineares comparativas de oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isospora massardi* recuperados de *Turdus albicollis* (preto), *Turdus flavipes* (cinza escuro) e *Turdus rufiventris* (cinza claro) do sudeste do Brasil..... 46

**Figura 9.** Árvore de probabilidade máxima estimada a partir das sequências COI1. Números nos nós representam suporte de autoinicialização (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para associação de vizinhos e Máxima Verossimilhança, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local..... 48

**Figura 10.** Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI2 de espécies coccidianas. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização 1000 repetições (> 50%) para Vizinhaça (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.....

49

**Figura 11.** Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene 18S de espécies coccidianas. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização 1000 repetições (> 50%) para Vizinhaça (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local..... 50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
2.1. CLASSIFICAÇÃO DOS COCCÍDIOS.....	11
2.2. HISTÓRICO.....	12
2.3. CICLO BIOLÓGICO.....	15
2.4. MORFOLOGIA.....	15
2.5. BIOLOGIA MOLECULAR.....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 ARTIGO 1.....</b>	<b>25</b>
4.1.1. RESUMO.....	25
4.1.2. INTRODUÇÃO.....	26
4.1.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1.4. RESULTADOS.....	28
4.1.5. DISCUSSÃO.....	32
4.1.6. AGRADECIMENTOS.....	35
<b>4.2. ARTIGO 2.....</b>	<b>36</b>

4.2.1. RESUMO.....	36
4.2.2. INTRODUÇÃO.....	36
4.2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.2.4. RESULTADOS.....	41
4.2.5. DISCUSSÃO.....	51
4.2.6. AGRADECIMENTOS... ..	54
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Os pássaros (Aves: Passeriformes) desempenham um papel de grande importância na natureza, como por exemplo, na polinização das plantas, dispersão de sementes, no controle de pragas, e outros, além de serem considerados reguladores tanto da fauna como da flora. 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, se alimentando de insetos que podem prejudicar a agricultura e pastagens (GRESSLER et al. 2006). Os pássaros podem ser parasitados por diversos coccídios, principalmente dos gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875 (Berto et al. 2014). 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 parasitas de passeriformes e, frequentemente, novos coccídios são descritos (BERTO et al. 2010). O estudo das interações entre esses parasitos-hospedeiros é de fundamental importância para se entender processos ecológicos, evolutivos e comportamentais, incluindo seleção sexual, migração e capacidade competitiva. Por exemplo, indivíduos parasitados podem ser mais susceptíveis a predadores e menos hábeis para estabelecer territórios. Portanto o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa e na estrutura de comunidade, dispersão e diversidade genética (FECCHIO, 2006).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CLASSIFICAÇÃO DOS COCCÍDIOS

Os coccídios são protozoários parasitas intracelulares obrigatórios do Filo Apicomplexa. De acordo com Berto *et al.* (2014a), os coccídios tem como característica fundamental o parasitismo intracelular obrigatório com ciclos biológicos alternados entre reprodução sexuada, que resulta na produção de oocistos e assexuada.

Existem inúmeros gêneros de coccídios que afetam diretamente a saúde de animais silvestres, sendo eles *Eimeria*, *Isospora*, *Caryospora*, *Cryptosporidium*, *Atoxoplasma*, *Sarcocystis* *Toxoplasma* (FRIEND, FRANSON, 1999; YABSLEY, 2008; MASSEY, 2003; GREINER, 2008).

Atualmente, no Brasil, os coccídios mais predominantes descritos em aves silvestres são aqueles dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* (KAWAZOE, 2000). Segue a classificação de acordo com Upton (2000):

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: *Isospora* Schneider, 1881

## 2.2. HISTÓRICO

Os Passeriformes compreendem mais de 50% das aves de todo o mundo, apresentando como origem o hemisfério meridional, na Gondwana, o grande continente meridional cuja metade ocidental se separou mais tarde dando origem a América do Sul, enquanto a metade oriental deu origem a África. (SICK, 1997).

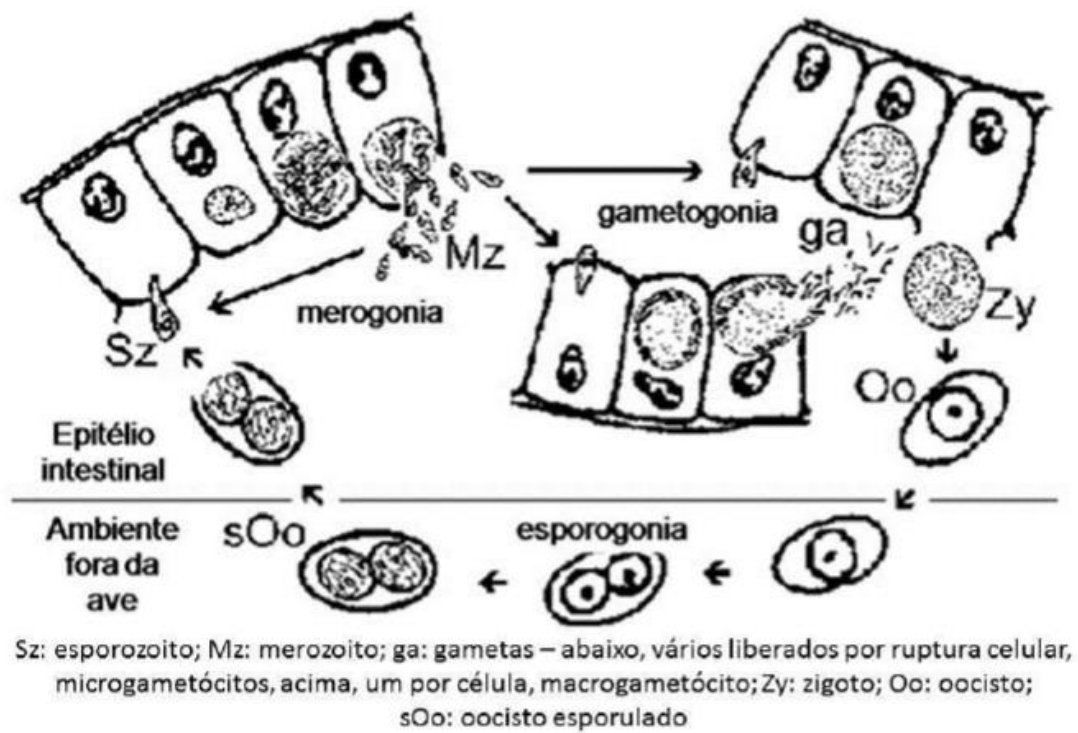
O gênero *Isospora* foi descrito pela primeira vez por Schneider em 1881. Em 1893, Labbé examinando amostras fecais de passeriformes, encontrou coccídios em pintassilgo, cotovia e tentilhão e os denominou *Diplospora lacazei*, no mesmo trabalho, identificou como *Diplospora rivoltae* coccídios encontrados em tentilhão, picanço e chapim. Ambos os parasitos apresentavam oocistos esféricos, mas com dimensões e tempo de esporulação diferentes. Surgiu o complexo “lacazei” para oocistos encontrados em fezes de pássaros (LEVINE, 1982a). Assim as espécies de *Isospora* isoladas destes animais eram classificadas segundo a estrutura do oocisto e respectivos hospedeiros, ou apenas como *I. lacazei* (BOX, 1977).

Em Passeriformes, os coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* são mais relevantes, sendo *Isospora* o mais prevalente. Estes parasitos apresentam ciclos de vida intestinais apesar de algumas espécies promoverem fases extra-intestinais (Berto et al. 2011). De acordo com Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2010a), o oocisto, esporocisto e esporozoíto possuem características morfológicas que possibilitam a identificação do parasita nos níveis de gênero e espécie. Como demonstração deste fato, Berto et al. (2010b) elaboraram uma chave de identificação das espécies do gênero *Isospora* parasitas de traupídeos na América do Sul utilizando como base apenas as características morfológicas e morfométricas dos oocistos.

### 2.3.CICLO BIOLÓGICO

Todos os vertebrados podem ser infectados por coccídios da família Eimeriidae. A transmissão se dá de forma direta, de um hospedeiro para outro, geralmente através da via fecal-oral com a ingestão, pelo hospedeiro, de oocistos esporulados no ambiente ou através da predação como ocorre em *Caryospora* (PAGE, HADDAD, 1995; FRIEND & FRANSON, 1999; LOPEZ *et al.*, 2007; YABSLEY, 2008).

Através de ingestão de formas infectantes pelo hospedeiro começa o ciclo de vida dos coccídios. Quando os esporocistos alcançam a luz intestinal, há a liberação dos esporozoítos. De acordo com a espécie do esporozoíto pode ocorrer infecção no intestino delgado e grosso, e também outra fração do sistema digestivo do hospedeiro. Ao penetrar nas células da mucosa acontecem os ciclos de reprodução assexuada, a merogonia (Figura 1). No ciclo da reprodução sexuada, a gametogonia ocorre após a evolução múltipla dos merontes (BERTO *et al.*, 2011a). Ocorre então a produção dos gamontes, que posteriormente se modificam em micro e macrogametócitos que com a evolução se tornam micro e macrogametas. Neste momento, há a formação do oocisto com a célula-ovo não infectante. Os oocistos que não são esporulados são postos com as fezes do hospedeiro no ambiente. Neste âmbito acontece a esporulação, ou esporogonia (embriogênese), e faz com que se tornem infectantes (esporozoítos) em torno de 48 horas, variando conforme temperatura e umidade. Com isso estão prontos para a infecção de um novo hospedeiro susceptível (TYZZER, 1929, citado por BERTO *et al.*, 2011a; TYZZER *et al.*, 1932, citado por BERTO *et al.*, 2011a; LEVINE 1985, BALL *et al.*, 1989; FRIEND, FRANSON, 1999; YABSLEY, 2008).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Isospora* sp. Extraído de Wiser (2000).

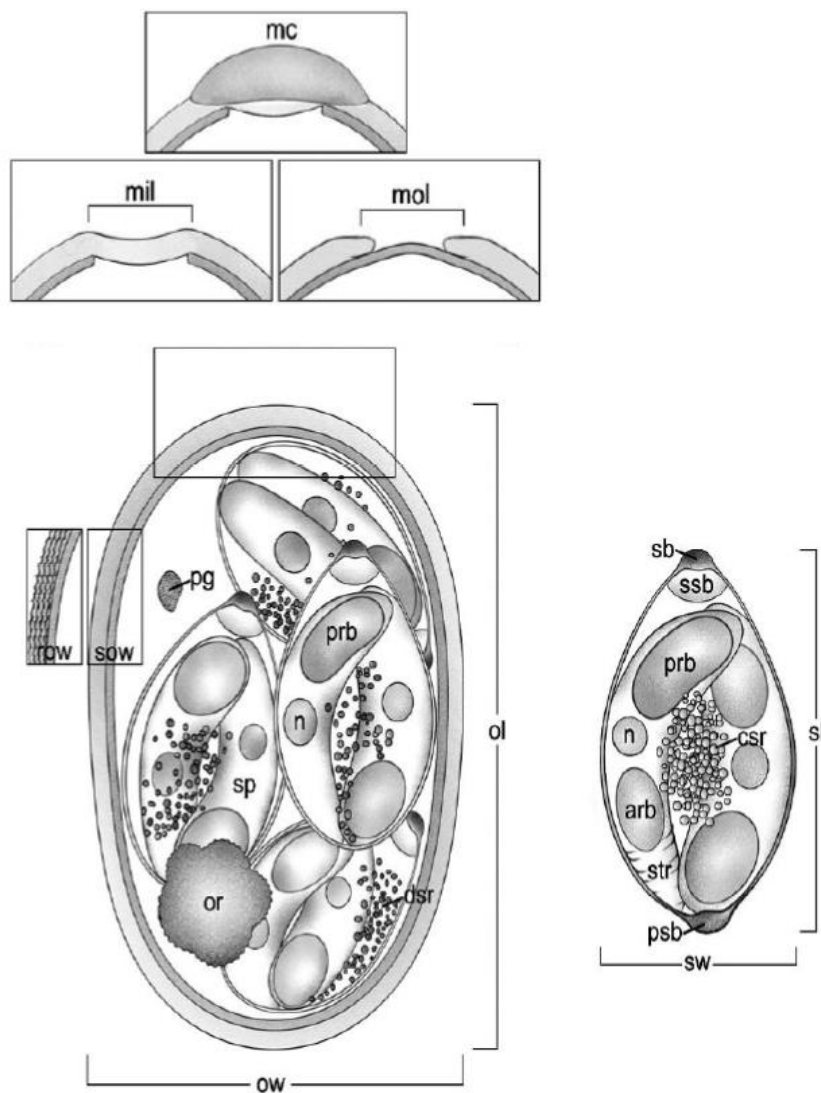
## 2.4. MORFOLOGIA

A América do Sul possui uma enorme variedade de passeriformes, totalizando um terço das aves do planeta (SICK, 1997; BERTO *et al.*, 2011a). De acordo com Duszynski e Wilber (1997) e Berto *et al.* (2010a), o oocisto, esporocisto e esporozoíto possuem características morfológicas que possibilitam a identificação do parasita nos níveis de gênero e espécie. Como demonstração deste fato, Berto *et al.* (2010b) elaborou uma chave de identificação das espécies do gênero *Isospora* parasitas de passeriformes na América do Sul utilizando como base apenas as características morfológicas e morfométricas dos oocistos. Segundo Levine (1985) um oocisto contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, são oocistos dispóricos tetrazóicos representando espécies do gênero *Isospora* em vários hospedeiros vertebrados e invertebrados. O número de esporocisto analisado é fundamental para a identificação em nível de espécie, sendo possível a correta identificação morfológica estando esses devidamente esporulados. As características morfológicas fundamentais para o reconhecimento e organização sistemática dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* são (BERTO *et al.*, 2014): 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. Entre as características morfométricas estão diâmetro maior/menor do oocisto, diâmetro maior/menor do esporocisto e índices morfométricos (Figura 1). Belli *et al.* (2006) e Mai *et al.* (2009) realizaram estudos comprovando que a estrutura de base da parede do oocisto é comum a todos os coccídios, e fundamentaram que a parede do oocisto é constituída por duas camadas distintas, uma interna e outra externa, envolta por uma membrana externa, que em oocistos maduros isolados a partir de fezes estão ausentes. Como essa membrana é muito fina, ela desaparece em seguida ao desenvolvimento e eliminação do oocisto da célula. De acordo com Lainson e Shaw (1989) na camada externa da parede do oocisto, pode ser notada uma superfície áspera e a densidade aumenta conforme se aproxima da parte interna, sendo a camada interna pouco espessa e mais densa que a externa, sendo possível a diferenciação através de microscopia óptica. Nos estudos recentes comprovou-se que a parede de camada única descrita em alguns coccídios era em verdade duas camadas, com camadas muito finas e/ou fundidas o que dificultou a sua correta observação por microscopia óptica (BELLI *et al.*, 2006; MAI *et al.*, 2009). Outra característica citada por inúmeros autores é a coloração da parede do oocisto que serve como diferenciação

das espécies com base na cor da parede, definindo 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). De acordo com De Souza *et al.* (2009) a diferença de tonalidade entre as duas camadas, considerada como mais escura e mais clara, pode ser uma característica importante em alguns casos. Uma das características mais relevantes para a diferenciação é a textura da superfície exterior da parede do oocisto que pode variar de lisa à áspera (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). A parede do oocisto tem grande relevância na demarcação, proteção e resistência no meio exterior, possibilitando o desenvolvimento e a infectividade do coccídio (LEVINE, 1985; SOULSBY, 1987). O resíduo do oocisto é composto por uma grande estrutura entre os esporocistos de forma compacta, regular ou irregular, formada por grânulos; os grânulos polares são menores que o resíduo do oocisto e sempre densos (BERTO *et al.*, 2014). Berto *et al.* (2008a; b) explicam que os esporocistos têm estruturas conhecidas como corpo de Stieda e substieda que auxiliam a identificação de espécies, pois o tamanho e a forma mostram um padrão característico para cada espécie de *Isospora*. As variações são calculadas de acordo com a posição dos esporozoítos dentro do esporocisto, ou a posição do oocisto e esporocisto sob a lâmina. Ou seja, estas variações são sutis e pode, esporadicamente, ser observado em esporocistos de um único oocisto. Quando estas variações são evidentes em oocistos distintos, é possível que o hospedeiro apresente duas espécies diferentes. De um modo generalizado diferenciam em formato, podem ser em forma de mamilo, achatado, arredondado, meia lua, entre outros (BERTO *et al.*, 2014a). O corpo substieda se tornou importante devido ao fato de ser rotineiramente relacionado com *Isospora* spp.; 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). Observou-se e define-se a estrutura denominada como corpo de parastieda como representando um corpo substieda localizado no lado oposto do corpo de Stieda (DUSZYNSKI, 1985; DUSZYNSKI; WILBER, 1997). No entanto, Flausino *et al.* (2014) em recente estudo de *Eimeria caviae* mencionaram 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, que impossibilitava a localização das extremidades anterior e posterior do esporocisto (BERTO *et al.*, 2014a).

Berto *et al.* (2009a; b; c; d; 2011a; LOPES *et al.*, 2013) explicam que o resíduo dos esporocistos 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 que em outras espécies, observa-se um padrão distinto, onde os grânulos desenvolvem uma forma característica de anel. Segundo Berto *et al.* (2008b; 2009d; 2013b) e Lopes *et al.* (2014) as estruturas ligadas com o esporozoítio são os corpos refráteis, o núcleo e estrias na superfície externa e anterior da membrana do esporozoítio. Os corpos refráteis podem ser exclusivos para cada esporozoítio ou podem aparecer como um par, um anterior e outro posterior, a forma pode ser de alongada à subsférica. O núcleo é normalmente menor do que os corpos refráteis, e localizado na região mediana do esporozoítio (Figura 2).



**Figura 2.** Desenho em linha de um oocisto esporulado (Apicomplexa: Eucoccidiorida):



Eimeriidae) detalhando as principais estruturas que devem ser observadas, medidas e caracterizadas: (ow) diâmetro menor do oocisto; (ol) diâmetro maior do oocisto; (pg) grânulo polar; (or) resíduo do oocisto; parede do oocisto (row) áspera ou (sow) lisa; micrópila (mil) na camada interna ou (mol) externa; (mc) capuz polar; (sw) diâmetro menor do esporocisto; (sl) diâmetro maior do esporocisto; (sb) corpo de Stieda; (ssb) corpo de Substieda; (psb) corpo de Parastieda; resíduo do esporocisto (csr) compacto ou (dsr) difuso; (sp) esporozoíto; corpo refrátil do esporozoíto (prb) posterior e (arb) anterior; (n) núcleo do esporozoíto; e (str) estrias no esporozoíto. Reproduzido de Berto et al. (2014).

## 2.5. BIOLOGIA MOLECULAR

Tradicionalmente, a caracterização de espécies de *Isospora* tem sido baseado principalmente em características morfológicas, no entanto, devido a polimorfismos e especificidade desconhecida do hospedeiro a biologia molecular veio para ajudar nessa caracterização. Os dados moleculares são, portanto, importantes para delimitar com precisão as espécies. (Grulet et al., 1982; Levine, 1982).

A identificação das espécies de coccídios é primariamente feita através do estudo morfológico e morfométrico das formas exógenas isoladas de amostras fecais de seus respectivos hospedeiros, as quais são denominadas de oocistos. Os estudos morfológico, morfométrico e molecular de uma espécie de coccídio, representam a caracterização total de uma espécie e demonstram que as ferramentas modernas e tecnológicas complementam, mas não anulam as ferramentas tradicionais de identificação das espécies de coccídios. Neste contexto, novas espécies, genótipos e associações em cladogramas filogenéticos podem ser feitos neste estudo (BERTO et al., 2014).

Os coccídios da família Eimeriidae não são específicos para um único hospedeiro, porque não seria vantajoso para o parasita limitar suas oportunidades reprodutivas. Por este motivo é necessário para a identificação, isolar oocistos de uma única espécie. (DUSZYNSKI E COUCH 2013). De acordo com Prichard e Tait (2001), as ferramentas de biologia molecular têm se tornado cada vez mais relevantes para a parasitologia veterinária, permitindo grandes avanços no estudo da biologia dos parasitos e na melhoria dos métodos de diagnóstico e de controle. As sequências únicas de DNA fornecem níveis extremamente elevados de

especificidade para o diagnóstico e identificação das espécies e linhagens dos parasitos, e a PCR permite níveis altos de sensibilidade. TSUJI et al. (1997) descreveram que a reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) pode amplificar uma sequência específica de ácidos nucléicos e aumentar exponencialmente o número de cópias para detecção. A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos, utilizados como iniciadores, conhecidos como primers (funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada primer), que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Todos os primers são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas da região alvo.

O aparelho utilizado na execução da técnica é o termociclador. Em cada ciclo da PCR, três etapas estão envolvidas: desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; o anelamento dos primers às regiões alvo, ocorre com uma queda na temperatura para 35°C a 60°C; posteriormente a temperatura volta a aumentar, para 72°C, proporcionando a extensão da fita a partir da enzima DNA polimerase em cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo (FERREIRA et al., 1998; REGITANO, 2001b).

Para aumentar a especificidade na reação é feito o nested-PCR, que é um método sensível no qual o produto amplificado (amplicon) na primeira PCR é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do seguimento já amplificado. O segundo par de iniciadores usado sempre amplifica uma sequência menor que o primeiro par, tornando a reação de PCR mais específica e sensível (GRECA, 2010).

As análises comparativas das sequências de nucleotídeos destes marcadores, com as sequências de espécies conhecidas depositadas no GenBank, podem confirmar diagnósticos, complementar a caracterização de uma espécie e prover dados para estudos filogenéticos (OGEDENGBE et al., 2011; BERTO et al., 2014).

Caracteres moleculares podem expandir a gama de caracteres evolutivamente informativos que podem ser usados para inferir relações filogenéticas entre diferentes organismos (Sogin e Silberman, 1998). Isto é especialmente importante para os táxons de protozoários no filo Apicomplexa devido ao número limitado de caracteres fenotípicos que são adequados para estudos evolutivos. Os caracteres moleculares podem ser razoavelmente assumidos como sendo homólogos em um sentido evolucionário, bem como com variabilidade suficiente para gerar estados de caracteres para análise (Barta, 1997).

As descrições de coccídios de aves datam desde o final do século XIX onde os recursos disponíveis eram incompatíveis com a descrição morfológica detalhada dos oocistos. Por este motivo, inúmeras espécies descritas e relatadas na antiguidade, mas também em tempos atuais, precisam ser reescritas ou reposicionadas sistematicamente a fim de propiciar a identificação confiável desse protozoário (DUSZYNSKI et al., 2004; BERTO et al., 2011). O advento dos métodos moleculares forneceu um conjunto completamente novo de caracteres para esses organismos. A rápida expansão resultante no conjunto de dados moleculares de parasitas apicomplexos levantou a expectativa de que a determinação das relações filogenéticas entre esses parasitas se tornaria muito mais fácil. (Barta, 1997).

A filogenia molecular dos coccídios tem sido objeto de inúmeros estudos e opiniões (Cavalier-Smith 1983, 1993; Tenter et al. 2002). No entanto, tornou-se necessário, à luz de deficiências reconhecidas em estudos anteriores, explorar mais genes e genomas, a fim de obter uma melhor compreensão das relações dentro do filo Apicomplexa, no que diz respeito aos coccídios (Tenter et al. 2002 Morrison et al. 2004; Morrison 2008, 2009). Atualmente a identificação molecular tem sido amplamente utilizada como método de identificação complementar. O método molecular aplicado aos organismos de uma forma geral, inclusive aos coccídios, baseia-se na PCR a qual pode ser utilizada para amplificar sequências específicas de DNA ou marcadores moleculares de gênero ou família, como as seguintes regiões genômicas: (1) “o gene nuclear que codifica o RNA ribossômico (rRNA) 18S, componente da subunidade ribossomal menor, (2) “o gene nuclear que codifica o RNA ribossômico (rRNA) 28S, componente da subunidade ribossomal maior e (3) o gene mitocondrial que codifica para o citocromo c oxidase subunidade I (COX-1, COI). Embora a PCR seja rápida, altamente sensível e acurada, tem algumas limitações, falso positivos podem resultar de detecção de ácidos

nucléicos livres de microorganismos não viáveis ou de contaminação laboratorial. (GRECA, 2010).

Os organismos eucarióticos apresentam DNA ribossômico nuclear organizado em aglomerados que contêm subunidades 18s, 5.8s e 28s. Os genes que codificam essas subunidades são separados por dois Espaçadores Internos Transcritos (ITS). O ITS-1 que é encontrado separando os genes das subunidades 18s e 5.8s e ITS-2 separam genes das subunidades 5.8s e 28s (DEVTRAN et al., 2002).

O gene mais utilizado para caracterização molecular de parasitas coccídios é o gene 18S rRNA, que é altamente conservado como evidenciado pelo grande número de sequências de RNA de coccídio 18S no GenBank, seguido pelo gene COI (BARTA, 2001). O gene COI demonstra um poder de resolução maior que o do 18S gene rRNA na delimitação de eventos recentes de especiação (OGEDENGBE et al., 2011).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de execução deste trabalho, foram realizadas expedições ao Parque Nacional de Itatiaia Ilha da Marambaia, para obtenção de amostras fecais de *Trichothraupis sp.* e *Turdus spp.*, as quais foram processadas e analisadas no Laboratório de Biologia de Coccídios e no Laboratório de atividade Genotóxica de Plantas, do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Após análise dos resultados, foram produzidos dois artigos científicos os quais são apresentados a seguir contendo detalhes específicos dos materiais e métodos utilizados.

#### 4. RESULTADOS

Foram produzidos dois artigos científicos. Suas referências estão listadas abaixo:

##### **Artigo 1:**

GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; CARDOZO, S. V.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. Morphological and molecular identification of *Isospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoninae) in South America. ACTA PROTOZOOLÓGICA, v. 58, p. 1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4467/16890027AP.19.007.10838>

##### **Artigo 2:**

GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, M.O.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S. V.; OLIVEIRA, Á. A.; LIMA, V. M., FERREIRA, I.; BERTO, B. P. 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, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102040>

#### 4.1. ARTIGO 1

Identificação morfológica e molecular de *Isospora sepetibensis*  
(chromista: Miozoa: Eimeriidae) de um novo hospedeiro,  
*Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae:  
Tachyphoninae) na América do Sul

**4.1.1. Resumo.** *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2008 é um parasita protozoário coccídio (Chromista: Miozoa: Coccidiomorpha: Coccidia) que foi originalmente descrito a partir do Traupídeo *Ramphocelus bresilius* (Linnaeus, 1766) na Ilha da Marambaia, na costa do estado do Rio de Janeiro. No trabalho atual, esta espécie foi identificada a partir de traupídeos de trico-preto *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) no Parque Nacional do Itatiaia, que é uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade no interior do Estado do Rio de Janeiro. Os oocistos são sub-esféricos para alongar ovoidal, 25,9 × 20,7 µm com parede lisa, bicamada, ~ 1,3 µm e relação comprimento / largura de 1,1–1,4 (1,26). Micropila e resíduo do oocisto ausente, mas um ou dois grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são elipsoidais, 16,8 ± 10,3 µm, com corpos Stieda e sub-Stieda. Resíduo do esporocisto presente e esporozoítos com corpo refractário e núcleo. A análise molecular foi

conduzida no gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox1*) e exibiu uma similaridade superior a 98% com *Isoospora* spp. isolados de outros passeriformes neotropicais e com um *Isoospora* sp. pseudoparasita de ratas da Eurásia. Este é o primeiro parasita coccidiano de um tanager do Novo Mundo a ter uma identificação molecular do gene *cox1*.

**Palavras-chave:** morfologia, biologia molecular, taxonomia, filogenia, coccídios, oocistos, aves neotropicais, Thraupidae, Parque Nacional do Itatiaia

#### 4.1.2. INTRODUÇÃO

A subclasse Coccidia (Chromista: Miozoa: Coccidiomorpha) reúne vários gêneros de parasitas de animais domésticos e selvagens, que podem estar associados com enterite e morte (Fayer 1980; Ruggiero et al. 2015). Em Passeriformes, os principais gêneros são *Isoospora* Schneider, 1881 e, com pouca frequência, *Eimeria* Schneider, 1875 (Berto et al., 2011a).

O tiê-de-topete é uma espécie de ave da família Thraupidae. É a única espécie do gênero *Trichothraupis* (Vieillot, 1818), é caracterizado apresentando um topete de cor amarelada contrastando com um rosto negro. A parte de trás é cinza, com asas e cauda negras (Sick 1997; Ridgely e Tudor 1989). Esta espécie é muito comum no sudeste do Brasil (Isler e Isler, 1987).

Os Traupídeos são frequentemente parasitados por coccídios, principalmente por causa de seu hábito alimentar frugívoro, que favorece a transmissão fecal-oral. *Isoospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2008 foi morfologicamente descritos a partir do tiê-sangue *Ramphocelus bresilius* (Linnaeus, 1766) na Ilha da Marambaia (Berto et al. 2008); e no presente trabalho, esta mesma espécie coccidiana é identificada a partir do novo hospedeiro *T. melanops* no interior do Estado do Rio de Janeiro, proporcionando uma caracterização



genotípica preliminar via sequenciamento do gene da subunidade 1 citocromo c oxidase mitocondrial (*cox1*).

#### 4.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

**Coleta de amostras:** Quatro expedições foram realizadas no Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira (ICMBIO 2019). As amostragens ocorreram em abril de 2017 (22 ° 26'17.00 "S, 44 ° 37'33.00 "W e 22 ° 27'20.58" S, 44 ° 36'28.58 "O), junho de 2017 (22 ° 27'4.00" S, 44 ° 36'51.00 "O) e julho de 2017 (22 ° 26'17.00" S, 44 ° 37'33.00 "O). Um total de quinze *T. melanops* foram capturados com redes de neblina. As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes foram coletadas imediatamente após a defecação. Após identificação das espécies, as aves foram fotografadas e liberadas e as amostras de fezes foram colocadas em tubos falcon contendo solução de dicromato de potássio a 2,5% (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) a 1: 6 (v / v).

**Análise morfológica:** As amostras foram levadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25 ° C) por 10 dias ou até ~ 70% dos oocistos serem esporulados. Os oocistos foram isolados por flotação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014). Observações morfológicas, fotomicrografias e medidas foram feita usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado para uma câmera digital Eurekam 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Todas as medições estão em micrômetros e são dados como o intervalo seguido pela média entre parênteses.

**Análises moleculares:** Quinze oocistos cuidadosamente identificados com as mesmas características foram isoladas sob microscopia de luz e ressuspensas em PBS (Dolnik et al. 2009). As amostras foram recebidas no Laboratório de Atividade Genotóxicas de Plantas (LAGeP), e armazenado a -4 C° até o momento do uso. O DNA foi extraído dos oocistos usando o Kit Blood e Tissue DNeasy da Qiagen (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A fim de lisar completamente a parede dos oocistos, quatro ciclos de congelamento (-4 C°) e descongelamento (95 C°) foram aplicados antes da extração do DNA.

A amplificação para o gene *cox1* foi realizada utilizando nested PCR, como descrito por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os primers externos COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3 ') e COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3 ') produziram amplicons de 302 pb. Os primers internos COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3 ') e COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3 ') produzira amplicons de 257 pb em tamanho. 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 primer, 1,25 unidades de DNA polimerase GoTaq®, 3 µL de DNA (para reação primária) ou 3 µL do produto primário de PCR (para a reação secundária) e 30,8 µL de H<sub>2</sub>O. Tanto a primeira reação quanto a segunda foi conduzida usando as mesmas condições de ciclo: 1 ciclo de 94 ° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 47 ° C por 45 s, e 72 ° C por 1 min e uma final extensão de 72 ° C por 5 min. Os amplicons do segundo ciclo de PCR foram purificados usando o kit de purificação Qiagen MinElute PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil). Todos os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os primers reversos e inversos da Ludwig Biotechnology, Utilizou-se um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) para sequenciamento Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados usando o programa Chromas 2.6.

**Análise de sequência de DNA:** A sequência recém gerada foi comparada com *Isospora* spp. e outros parasitas coccidianos disponíveis no banco de dados do GenBank usando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST). Árvores filogenéticas foram construídas utilizando sequências COX 1 de isolados adicionais de *Isospora* spp. presentes no GenBank. Alinhamento e análises de parcimônia foram realizadas usando o programa MEGA versão 7 (Tamura et al. 2007). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (NJ) e Maximum Likelihood (ML) e as distâncias foram calculadas usando o método de Tamura-Nei baseado em seleção de modelos usando ModelTest no MEGA 7. As análises de Bootstrap foram conduzidas usando 1.000 replica para avaliar a confiabilidade de topologias de árvores inferidas.

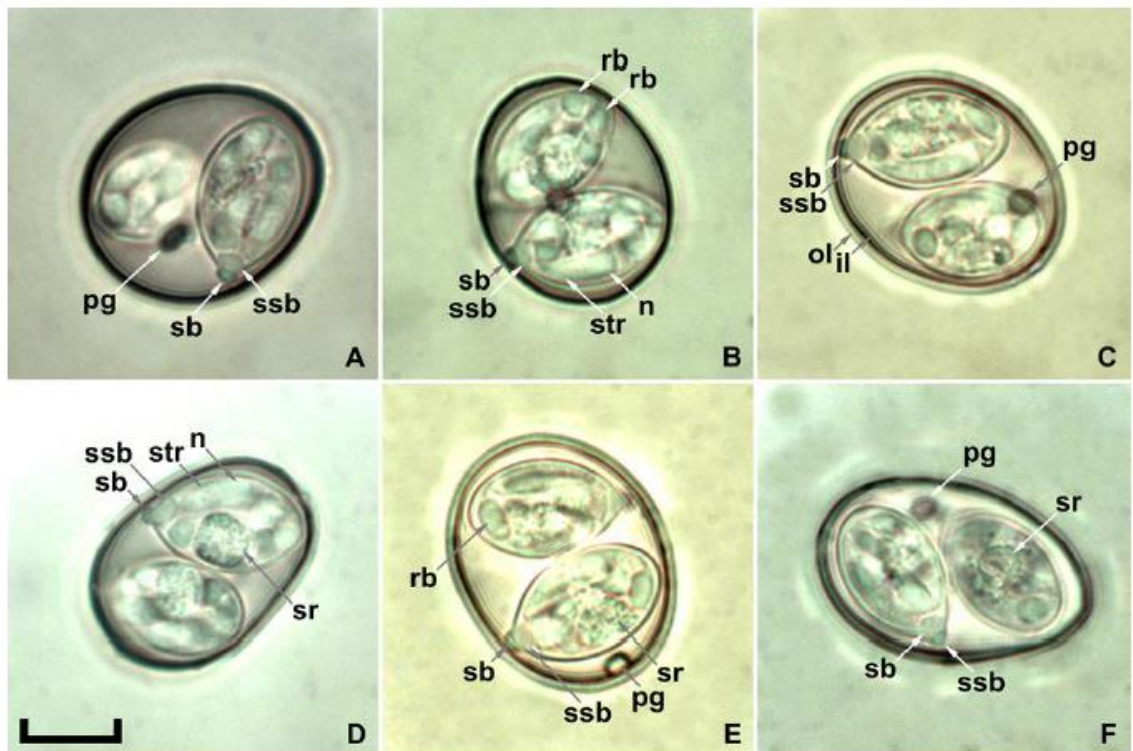
#### 4.1.4. RESULTADOS

Quinze tiê-de-topete foram examinados e dez deles mostraram oocistos nas fezes. Todos os oocistos observados foram identificados morfológicamente como *Isospora sepetibensis*. Este material é descrito abaixo.

***Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008 (Figura 3)**

**Descrição do oocisto esporulado:** Forma de oocisto (n = 18) sub-esférica para alongar ovoidal; 22–29 × 19–22 (25,9 × 20,7) razão comprimento / largura (L / W) 1,1–1,4 (1,26). Parede de bicamada, 1,1-2,0 (1,3) de espessura, camada externa lisa, c.2 / 3 de espessura total. Micrópila e resíduo do ausente, mas um ou dois grânulos polares estão presentes.

**Descrição de esporocistos e esporozoítos:** Sporocisto (n = 18), elipsoidal, 15-18 × 9-11 (16,8 ± 10,3); Razão L / W 1,5-1,8 (1,65). Corpo de stieda presente, tipo-botão, 1,1–1,3 (1,2) altura, 2,0-2,2 (2,1) de largura; corpo sub-Stieda presente, grande a trapezoidal ou, ocasionalmente, irregular, 1,2 a 2,3 (1,7) de altura, 2,7 a 3,5 (3,1) de largura; corpo para-Stieda ausente. Resíduo do sporocisto presente, consistindo em numerosos pequenos grânulos dispersos entre os esporozoítos ou como corpo distintamente sub-esférico que parece estar limitado por membrana, 5.5–6.7 (6.1). Esporozoito vermiforme com um corpo refractário posterior, núcleo centralmente localizado e estriações.



**Figura 3.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora sepetibensis* de *Trichothraupis melanops*. Abreviações: camadas interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto; micrópilo (m); grânulo polar (pg); Organismos de Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); esporozoito (sz); corpo refratário (rb). Tudo na mesma escala. Barra de escala: 10 µm.

**Hospedeiro:** *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) (Passeriformes: Thraupidae: Taquifoninae).

**Localidade:** Parque Nacional do Itatiaia (22 ° 26'17.00 "S, 44 ° 37'33.00" W), Sudeste do Brasil.

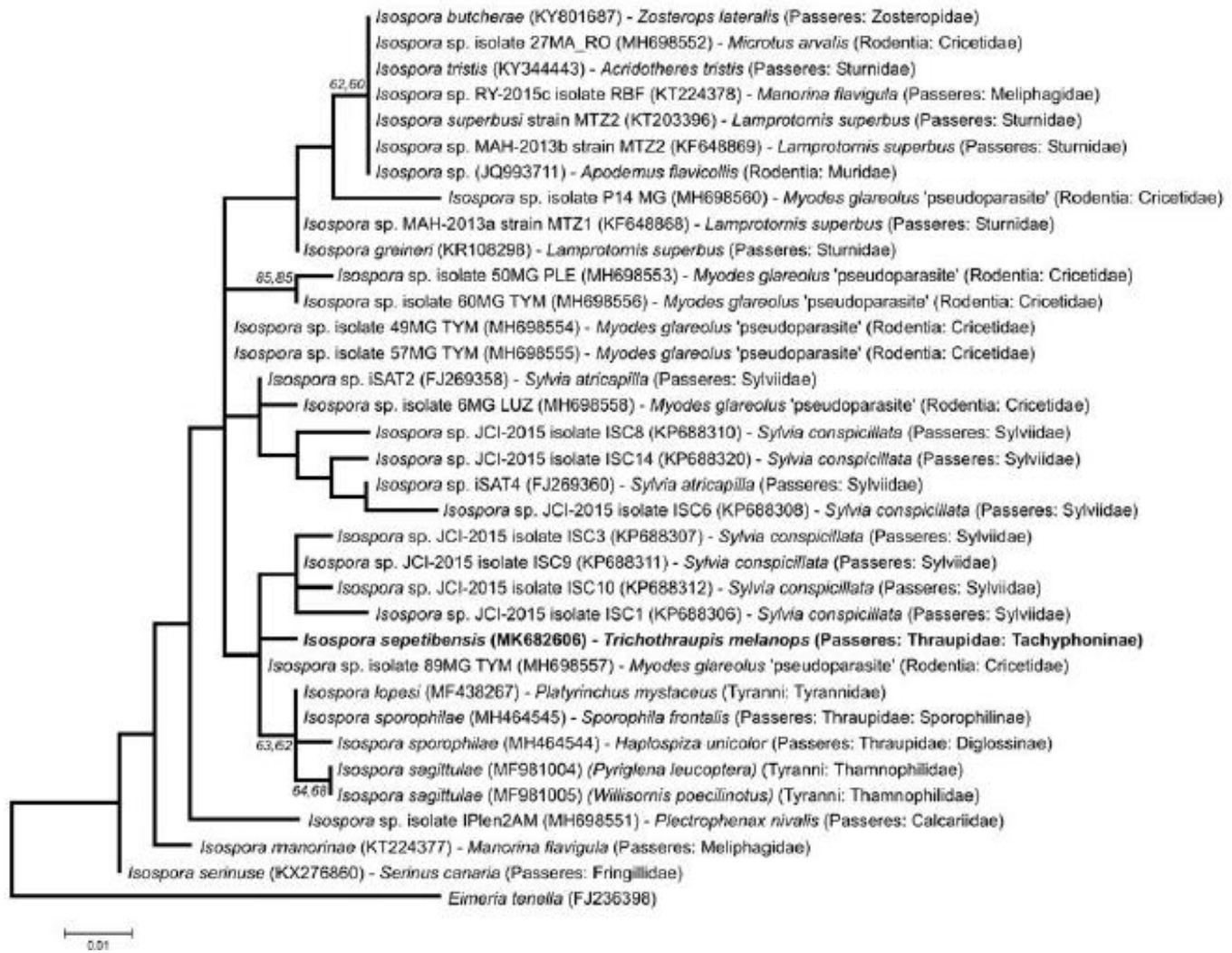
**Espécimes:** Fotomicrografias e oocistos em solução de 2,5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Williams et al. 2010) são depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2019014. Fotomicrografias também são depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção Parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob o número de repositório 92/2019. As fotografias dos espécimes hospedeiros são depositadas na mesma coleção.

**Site no host:** desconhecido.

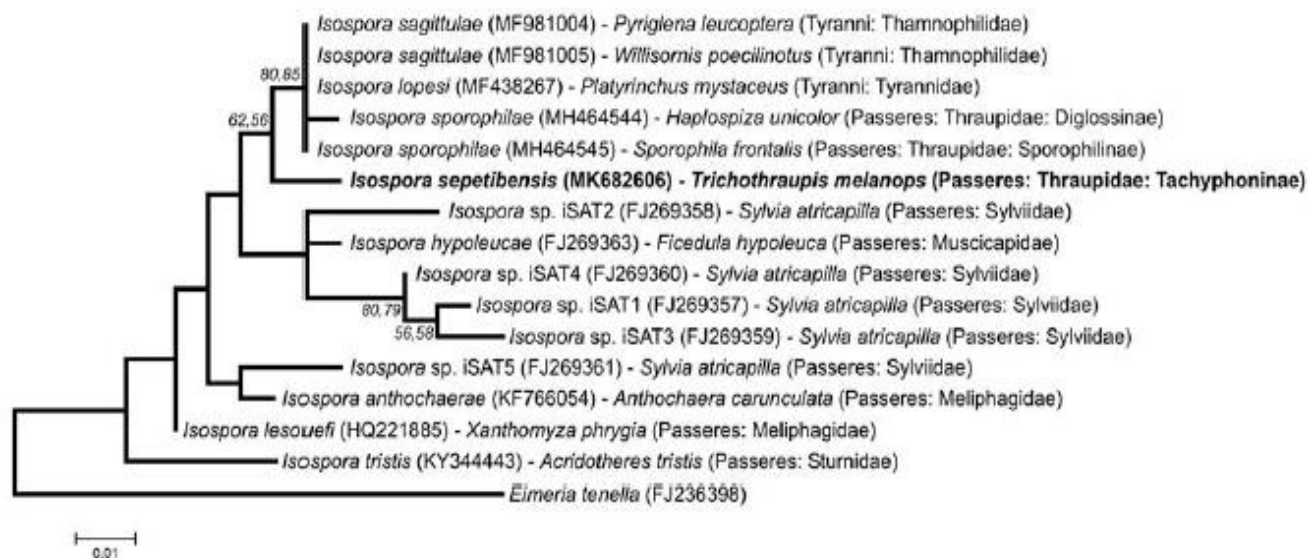
**Prevalência:** 67% (15 em 10 aves infectadas).

**Sequência de DNA representativa:** A sequência *cox1* sequenciada foi depositada no banco de dados do GenBank sob o número de acesso MK682606.

**Análise filogenética:** A amplificação do DNA dos quinze oocistos de *I. sepetibensis* recuperados de *T. melanops* mostrou uma banda clara de c. 250 pb. A análise filogenética foi construída com 33 sequências de *Isospora* spp. mais próximos de *I. sepetibensis* disponíveis no GenBank (Figura 4). *Eimeria tenella* (Railliet, Lucet, 1891) foi usada como grupo externo. *Isospora sepetibensis* posicionou-se em um grupo grande com a maior similaridade de 98,1% com um *Isospora* sp. relatado como pseudoparasita de ratazana do banco *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) na República Checa (Trefancová et al. 2019). Estava perto do clado com *Isospora* isolados da toutinegra-de-óculos *Sylvia conspicillata* Temminck, 1820 na Macaronésia (Illera et al. 2015); e também estava perto do clado com *Isospora* spp. recentemente sequenciados de passeriformes neotropicais (Silva-Carvalho et al. 2018a; 2018b; Rodrigues et al. 2019). Subsequentemente, foi construído um subconjunto com apenas sequências do gene *cox1* de 215 pb de comprimento (Figura 5). Nesta análise, *Isospora sepetibensis* posicionou -se no mesmo clado de *Isospora* spp. de passeriformes neotropicais, com a maior similaridade de 98,5% com *Isospora lopesi* Silva-Carvalho e Berto, 2018 (Silva-Carvalho et al. 2018a).



**Figura 4.** Árvore de probabilidade máxima estimada a partir das sequências *cox1*. Números nos nós representam suporte de autoinicialização (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para associação de vizinhos e Máxima Verossimilhança, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.



**Figura 5.** Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir do conjunto de dados da sequência *cox1* de 215 pb de comprimento para *Isospora* spp. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização (1.000 réplicas; somente valores > 50% mostrados) para associação de vizinhos e probabilidade máxima, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

#### 4.1.5. DISCUSSÃO

Os dados morfológicos relatados no presente trabalho mostraram um alto grau de similaridade com as descrições do parasita do tiê-sangue, *R. bresilius* e do saí-azul *Dacnis cayana* (Linnaeus, 1766) (Tabela 1) (Berto et al. 2008; 2011b). Apesar do polimorfismo já caracterizado por essa espécie de coccídio (Berto et al., 2011b), os padrões de forma / tamanho podem estar relacionados a cada um dos hospedeiros e / ou localidades. Os oocistos de *R. bresilius* foram menores e mais arredondados, como pode ser confirmado pela menor razão L / W (Berto et al. 2014); enquanto os oocistos de *D. cayana* eram menores; e os oocistos de *T. melanops* foram bastante alongados e maiores que os de *D. cayana* (Tabela 1). Além disso, alguns espécimes de *T. melanops* tinham uma sub-Stieda irregular (Figura 3c), que não era observado nos trabalhos anteriores (Berto et al. 2008; 2011b). Possivelmente, esses padrões / diferenças podem estar associados ao processo de especiação e adaptação a novos hospedeiros e / ou localidades, ou outros fatores associados (Fayer 1980; Gardner e Duszynski 1990).



Oocisto							Esporocisto						
Hospedeiro	Localidade	Referências	Forma	Medidas (µm)	L/W Razão	Parede (µm)	Granulo polar	Forma	Medidas (µm)	L/W razão	Corpo de Stieda	Corpo de Substieda	Resíduo
Ramphocelus bresilius (Linnaeus, 1766)	Marambaia Island, Coast of the State of Rio de Janeiro	Berto et al. (2008)	Subesférico para elipsoidal	24–29 x 22–26 (25.5 x 23.8)	1.0–1.2 (1.1)	1.3–1.4 (1.4)	1 ou 2	elipsoidal	16–18 x 10–12 (16.9 x 11.0)	–	Tipo botão	proeminente	Granular, deslocado lateralmente
Ramphocelus bresilius (Linnaeus, 1766)	Marambaia Ilha, Costa do Estado do Rio de Janeiro	Berto et al. 2011b)	subesférico para Ovóide	22–27 x 20–23 (24.8 x 21.7)	1.0–1.3 (1.14)	1.3	1 ou 2	elipsoidal	16–18 x 10–12 (17.4 x 10.9)	1.5–1.7 (1.59)	Tipo botão ou forma de bolha 1.5 x 2.0	proeminente	Granular, espalhado ou formando uma massa
Trichothraupis melanops (Vieillot, 1818)	Parque Nacional do Itatiaia, interior do Estado do Rio de Janeiro	Presente trabalho	Subesférico para ovóide alongado	22–29 x 19–22 (25.9 x 20.7)	1.1–1.4 (1.26)	1.1–2.0 (1.3)	1 ou 2	elipsoidal	15–18 x 9–11 (16.8 x 10.3)	1.5–1.8 (1.65)	Tipo botão 1.1–1.3 x 2.0–2.2 (2.1)	Grande para trapezoidal ou irregular 1.2–2.3 (1.7) x 2.7–3.5 (3.1)	Granular, difuso ou membranosa limitada, 5,5–6,7 (6,1)

**Tabela 1.** Morfologia Comparada de *Isospora sepetibensis*, registrados de diferentes Traupídeos hospedeiros e localidades no sudeste do Brasil.

A nova localidade de parasitismo de *I. sepetibensis* registrada no trabalho atual é digna de nota. A Ilha da Marambaia, onde ocorreram os dois relatos anteriores, está a mais de 100 km de distância e mais de 1.000 m de altitude no Parque Nacional do Itatiaia, no lado oposto da fronteira do Estado do Rio de Janeiro. Essa observação destaca a grande dispersão dessa espécie de coccídio no Estado do Rio de Janeiro e sua adaptação a consideravelmente diferentes ambientes (Berto e Lopes 2013).

Tradicionalmente, a caracterização de espécies aviárias de *Isospora* tem sido baseada principalmente em características morfológicas e especificidade do hospedeiro; no entanto, isso pode ser problemático sempre que houver equivalentes morfológicos de diferentes hospedeiros, ambientes ou de localidades que desfavorecem as transmissões (Gardner e Duszynski, 1990; Berto et al., 2011a; Hafeez et al., 2014). Nesse sentido, os estudos moleculares tornam-se relevantes. Métodos moleculares, como amplificação e sequenciamento de genes específicos, complementam os estudos morfológicos com novas informações sobre diversidade genética e também podem abordar questões sobre relações filogenéticas e filogeográficas, que são difíceis de responder apenas com dados morfológicos (Perkins e Shall 2002; Adkesson et al. 2005;



Schrenzel et al. 2005; Berto et al., 2011a). Nos últimos 10 anos, os métodos moleculares têm sido cada vez mais utilizados em estudos de diversidade, distribuição, especificidade, ecologia e diferentes aspectos da biologia evolutiva de parasitas aviários (Bensch et al. 2000; Waldenström et al. 2002). Neste contexto, o gene *cox1* foi escolhido para genotipagem no trabalho atual, pois foi indicado como o mais adequado para estudos filogenéticos por ter um maior poder de resolução do que o gene 18S rRNA, delineando eventos recentes de especiação (Yang et al. 2015; Ogedengbe et al. 2011; Silva-Carvalho et al. 2018a). *Isospora sepetibensis* é o primeiro parasita coccidiano de um Traupídeo do Novo Mundo a ter sua sequência *cox1* depositada no banco de dados do GenBank. A proximidade filogenética desta espécie coccidiana ao isolado pseudoparasita ratazana do banco na República Tcheca enfraquece a teoria da formação de um grupo monofilético com *Isospora* spp. de passeriformes neotropicais (Rodrigues et al. 2019; Trefanová et al. 2019). Embora não se saiba qual é o verdadeiro hospedeiro deste *Isospora* sp. isolado das fezes das ratazanas do banco, é logicamente conhecido que não é um passeriforme neotropical. De qualquer forma, com a frequência atual de sequências de *Isospora* spp. dos passeriformes depositados no Genbank, os estudos filogenéticos serão mais completos e conclusivos, especialmente com as sequências do gene *cox1* com 215 pb de comprimento que já foram consideradas mais úteis para estudos filogenéticos específicos (Yang et al. 2015; 2016). Nesta análise, *I. sepetibensis* posicionou-se em um grupo monofilético com *Isospora* spp. de passeriformes neotropicais, mas inferências maiores não são possíveis devido ao baixo número de sequências de genes *cox1* de 215 pb de comprimento depositados no banco de dados do GenBank.

Finalmente, com base em todos os resultados relatados no trabalho atual, *T. melanops* é registrado como um novo hospedeiro para *I. sepetibensis* no Parque Nacional de Itatiaia no Sudeste do Brasil; e, além disso, este é o primeiro parasita coccidiano de um traupídeo do Novo Mundo para ter uma identificação do gene *cox1*.

#### **4.1.6. AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). As permissões de coleta de campo foram emitidas pelo SISBIO / ICMBio (licenças 54951-1) e CEUA / UFRRJ (IV-6606250616). Agradecemos à equipe do Parque Nacional do Itatiaia, principalmente ao coordenador da pesquisa Dr. Léo Nascimento, que nos permitiu acessar e utilizar algumas instalações durante as expedições.

#### **4.2. ARTIGO 2**

Identificação morfológica e molecular de *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) dos sabiás *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) na América do Sul

**4.2.1. Resumo.** No trabalho atual, *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 é identificada a partir de sabiá-coleira *Turdus albicollis* Vieillot, 1818, sabiá-laranjeira *Turdus rufiventris* Vieillot, 1818 e de um novo hospedeiro, sabiá-una *turdus flavipes* (Vieillot, 1818) em uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar por sequenciamento da subunidade 1 da citocromo c oxidase 1 mitocondrial (COI) e da subunidade menor do RNA ribossômico 18S. Os oocistos e esporocistos de *I. massardi* do presente trabalho são morfológicamente semelhante à descrição original e uniforme na proporcionalidade da largura no comprimento, mas exibiu diferentes padrões de tamanho associados a cada espécie hospedeira. Além disso, foi encontrada uma diferença genotípica de 3% nas sequências de COI de *T. flavipes* e *T. albicollis*. Portanto, é introduzida uma discussão ecológica com o objetivo de associar essas diferenças morfométricas e genotípicas a um processo de especiação em andamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** oocistos; coccídios; taxonomia; morfologia; genotipagem; filogenia; sabiá; Parque Nacional do Itatiaia; Brasil

#### 4.2.2. INTRODUÇÃO

A subclasse Coccidia (Chromista: Miozoa: Coccidiomorpha) reúne vários gêneros de parasitas de animais domésticos e selvagens, que podem estar associados a enterite e morte (Fayer, 1980; Ruggiero et. al 2015). Em Passeriformes, os principais gêneros são *Isospora* Schneider, 1881 e, raramente, *Eimeria* Schneider, 1875 ( Berto et. al 2011). Os coccídios, como outros parasitas, são de grande relevância para os sabiás devido à maior probabilidade de transmissão entre vários *Turdus* spp., que possuem extensas faixas geográficas na região Neotropical, sendo simpáticas entre si. (Sick, 1997; Piacentini et. al 2015; BirdLife, 2019; Berto et. al 2013). Além disso, Turdidae é uma das famílias de Passeriformes com muitas descrições e relatos de espécies coccidianas, totalizando 10 *Isospora* spp. descritos até o momento, além

de uma *Eimeria* sp. recentemente descrito. (Berto et. al 2013; Oliveira et. al 2019; McAllister and Hnida 2019). *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 foi descrito morfológicamente a partir de Sabiá-coleira *Turdus albicollis* Vieillot, 1818 da Ilha Marambaia (Lopes et. al 2014), e no trabalho atual, essa mesma espécie coccidiana é identificada a partir de *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818) e *Turdus rufiventris* Vieillot, 1818, no Parque Nacional do Itatiaia (Parque Nacional do Itatiaia) e na Ilha Maramabia, no norte do país. costa do sudeste do Brasil, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar por sequenciamento dos genes da subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial 1 (COI) e do RNA ribossômico da pequena subunidade 18S (18S).

### 4.2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Coleta de amostras

Vinte expedições foram realizadas no Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira (ICMBIO, 2019). A amostragem ocorreu em agosto de 2014, maio de 2015, julho de 2016, abril de 2017, julho de 2017 e março de 2019 (22 ° 26'17,00 "S, 44 ° 37'33,00" W); Novembro de 2014, junho de 2016, novembro de 2017 e agosto de 2018 (22 ° 26'57,00 "S, 44 ° 36'25,00" W); Dezembro de 2014 e abril de 2017 (22 ° 27'20,58 "S, 44 ° 36'28,58 "W); março de 2015, outubro de 2016 e maio de 2018 (22 ° 27'40,30" S, 44 ° 35'31,86 "W); 77 de abril de 2015 (22 ° 27'52,00 "S, 44 ° 36'26,00" W); Julho de 2015 e junho de 2017 (22 ° 27'4,00 "S, 44 ° 36'51,00" W); Novembro de 2015 (22 ° 27'48,00 "S, 44 ° 36'10,00" W); e março de 2016 (22 ° 19'46,00 "S, 44 ° 32'11,00" W). Um total de 22 sabiá-coleira *T. albicollis*, 18 sabiá-una *T. flavipes* e 18 sabiá-coleira *T. rufiventris* foram capturados com redes de neblina. Além do Parque Nacional do Itatiaia, em junho de 2019, foi realizada uma expedição recente na Ilha Marambaia (23 ° 3'52,90 "S, 43 ° 59'22,80" W), na costa do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, onde três *T. rufiventris* Vieillot, 1818 foram capturados com redes de neblina. As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes coletadas imediatamente após defecação. Após a identificação das espécies, o pássaro foi fotografado e liberado e amostras de fezes foram colocadas em tubos de centrifugação contendo dicromato de potássio a 2,5% Solução (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) a 1: 6 (v / v). As autorizações de coleta de campo foram emitidas para B. P. Berto pelo SISBIO / ICMBio

(licenças 45200; 49605; 54951) e CEUA / UFRRJ (protocolos IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616).

### **Análises morfológicas**

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e depois foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) por 7 dias. Os oocistos foram isolados por flutuação na solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica 95: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (Duszynski et. al 1997; Berto et al. 2014). Observações morfológicas, desenhos de linhas, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Os desenhos de linha foram editados usando dois aplicativos de software da CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 11.0, Corel Corporation, Canadá), especificamente Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT. Todas as medições são em micrômetros e são fornecidas como a faixa seguida pela média entre parênteses.

### **Análise estatística**

Dois métodos estatísticos paramétricos foram empregados após avaliação prévia dos dados pelo teste de normalidade de D'Agostino: (1) Análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar medidas da relação comprimento, largura e comprimento / largura (L / W) de os oocistos e esporocistos recuperados de *Turdus* spp. O pacote estatístico Bioestat 5.0 (Ayres et. al 2007) foi utilizado para calcular a média, variância, grau de liberdade e valor [p] 13,15; (2) Regressão linear para determinar a distribuição de oocistos recuperados de *Turdus* spp. usando métodos propostos por Norton e Joyner (Norton et. al 1981) e posteriormente modificados por Berto et al. (Berto et. al 2014). Os gráficos e o coeficiente de regressão foram obtidos utilizando o software Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, Washington).

### **Isolamento de um oocisto individual e extração de DNA**

Um oocisto individual de cada amostra foi isolado a partir de diluições em série dos oocistos na lâmina do microscópio usando uma micropipeta estéril (Dolnik et. al 2009). Este oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até o sobrenadante ficar

claro. As amostras foram recebidas no Laboratório de Atividade Genotóxicas de Plantas (LAGeP), e armazenado a -4 C° até o momento do uso. O DNA foi extraído do oocisto usando o kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para lisar completamente os oocistos, quatro ciclos de congelamento (-4 C°) e descongelamento (95 C°) foram aplicados antes da extração do DNA.

Para evitar a contaminação durante a extração e amplificação, todas as amostras foram registradas individualmente, os reagentes preparados em uma cabine de segurança biológica de fluxo laminar e, finalmente, controles negativos foram usados para reações de amplificação.

### **Amplificação de ~ 250 pb do gene COI (COI1)**

A amplificação por PCR de aproximadamente 250 pb do gene COI foi realizada utilizando primers (COI1), como descrito anteriormente por Dolnik et al. (Dolnik et. al 2009) e Yang et al. (Yang et. al 2015). Os iniciadores externos: COIbF1 (5' 'GWTCATTAGTATGGGCACATCA-3') e COIbR1 (5'-CCAAGAGATAATACRAARTGGAA-3 ') produziram um tamanho de produto de PCR de ~ 302pb. Os primos internos: COIbF2 (5'-GGGCACATCATATGATGAC-3') e COIbR2 (5'-ATAGTATGTATCATGTARWGCAA-3') produziram um amplificador de 257 pb. A reação de PCR continha 10 µL de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µL de 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de 130 10mM dNTP's, 0,4 µM de cada primer, 1,25 unidades de DNA polimerase GoTaq®, 3 µL de DNA (para reação primária) ou 3µL de produto primário de PCR (para reação secundária). As PCRs primária e secundária foram conduzidas utilizando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94 ° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 47 ° C por 45 s e 72 ° C por 1 min e uma extensão final de 72 ° C por 5min. Os amplicons da segunda reação de PCRs foram purificados usando o kit de purificação da Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

### **Amplificação de ~ 650 pb do gene COI (COI2)**

A amplificação por PCR de aproximadamente 650 pb do gene COI foram desenhados a partir da sequência de *Isospora greineri* Hafeez, Stasiak, Delnatte, El-Sherry, Smith & Barta,

2014 (KR108298) disponível no banco de dados GenBank usando o Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os iniciadores projetados foram os seguintes: JAVF (5'-CTGAATTTGGTTCAGGTGTTGGT-3') e JAVR (5'-143 TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG-3') que produzem um amplicon de 651 pb de tamanho. Para a amplificação, uma reação de PCR de 25 µl foi preparada usando 3 µL de DNA genômico (<1 µg), 12,5 µL de Mix Master Incolor GoTaq® G2 Hot Start (Promega Labs) (1X), 0,25 µL de cada Primer (0,2 µM) e 9 µL de água purificada. A PCR foi conduzida usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 94 ° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 53 ° C por 45 s e 72 ° C por 50 s e uma extensão final de 72 ° C por 5 min. Os amplicons da PCR foram purificados usando o kit de purificação da Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

### **Amplificação do gene 18S**

Para amplificação do gene 18S foram projetados primers a partir de sequências de *Isospora robini* McQuiston & Holmes, 1988 (AF080612) e *Isospora gryphoni* Olson, Gissing, Bariss & Middleton, 1998 (AF080613) disponíveis no banco de dados GenBank usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os iniciadores projetados foram os seguintes: 1NF (5' CAGGCTTGTCGCCCTGAATA-3') e 1NR (5' CTGGACCTGGTGAGTTTCCC158 3'), que produzem um amplicon de 444 pb de tamanho. Para amplificação, uma reação de PCR de 25 µl foi preparada usando 3 µL de DNA genômico (<1 µg), 12,5 µL de Master Mixer Incolor GoTaq® G2 Hot Start (Promega Labs) (1X), 0,25 µL de cada Primer (0,2 µM) e 9 µL de Água purificada. A PCR foi conduzida usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 94 ° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 55 ° C por 30 s e 72 ° C por 30 s e uma extensão final de 72 ° C por 5 min. Os amplicons da PCR foram purificados usando o kit de purificação da Qiagen MinElute PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil).

### **Análises de sequência de DNA**

Todos os produtos de PCR foram sequenciados pela empresa Ludwig Biotechnology, um analisador genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi

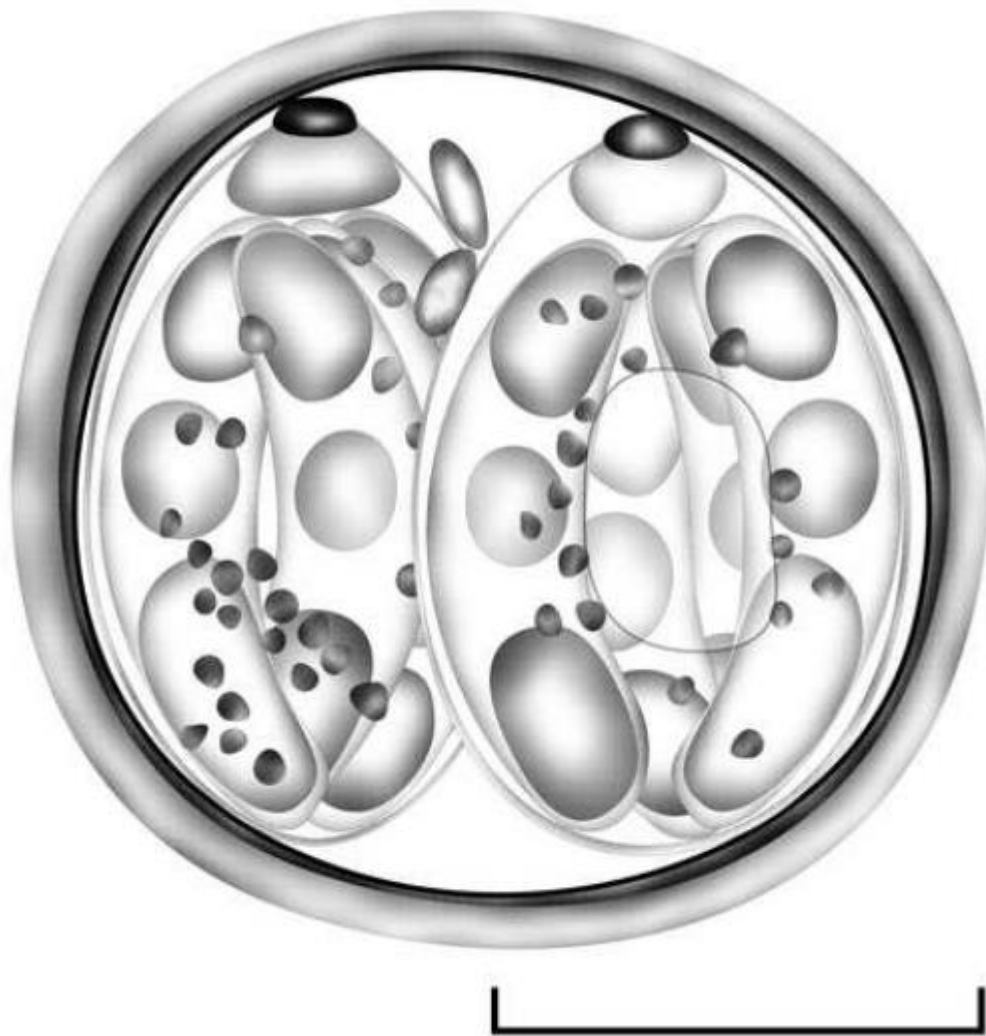
usado para sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados usando o programa Chromas 2.6. As sequências foram comparadas entre si e com outras espécies de coccídios disponíveis no banco de dados GenBank, usando a Ferramenta de Pesquisa Básica de Alinhamento Local (BLAST). Árvores filogenéticas foram construídas utilizando os primers COI1, COI2 e 18S para espécies de coccídios isolados do GenBank. As análises de alinhamento e parcimônia foram realizadas usando o MEGA versão 7 (tamura et. al 2007). A história evolutiva foi inferida usando os métodos de vizinhança (NJ) e máxima verossimilhança (ML) e as distâncias foram calculadas usando o método Tamura177 Nei com base na seleção de modelos usando ModelTest no MEGA 7. As análises de bootstrap foram conduzido usando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvores inferidas.

#### **4.2.4. RESULTADOS**

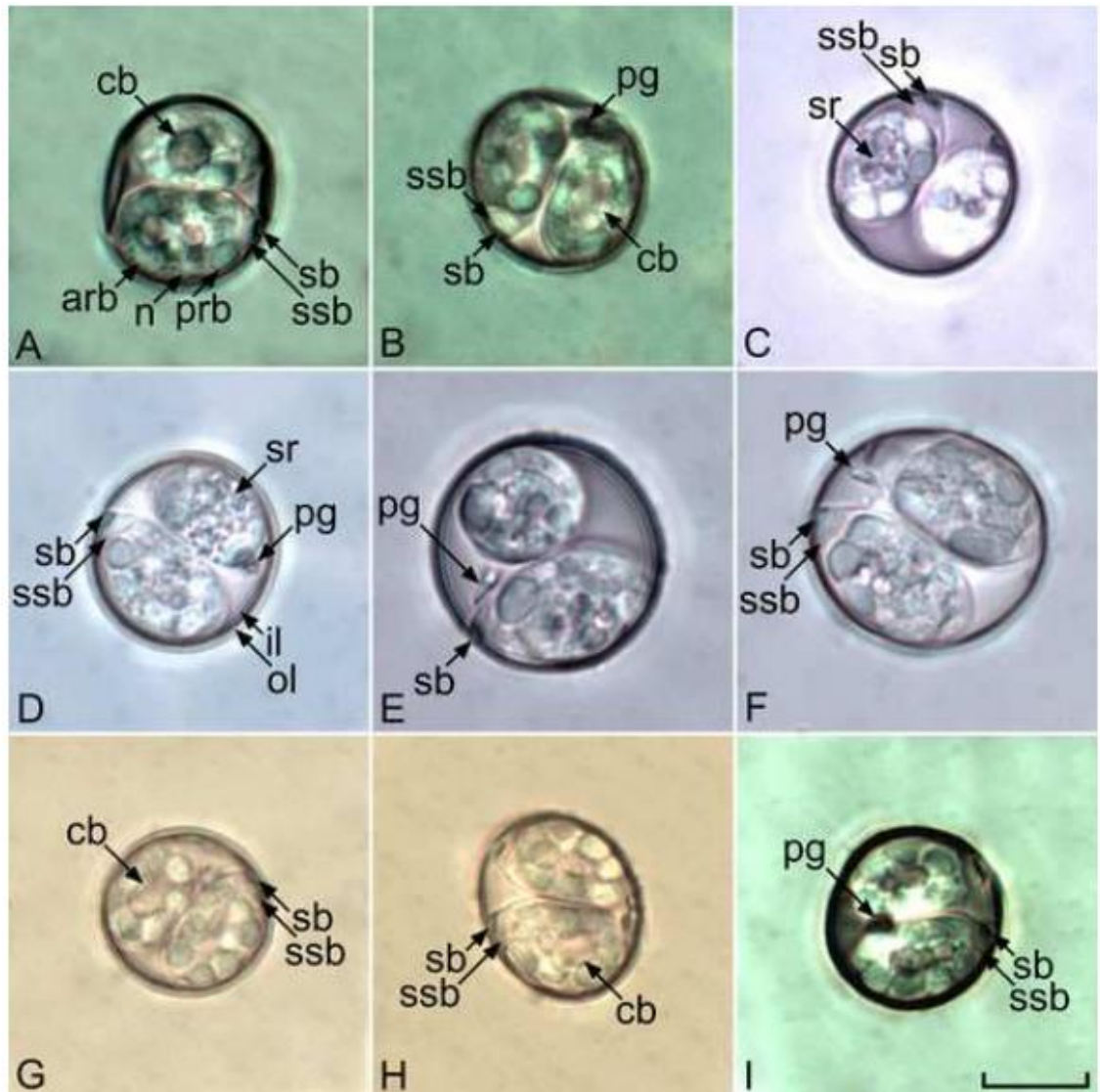
##### **Prevalência e identificação**

Sessenta e um *Turdus* spp. foram examinados, 22 foram positivos para oocistos coccidianos que foram identificados morfológicamente como *I. massardi*. Este material é descrito abaixo.





**Figura 6.** Desenho de *Isospora massardi*, uma espécie de coccídio recuperada de sabiá *Turdus* spp. Barra de escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 7.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora massardi*, uma espécie de coccídio recuperados de (A-C) *Turdus albicollis*, (D-F) *Turdus flavipes* e (G-I) *Turdus rufiventris* do sudeste do Brasil. Observe os corpos refratários anterior (arb) e posterior (prb), corpo cristalóide (cb), camada interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto, núcleo (n), polar grânulos (pg), corpo refrátil (rb), esporocisto residual (sr) e os corpos de Stieda (sb) e subStieda (ssb). Barra de escala = 10 µm

*Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira e Lopes, 2014 (Figuras. 7, 8a – i)

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881

Oocisto (n = 171) subesferoidal a elipsoidal,  $16 \times 26 \times 16 \times 23$  ( $20,5 \times 19,2$ ); razão comprimento / largura (L / W)  $1,0 \pm 1,2$  (1,07). Parede dupla, com 1,2 Parede 11,6 (1,3) de espessura, camada externa lisa. Os resíduos de micróptilos e oocistos estão ausentes, mas dois grânulos polares estão presentes. Esporocistos (n = 171) 2, ovoide a elipsoidal,  $12 \times 19 \times 7 \times 12$  ( $15,4 \times 9,4$ ); Razão L / W  $1,3 \pm 1,9$  (1,65). Corpo de Stieda presente, em forma de botão arredondado,  $0,8 \times 1,8 \times 1,1 \times 2,3$  ( $1,1 \times 1,9$ ); sub201 Stieda presente, arredondado para trapezoidal,  $1,4 \pm 2,0 \times 3,5 \times 4,5$  ( $1,7 \times 4,0$ ); corpo para-Stieda ausente; corpo cristalóide geralmente presente no centro do esporocisto; resíduo de esporocisto presente, composto por esférulas espalhadas de diferentes tamanhos. Esporozoítos, vermiformes, com corpos refratários anterior e posterior e núcleo localizado centralmente.

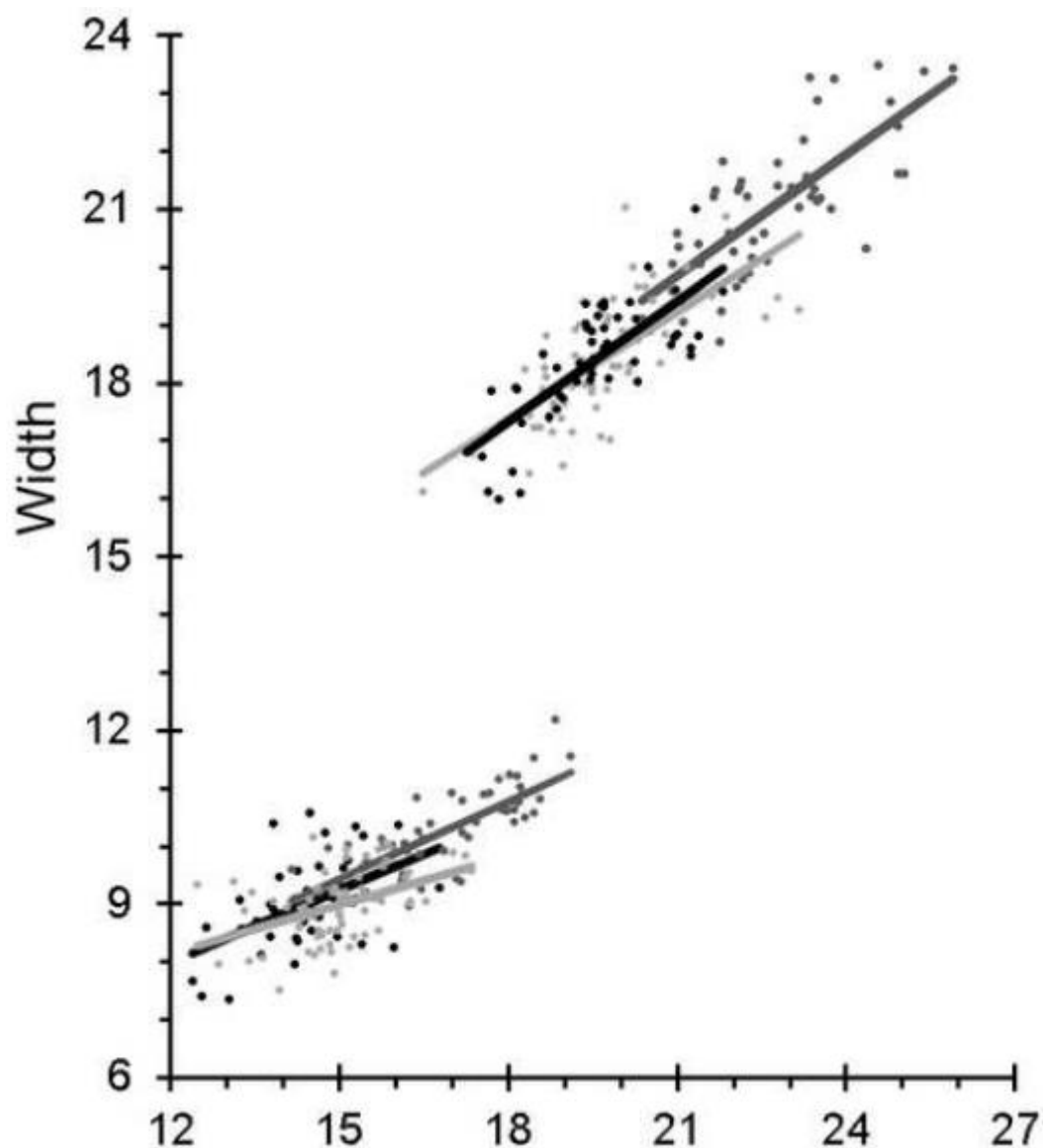
### Resumo Taxonômico

Hospedeiro tipo: O sabiá-coleira *Turdus albicollis* Vieillot, 1818; o sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818); e o sabiá-laranjeira *Turdus rufiventris* Vieillot, 1818 (Aves: Passeriformes: Passeri: Turdidae). Localidades: Parque Nacional do Itatiaia - Parque Nacional do Itatiaia ( $22^\circ 27'S$ ,  $44^\circ 36'W$ ) e Ilha Marambaia ( $23^\circ 3'52,90''S$ ,  $43^\circ 59'22,80''W$ ), ambas no sudeste do Brasil Espécimes: Fotomicrografias, desenho de linhas e oocistos na solução K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a 2,5% são depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob os números de acesso MZURPTZ2019017 (*T. albicollis*), MZURPTZ2019018 (*T. flavipes*) e MZURPTZ2019019 (*T. rufiventris*). As fotomicrografias também são depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o número de repositórios 100/2019 (*T. albicollis*), 101/2019 (*T. flavipes*) e 102/2019 (*T. rufiventris*). Fotografias das amostras hospedeiras são depositadas na mesma coleção. Sequência de DNA representativa: amplificação de DNA dos genes COI1, COI2 e 18S mostrou bandas claras em torno de ~ 250 pb, ~ 650 pb e ~ 400 pb, respectivamente. Representante das sequências foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso: MN602626 (COI1, *T. flavipes*); MN602625 (COI1, *T. albicollis*); MN602627 (COI2, *T. flavipes*); e MN604690 (18S,

*T. flavipes*). Local da infecção: Desconhecido, Prevalência: 36% (22/61) no total; 41% (9/22) para *T. albicollis*; 33% (6/18) para *T. flavipes*; e 33% (21/7) para *T. rufiventris*, dos quais 33% (1/3) da Ilha Maramabia e 33% (18/6) do Parque Nacional Itatiaia.

### **Observações**

*Isospora massardi* é uma espécie facilmente distinguível de outras espécies coccidianas de Turdidae (Tabela 2). Seus oocistos possuem corpos típicos de Stieda e sub-Stieda, grânulos polares frequentemente em pares entre os esporocistos e o corpo cristalóide, o que não foi evidenciado na descrição original de Lopes et al. (Lopes et al. 2019) (figuras. 7, 8) Os oocistos de *I. massardi* dos três *Turdus* spp. do trabalho atual foram equivalentes à descrição original de Lopes et al. (Lopes et al. 2015) em todas as características morfológicas. No entanto, o estudo morfométrico mostrou que os oocistos do presente estudo eram razoavelmente maiores que os da descrição original, considerando principalmente a morfometria dos oocistos de *T. flavipes*, significativamente maiores que os de *T. albicollis* e *T. rufiventris*. A relação P / P dos oocistos foi equivalente entre os três *Turdus* spp. Os esporocistos tiveram os mesmos resultados do estudo morfométrico dos oocistos, com apenas algumas variações (tabela 2, 3). A regressão linear reproduziu graficamente os resultados do estudo da morfometria, evidenciando regularidade na distribuição das medidas dos oocistos e esporocistos dos três *Turdus* spp. (Figura 8)

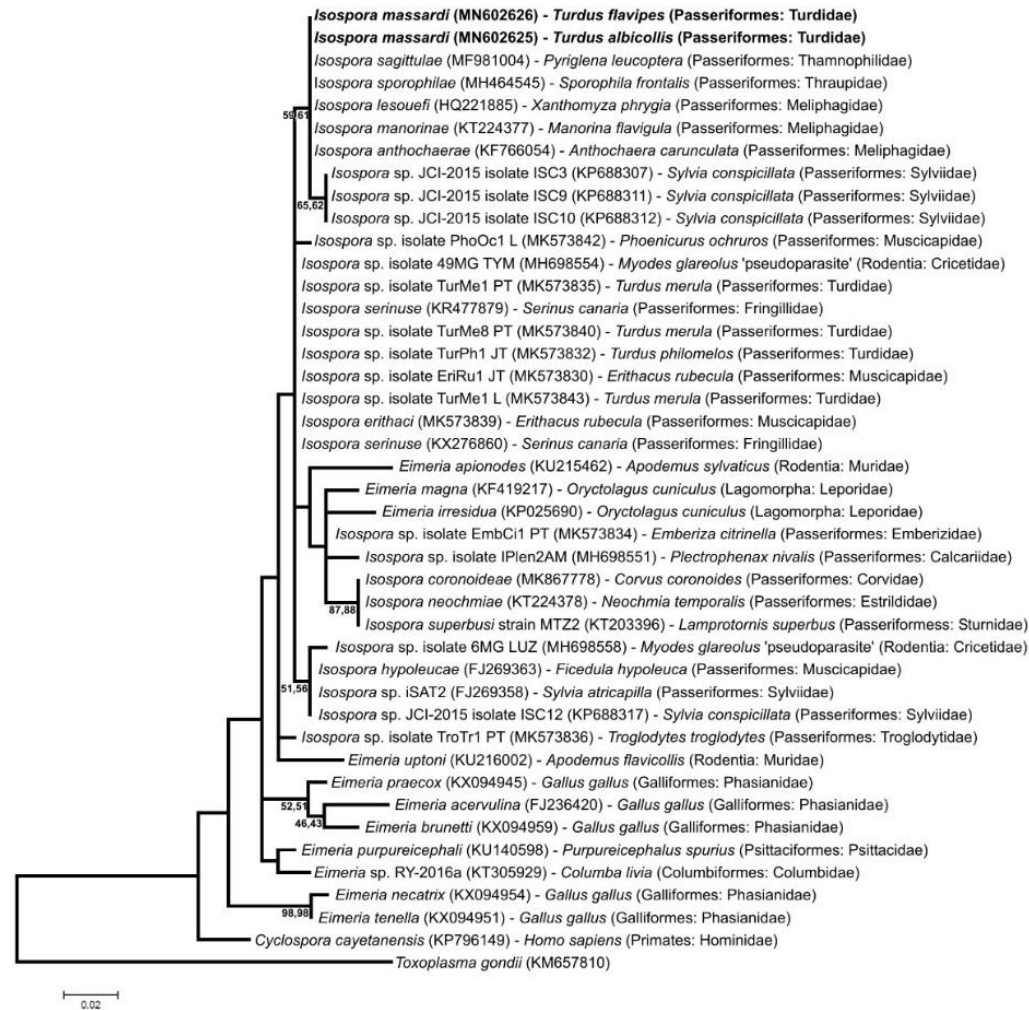


**Figura 8.** Regressões lineares comparativas de oocistos (acima) e esporocistos (abaixo) de *Isospora massardi* recuperados de *Turdus albicollis* (preto), *Turdus flavipes* (cinza escuro) e *Turdus rufiventris* (cinza claro) do sudeste do Brasil.

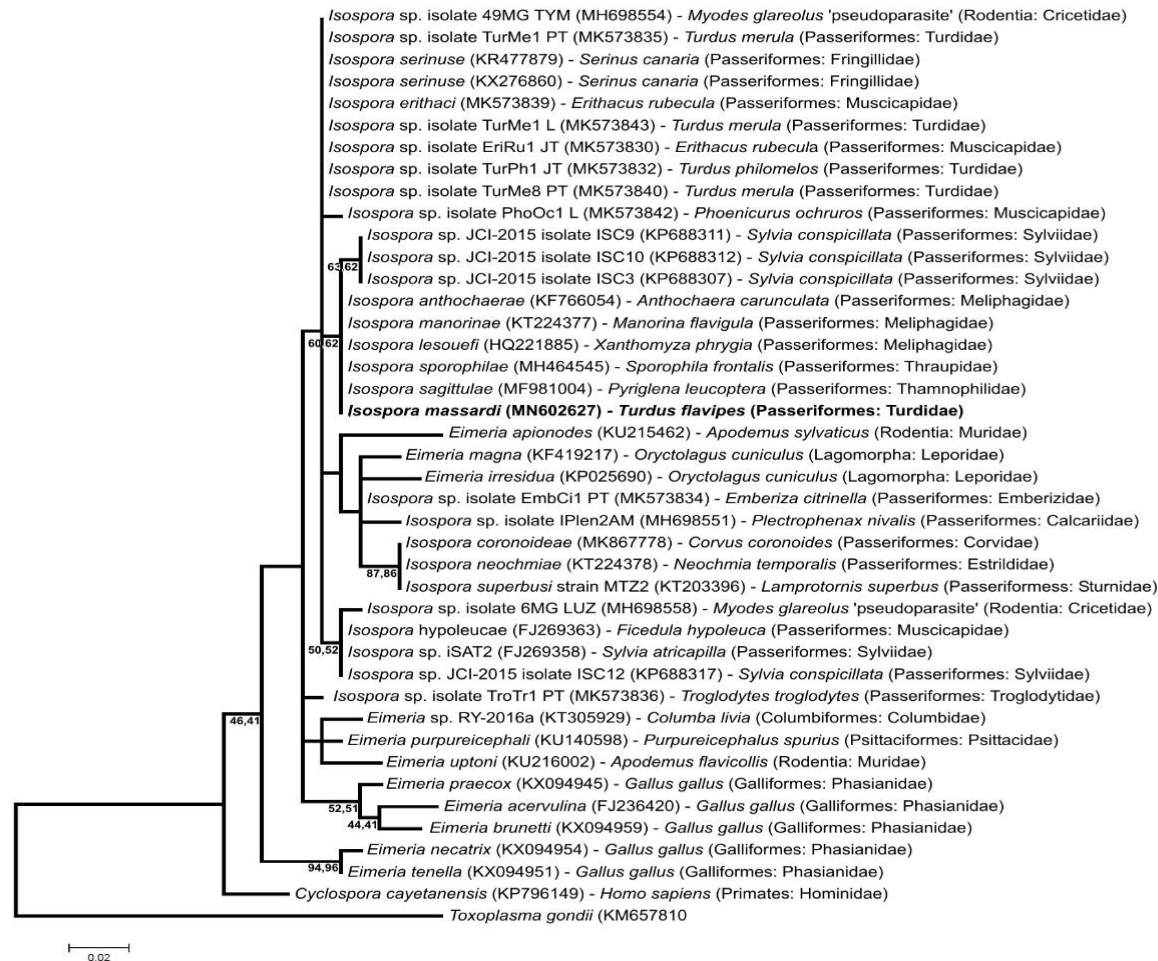
### **Análise filogenética**

A análise filogenética incluiu sequências de coccídios disponíveis no GenBank (Figuras. 10-11). *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) foi usado como grupo externo. Na análise filogenética baseada no gene COI1 (Figura 9), *I. massardi* de *T. albicollis* e *T. flavipes* apresentaram similaridade de 97% e foram recuperadas em um clado com maior semelhança de 98% com isolados de *Isospora* spp. *Sylvia conspicillata* Temminck, 1820 e *Isospora*

*manorinae* dos mineiros de garganta amarela *Manorina flavigula* (Gould, 1840). Na análise filogenética baseada em COI2 (Figura 10), foram observados resultados equivalentes às seqüências de COI1. Novamente, *I. massardi* foi recuperada em um clado com *Isospora* spp. de *S. conspicillata* e *I. manorinae*, desta vez com aproximadamente 96% de semelhança com esses isolados. Na análise filogenética baseada em 18S (Figura 11), *I. massardi* posicionou -se em um clado com a similaridade de 100% com *Isospora* spp. de Passeriformes, incluindo dois isolados de *Turdus* spp depositados recentemente no GenBank.

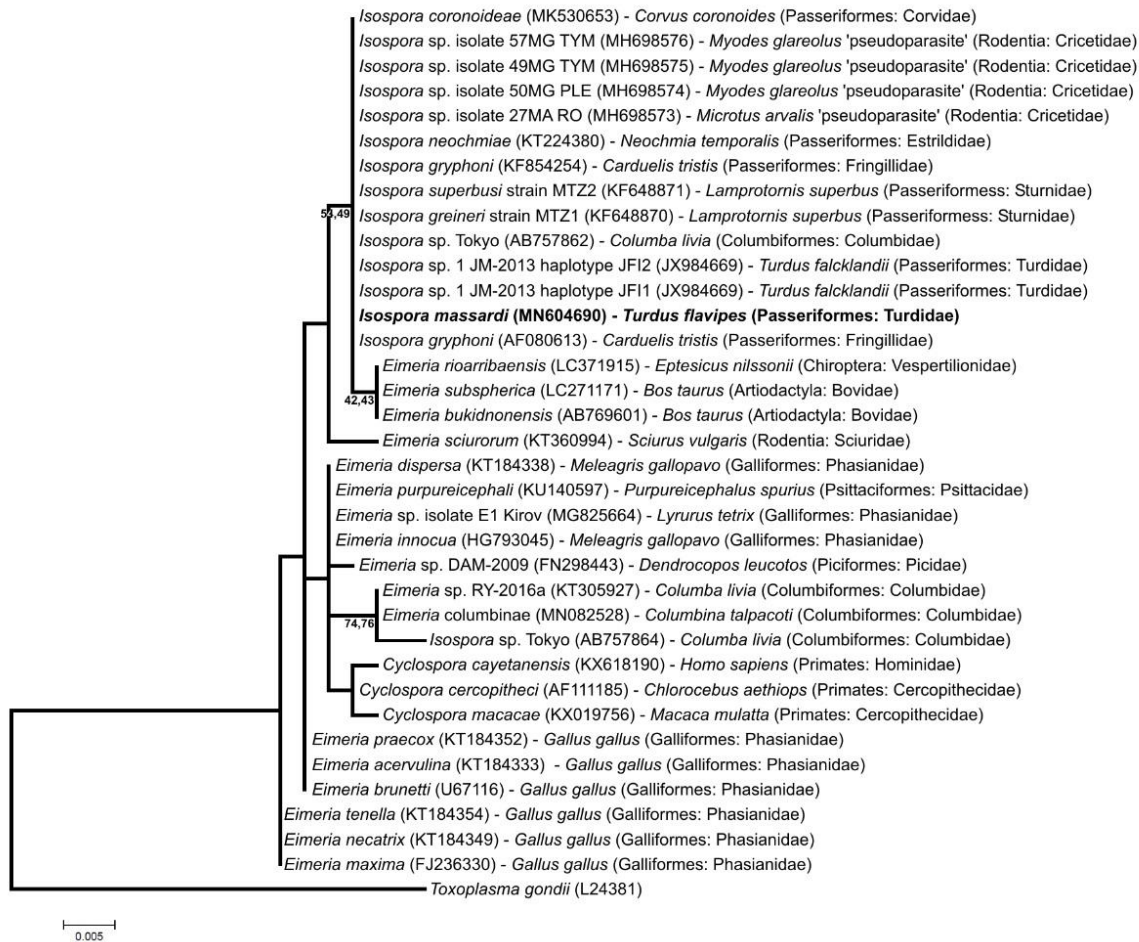


**Figura 9.** Árvore de máxima probabilidade estimada a partir das seqüências do gene COI1 de espécies coccidianas. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%) para Vizinhança (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local



**Figura 10.** Árvore de máxima probabilidade estimada a partir das seqüências do gene COI2 de espécies coccidianas. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%) para Vizinhança (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.





**Figura 11.** Árvore de probabilidade máxima estimada a partir das sequências do gene 18S de coccídios espécies. Os números nos nós representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%) para Vizinhança (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local

#### 4.2.5. DISCUSSÃO

*Isospora massardi* é uma espécie coccidiana originalmente descrita de *T. albicollis* na Ilha Marambaia, na costa do Estado do Rio de Janeiro (Lopes et. al 2014). Posteriormente, foram relatadas espécies de quatro *Turdus* spp., incluindo *T. albicollis* e *T. rufiventris*, em um área fragmentada da serra costeira (Serra do Mar), na região Serrana da Serra estado do Rio de Janeiro (Oliveira et. al 2017). Finalmente, o trabalho atual identifica *I. massardi* a partir de sabiás do Parque Nacional do Itatiaia, destacando que esta espécie está bem distribuída em todo o Estado do Rio de Janeiro e potencialmente em todo o sudeste do Brasil ou em toda o Região Neotropical, onde sabiás *Turdus* spp. são amplamente distribuídos, como ocorre com outros *Isospora* spp. de Passeriformes.

As diferenças morfométricas dos oocistos de *I. massardi* observadas entre *T. flavipes* e os demais *Turdus* spp. do estudo atual e em comparação com a descrição original estavam absolutamente associados ao tamanho, não à forma. Isto é confirmado na equivalência entre as relações L / W e em regressão linear, como verificado pelos altos valores de R<sup>2</sup>, o que demonstra a alta regularidade na proporção da largura em relação ao comprimento dos oocistos (Tabela 3, Figura 8) (Berto et. al 2014). A linha de regressão dos oocistos de *T. Flavipes* está posicionados mais alto e à direita no gráfico. A Figura 8 ilustra claramente seus maiores oocistos, embora a proximidade das linhas de regressão e a sobreposição dos pontos são observados. Assim, conclui-se que, apesar da média significativamente mais alta dos oocistos de *T. flavipes*, alguns deles tiveram medidas equivalentes às de *T. albicollis* e *T. rufiventris*, em suas respectivas faixas inferiores e superiores. Além disso, todas as linhas de regressão apresentaram as mesmas tendências morfométricas, quando se observa que as três linhas de regressão eram muito semelhantes na inclinação acentuada, confirmando que a forma típica dos oocistos é subsférica (Berto et. al 2014). Nesse sentido, os oocistos de *T. flavipes*, embora estatisticamente maiores que os de *T. albicollis* e *T. rufiventris*, também foram identificados como *I. massardi*.

Esses resultados morfométricos do presente trabalho são muito semelhantes aos relatados por Pinho et al. (Pinho et. al 2017) para *Isospora sabiai* Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes & Berto, 2017, que é outra espécie coccidiana relatada de *Turdus* spp. no sudeste do Brasil. Pinho et al. (Pinho et. al 2017) também

observaram oocistos estatisticamente maiores de *T. flavipes* quando comparados aos de *T. albicollis* e *T. rufiventris*. Neste estudo, algumas suposições ecológicas foram sugeridas para justificar essas diferenças, porque, de fato, esses *Turdus* spp., embora habitem o Parque Nacional do Itatiaia, obviamente possuem nichos ecológicos distintos. *Turdus flavipes* é uma espécie especializada porque possui um nicho ecológico, arbóreo e limitado a altitudes de 800 a 1.800m; enquanto *T. albicollis* e *T. rufiventris* são mais generalistas, habitando o sub-bosque e distribuindo amplamente em todo o parque (Maia-Gouvêa et. al 2005; Alves 2017). Esses fatores de segregação ecológica devem estar diretamente envolvidos com as diferenças morfométricas observadas nos oocistos de *Turdus* spp., O que sugere um processo contínuo de especiação. Em outras palavras, o isolamento parcial de *T. flavipes*, que desfavorece a transmissão de seus coccídios a outros *Turdus* spp., deve favorecer o processo de especiação na co-evolução do parasita hospedeiro (Berto and Lopes 2019). Essa mesma observação foi feita por Gardner & Duszynski (Gardner and Duszynski 1990) para *Eimeria opimi* Lambert, Gardner, Duszynski, 1988, de roedores *Ctenomys* spp. na Bolívia; onde foram observados padrões morfométricos distintos para cada *Ctenomys* sp., com áreas geográficas sobrepostas, mas com nichos ecológicos distintos.

A análise filogenética baseada nas sequências COI1 e COI2 (Figuras. 10, 11) revelou a monofilia de *Isospora massardi* com *Isospora* spp. relatados a partir de passeriformes que não são da família Turdidae; em contraste, algumas dessas sequências são de *Isospora* spp. relatados de passeriformes do Parque Nacional do Itatiaia, como: *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro & Lopes, 2005 e *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Silva-Carvalho et. al 2018; Rodrigues et. al 2019). Nesse sentido, a proximidade genotípica desses *Isospora* spp. poderia ser explicado pela mesma localização geográfica localidade; no entanto, outros *Isospora* spp. nessa mesma monofilia foram relatados em outros continentes, como: *Isospora anthochaerae* Yang, Brice & Ryan, 2014, descritos a partir de aves acácias vermelhas *Anthochaera carunculata* (White, 1790) na Austrália (Yang et. al 2019). Portanto, as monofilias observadas no cladograma não podem ser associadas à localidade geográfica ou à co-evolução do parasita hospedeiro. Embora a análise filogenética não tenha posicionado *I. massardi* e *Isospora* spp. de Turdidae no mesmo clado, as sequências COI1 e COI2 de *I. massardi* de *T. flavipes* apresentaram as maiores semelhanças de 98% com *Isospora* spp. de *Turdus philomelos* e *Turdus merula*, enfatizando que existe uma proximidade evolutiva entre *Isospora* spp. de *Turdus* spp. Além disso, vale ressaltar que os iniciadores para o sequenciamento de COI1 e

COI2, apesar de amplificarem diferentes números de nucleotídeos e não exatamente a mesma região, geraram resultados equivalentes em suas análises moleculares. A análise filogenética baseada no gene 18S é amplamente reconhecida como adequada para resolver relações filogenéticas profundas nos Apicomplexas (Ogedengbe et. al 2015; Xavier et. al 2018). No entanto, este gene excessivamente conservado não é adequado para diferenciações inter e intra-específicas. Essas afirmações podem ser observadas na análise filogenética da Figura 11, onde um grupo monofilético é observado com vários *Isoospora* spp. de aves com 100% de semelhança entre si, incluindo *I. massardi*. Da mesma forma, os outros grupos monofiléticos reúnem outros gêneros coccidianos associados aos seus grupos hospedeiros. Finalmente, a diferença genotípica de 3%, ou a substituição de 8 nucleotídeos, observada nas sequências COI1 dos oocistos de *T. flavipes* e *T. albicollis* deve estar relacionado com as diferenças morfométricas observadas no tamanho desses oocistos e, como discutido anteriormente, deve ser consequência de um processo de adaptação às espécies hospedeiras (especiação). De qualquer forma, essas diferenças morfométricas e genotípicas não foram consideradas suficientes para descrever uma nova espécie coccidiana de *T. flavipes*, talvez apenas genótipos \ mopotipos de *I. massardi* de cada hospedeiro. Portanto, *I. massardi* é identificado morfologicamente e molecularmente neste trabalho, registrando um novo hospedeiro, *T. flavipes*, além de *T. rufiventris* e o hospedeiro tipo *T. albicollis* e um novo local, o Parque Nacional Itatiaia.

Coccídeo	Hospedeiro	Referências	Oocistos							Esporocistos						
			Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	L/W ratio	Parede	Micropila	Granulo polar	Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	L/W razão	Corpo de Stieda	Corpo de Substieda	Resíduo
<i>Isospora phaeornis</i>	<i>Myadestes obscurus</i> (Gmelin, 1789)	Levine et al. (1980)	elipsoidal	25–28 (27)	18–20 (19)	–	Lisa	ausente	presente	ovoidal	15–18 (16)	10–11 (11)	–	presente	presente	compacto
<i>Isospora robini</i>	<i>Turdus migratorius</i> Linnaeus, 1766	McQuiston & Holmes (1988)	elipsoidal or ovoid	20–28 (23)	16–22 (20)	(1.2)	Lisa	ausente	presente	ovóide	10–17 (13.8)	7–12 (9.0)	(1.5)	mamilo	proeminente	compacto
<i>Isospora tucuruensis</i>	<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	Lainson & Shaw (1989)	subesférico	15–19 (17.3)	14–19 (17.1)	–	Lisa	ausente	presente, único, ~ 3 × 2	elipsoidal	10–13 (11.8)	7–10 (8.4)	–	mamilo	Largo, 0.5 × 1.5	difuso ou compacto
<i>Isospora albicollis</i>	<i>T. albicollis</i>	Lainson & Shaw (1989)	ovoidal	22–27 (24.5)	19–24 (20.3)	–	Lisa	ausente	presente, único, ~ 2.5 × 2	elipsoidal	12–15 (16.0)	8–10 (11.2)	–	Mamilo para forma de bolha	Largo, 1.0 × 4	difuso ou compacto
<i>I. albicollis</i>	<i>T. albicollis</i> ; <i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	Pinho et al. (2017a)	ovoidal	23–26 (24.4)	18–22 (19.7)	1.2–1.4 (1.24)	Lisa	ausente	presente, único	elipsoidal	14–17 (15.4)	9–11 (10.1)	1.5–1.6 (1.52)	Forma de botão para arredondado, 1.7 × 1.3	Largo, 1.5 × 3.1	difuso ou compacto
<i>Isospora zorzali</i>	<i>Catharus aurantiirostris</i> (Hartlaub, 1850)	Keeler et al. (2012)	round to slightly ovoidal	16–24 (19.7)	15–21 (18.6)	(1.1)	Lisa	ausente	presente, 1 to 2	ovoidal	11–18 (14.5)	7–11 (8.5)	(1.7)	mamilo	ausente	difuso ou compacto

**Tabela 2.** Morfologia comparada de *Isospora* spp. registrado em Turdidae do Novo Mundo.

Hospedeiro	n <sup>I</sup>	Oocistos			Regressão Linear		Esporocisto comprimen (µm)
		Comprimento (µm)	Largur a (µm)	Forma índice <sup>II</sup>	R <sup>2III</sup>	Equação (y =) <sup>IV</sup>	
<i>Turdus albicollis</i>	53	19.5 (17-22) <sup>a</sup>	18.4 (16- 21) <sup>a</sup>	1.06 (1.0-1.2) <sup>a</sup>	0.59	0.6925x + 4.8618	14.4 (12-17) <sup>a</sup>
<i>Turdus flavipes</i>	50	22.7 (20-26) <sup>b</sup>	21.0 (19- 23) <sup>b</sup>	1.08 (1.0-1.2) <sup>a</sup>	0.56	0.6973x + 5.2157	16.8 (14-19) <sup>b</sup>
<i>Turdus rufiventris</i>	68	19.7 (16-23) <sup>a</sup>	18.4 (16- 21) <sup>a</sup>	1.07 (1.0-1.2) <sup>a</sup>	0.51	0.6143x + 6.3148	15.0 (12-17) <sup>c</sup>

**Tabela 3.** Morfometria de oocistos de *Isoospora massardi* recuperados de *Turdus* spp. do sudeste do Brasil  
a Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (P <0,01) pela ANOVA

I Número total de oocistos medidos.

II relação comprimento / largura.

III coeficiente de determinação.

IV Coeficiente da linha de regressão.

#### 4.2.6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos à equipe do Parque Nacional do Itatiaia, principalmente ao coordenador de pesquisa Dr. Léo Nascimento; e a Marinha do Brasil, em especial ao comando do CADIM (Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia); isso nos permitiu acessar e usar algumas instalações durante as expedições.

## 5. REFERÊNCIAS

ALVES, M.A.S. Sistemas de migrações de aves em ambientes terrestres no Brasil: Exemplos, lacunas e propostas para o avanço do conhecimento. **Revista Brasileira Ornitologia**, v. 15, p 231–238, 2007

AYRES, M.; AYRES, M.; AYRES, JR. D. L.; SANTOS, A. A. S, BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas, Mamirauá, Belém, 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.

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, n. 3, p. 726-727, 2005.

BARTA, J. R. et al. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 262-271, 1997.

BARTA, J. R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Veterinary Parasitology** v. 101, p. 175 e 186, 2001.

BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. ELSEVIER, **TRENDS in Parasitology**, v. 22, no.9, 2006

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

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

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, 2009a

BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. New isosporoid coccidian parasites of sayaca tanager, *Thraupis sayaca*, from South America. **Acta Protozoologica**, v. 54, p. 90–94, 2009b.

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, 2009c



BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: RUIZ, L.; IGLESIAS, F. Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease. New York: **Nova Science Publishers**. 2013.

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, 2014.

BERTO, B. B.; LOPES, C. W. G., Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **Jornal Parasitology**. in press, 2019.

BirdLife International. The IUCN Red List of Threatened Species, 2019. <http://www.iucnredlist.org/> (accessed 13.09.19).

BOX, E. D. Life Cycles of Two *Isospora* Species in the Canary, *Serinus canarius* Linnaeus. **Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 57-67, 1977.

DEVIRAN, Z.; GOZEL, U.; SOGUT, M.; YILDIZ, F. AND ELEKCIOGLU I. Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using r DNA and mt DNA Markers. **Turk J. Agric. For.** v. 26, p. 337-341, 2002.

DOLNIK, O. V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Jornal Parasitology**. V. 95, p. 169–174, 2009.

DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L.; UPTON, S. The Coccidia of the World. Disponível em <<http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>>. Acesso em: 4 fev. 2018, 2004.

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

DUSZYNSKI, D.W. & COUCH, L. The biology and identification of the coccidian (Apicomplexa) of rabbits of the world. **Academic Press. Elsevier**. Inc., p 185.

FAYER, R. Epidemiology of Protozoan infections: The Coccidia. **Veterinary Parasitology**. v. 6, p. 75–103, 1980.

FECCHIO, A. Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (Haemoproteus e Plasmodium) em aves do Cerrado do Brasil Central, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. v. 220, p. 2013, 1998

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

GARDNER, S.L.; DUSZYNSKI, D.W. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. **Jornal of Parasitology**. v. 6, p. 805–811, 1990.

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

GRESSLER, E., PIZO, M. A., & MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**. V. 29, p. 509-530, 2006.

GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D., *Les Isospora du moineau domestique: multiplicite des especes. Annatomy Parasitologic Human Compared* v.57, p. 209 e 235, 1982.

ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia, 2019. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia> (accessed 13.09.19).

LAINSON, R. Observations on some avian coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 303-311, 1994.

Levine, N. D., 1982. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). **Jornal of Parasitology**, v. 68, p. 719 e 723, 1982.

LEVINE, N. D. The protozoan phylum Apicomplexa, Vols. I and II. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 203 e 154. 1988.

LEVINE, N. D. Levine Phylum II. Apicomplexa Levine 1970 J.J Lee, S.H Hutner, E.C Bovee (Eds.), *An Illustrated Guide to the Protozoa*, Allen Press, Lawrence. KS. p. 322-374. 1985.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **Jornal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58. 1980.

LOPES, B. B.; BERTO, B. P.; MASSAD, F. V. et al. *Isospora vanriperorum* Levine 1982 (Apicomplexa: eimeriidae) in the green-winger *Saltator*, *Saltator similis* (Passeriformes: carinalidae) in the southeastern Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 16, p.211-214, 2007.

LOPES, B. et al. 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, 2013.

LOPES, B. et al. *Isospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the whitenecked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. **Acta Parasitologica**. v. 59, n. 2, p. 272–275. 2014.

MCALLISTER, C.T.; HNIDA, J.A. A new eimerian (Apicomplexa: Eimeriidae) from the barn swallow, *Hirundo rustica* (Aves: Passeriformes: Hirundinidae), in southeastern Oklahoma: The fourth eimerian species from New World Passeriformes. **Jornal of Parasitology**. v. 105, p. 693–696. 2019.

MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATRIB, M.; SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J.; WALLACH, M. G.; BELLI, S. I.; FERGUSON, D. J. P.; SMITH, C. S. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, 2009.

MASSEY, J. G. Diseases and medical management of wild Passeriformes. *Seminars in Avian and Exotic. Pet Medicine*, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2003.

MORRISON, D. A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? **Trends Parasitol.** v. 25, p. 375–382, 2009.

MORRISON, D. A.; BORNSTEIN, S.; THEBO, P.; WERNERY, U.; KINNE, J.; MATTSSON, J. G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). **International Journal Parasitology**. V. 34, p. 501–514, 2004.

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.

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

RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. **Plos One**. v. 10, e0130114, 2015.

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

OGEDENGBE, M. E.; QVARNSTROM, Y.; SILVA, A. J.; ARROWOOD, M. J.; BARTA, J. R. A linear mitochondrial genome of *Cyclospora cayetanensis* (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) suggests the ancestral start position within mitochondrial genomes of eimeriid coccidia. **International Journal Parasitology**. v. 45, p. 361–365, 2015.

OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, J. L. G.; RODRIGUES, M. B.; SILVA-CARVALHO, L. M.; ANDRADE, L. A. S.; Cardozo, S. V.; Berto, B. P. *Isospora brasilsatoae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. **Zootaxa**. v. 4555, p. 433–440, 2019.

OLIVEIRA, P. S. D.; FERREIRA, M. A.; SILVA, L. M. D.; RODRIGUES, M. B.; CARDOZO, S. V.; BERTO, B. P. Diversity and distribution of coccidia of wild birds in an Atlantic forest fragment area in southeastern Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 26, p. 457–464, 2017.

GREINER, E. C. *Isospora*, *Atoxoplasma*, and *Sarcocystis*. In ATKINSON, C.T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: **Wiley-Blackwell**. Cap.5, p.108-118, 2008.

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

PIACENTINI, V. D. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, 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. **Revista Brasileira de Ornitologia**. v. 23, p. 91–298, 2015.

PINHO, I. F.; RODRIGUES, M. B.; SILVA, L. M.; LOPES, B. B.; OLIVEIRA, M. S.; FERREIRA, M. A.; BERTO, B. P. Characterization and distribution of *Isospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. **Jornal Parasitology** v. 103, p. 285–292, 2017.

PRICHARD, R.; TAIT, A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 169-194, 2001.

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

SAMPAIOM I. B. M. estatística aplicada à experimentação animal, FEP MVZ Editora, Belo Horizonte, 2002.

SICK, H.; Ornitologia Brasileira: Uma Introdução; Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G.; RODRIGUES, M. B.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; OLIVEIRA, J. L. G.; SOARES, S. S.; OLIVEIRA, Á. 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, 2018.

SMITH, K. F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A. B. The role of infectious diseases in biological conservation; **Animal Conservation**. v. 12, p. 1-12. 2009.

SOGIN AND SILBERMAN; SOGIN, M.L.; SILBERMAN, J.D. Evolution of the Protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics

**International Journal Parasitology**. v.28, p. 11-20, 1998.

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.

TENTER, A. M.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, R. C. A.; CONRAD, P A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal Parasitology**. v. 32, p. 595–616, 2002.

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

XAVIER, R.; SANTOS, J. L.; VERISSIMO, A. Phylogenetic evidence for an ancestral coevolution between a major clade of coccidian parasites and elasmobranch hosts. **Systematic Parasitology** v. 95, p. 367–371, 2018.

YABSLEY, M. J. *Eimeria*. In. ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER,

D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: **Wiley-Blackwell**. Cap.8, p. 162-180. 2008.

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

YANG, R; BRICE, B.; ELLIOT, A.; RYAN, U. *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: 396 Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: 397 Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology** 159 (2015) 59–66.

WISER, M. F.; Apicomplexa. 2000. Disponível em: <<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>.> Acesso em: 09 de maio de 2017.

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