

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

TESE

**Caracterização morfológica e molecular de *Plasmodium*
spp. (Apicomplexa, Haemosporida) em aves de fragmentos
da Mata Atlântica**

Raquel Cristina Tostes

2017



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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
PLASMODIUM SPP. (APICOMPLEXA, HAEMOSPORIDA) EM AVES
DE FRAGMENTOS DA MATA ATLÂNTICA**

RAQUEL CRISTINA TOSTES

Sob a Orientação do Professor

Carlos Luiz Massard

e Co-orientação da Professora

Marta Tavares D'Agosto

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

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

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

T716c Tostes, Raquel Cristina, 1985-
Caracterização morfológica e molecular de Plasmodium spp. (Apicomplexa, Haemosporida) em aves de fragmentos da Mata Atlântica / Raquel Cristina Tostes. - 2017.
102 f. : il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.
Coorientadora: Marta D'Agosto.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2017.

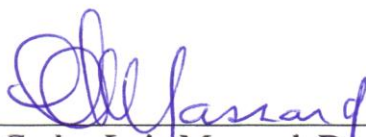
1. Plasmodium spp.. 2. Malária Aviária. 3. Taxonomia Integrativa. 4. Mata Atlântica. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-, orient. II. D'Agosto, Marta, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

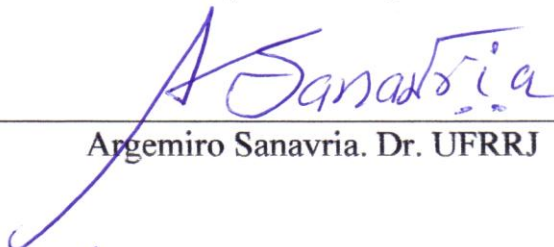
RAQUEL CRISTINA TOSTES

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

TESE APROVADA EM 21/02/2017



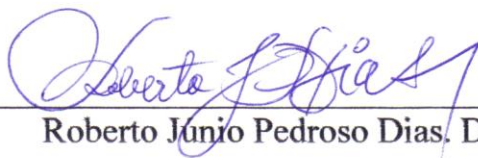
Carlos Luiz Massard. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Argemiro Sanavria. Dr. UFRRJ



Isabel Martinele. Dr. UFJF



Roberto Júnio Pedroso Dias. Dr. UFJF



Teresa Cristina Bergamo do Bonfim. Dr. UFRRJ

*Dedico este trabalho à minha família,
ao meu filho, Guilherme, meu marido
Marcos e aos meus pais, João e
Edna, que sempre me incentivaram
durante toda minha vida acadêmica e
nunca pouparam esforços para que
eu concluísse mais essa etapa em
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, em primeiro lugar, pois sem Ele nada disso seria possível.

Ao meu filho *Guilherme Scheffer Tostes Vieira*, que nasceu durante meu doutoramento, e me trouxe tanta felicidade e amor em pequenas coisas, que eu nem sabia que existiam.

Ao meu amigo, meu amor, meu marido, *Marcos Vieira Júnior*, por tudo, pela construção da nossa nova família, por me apoiar nos momentos difíceis, quando eu quis desistir, e só ele sabe o quanto eu quis desistir, e por compartilhar os momentos felizes ao meu lado.

Aos meus queridos pais, *Edna Ely Scheffer Tostes* e *João Henrique Tostes*, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão *João Henrique Tostes Júnior*, pela paciência.

Ao professor *Carlos Luiz Massard*, pela cocompressão, confiança, oportunidade, paciência, motivação e ensinamentos, que somaram muito em minha vida acadêmica.

À professora *Marta D'Agosto*, pela confiança, sabedoria que me foi passada durante toda minha vida acadêmica, e por sempre acreditar em meu potencial, dando apoio e incentivo.

Ao professor *Roberto Dias*, pela paciência, imensa ajuda durante todo meu doutoramento e incentivo desde a iniciação científica.

Ao Dr. *Marcus Senra*, pela ajuda com as análises filogenéticas e imensa contribuição nos trabalhos durante todo meu doutoramento.

À Dra. *Isabel Martinele*, pela contribuição nos trabalhos durante meu doutoramento.

A todos os *amigos do Laboratório de Protozoologia* (UFJF), da *Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz* (UFRRJ) e do *Laboratório de Artrópodes Parasitos* (UFJF), por tudo, pela amizade, colaboração nas coletas e análises, apoio, conversas, risos e momentos de descontração.

À amiga *Larissa Amorim*, pela imensa ajuda nas coletas realizadas no IBAMA de Seropédica.

À *Carlota Oliveira*, pelo auxílio na confecção do mapa de distribuição da espécie *Plasmodium nucleophilum*.

Ao CPGCV, pela oportunidade de cursar esta pós-graduação, ao coordenador, professor *José Luis Fernando Luque Alejos* e ao secretário *Arthur Santiago Júnior*, pela competência e por atenderem sempre às demandas dos alunos.

A todos do CETAS (IBAMA) de Seropédica, principalmente ao Médico Veterinário *Daniel Marchesi Neves*, pela confiança no trabalho e apoio nas coletas.

À CAPES, pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto Progra. Parasitologia Básica.

A todos os amigos que passaram pela minha vida durante esse momento e deixaram boas lembranças.

BIOGRAFIA

Raquel Cristina Tostes, filha de João Henrique Tostes e Edna Ely Scheffer Tostes, nasceu no Município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, em 02 de maio de 1985.

Em 1992, ingressou na Escola Municipal Machado de Assis, em Humaitá, zona rural de Juiz de Fora, onde concluiu o ensino infantil. No ano de 1996 ingressou na Escola Municipal Adhemar Rezende de Andrade, onde concluiu o ensino fundamental e no ano de 2000 ingressou na Escola Estadual Delfim Moreira, onde concluiu o ensino médio até o ano de 2003, ambas as escolas em Juiz de Fora.

No ano de 2006, ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, onde diplomou-se Licenciada em Ciências Biológicas. Durante sua vida universitária, foi bolsista de Iniciação Científica, sob orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto.

Em 2011, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, nível de Mestrado, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação do da Professora Doutora Marta D'Agosto, sendo bolsista pela FAPEMIG. Obteve o título de Mestre em Ciências Biológicas no ano de 2013.

Ainda no ano de 2013, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, sob orientação do Professor Doutor Carlos Luiz Massard e coorientação da Professora Doutora Marta D'Agosto, sendo bolsista pela CAPES.

RESUMO

TOSTES, Raquel Cristina. **Caracterização morfológica e molecular de *Plasmodium* spp. (Apicomplexa, Haemosporida) em aves de fragmentos da Mata Atlântica.** 2017. 102p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Plasmodium spp. são protozoários hemosporídeos causadores da malária aviária que alternam seu ciclo de vida entre mosquitos hematófagos da família Culicidae e hospedeiros vertebrados. Esses parasitos tem sido registrados em aves do mundo todo, entretanto, no Brasil, apesar da grande diversidade de avifauna e de vetores, poucos estudos ainda são realizados com hemosporídeos em espécies da Mata Atlântica. Neste estudo, amostras de sangue de 90 aves de quatro espécies do gênero *Turdus* coletadas em fragmentos da Mata Atlântica de Minas Gerais e de 80 aves de 15 espécies mantidas em cativeiro no sudeste do Brasil foram analisadas para a presença de *Plasmodium* spp. por análises microscópicas e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase *b* (*cyt b*). No total, 58 aves do gênero *Turdus* foram positivamente infectadas com *Plasmodium unalis*, identificada com base em ambos os métodos, morfológico e molecular, sendo registrados quatro novos hospedeiros para esse parasito. A descrição desse hemosporídeo foi ampliada e algumas características diferiram da descrição original. Sete novas linhagens de *P. unalis* do gene citocromo *b* foram adicionadas a bancos de dados. As linhagens TLJB34 e TLSB1096 agruparam-se em um clado separado juntamente com sequências de *Plasmodium* spp., sendo mais distantes em relação as outras obtidas no presente estudo, apresentando 3% de divergência genética. Quanto às aves mantidas em cativeiro, dentre as 61 amostradas, em nove foi encontrada a espécie *Plasmodium paranucleophilum* (prevalência de 14,75% e parasitemia média de 0,58%), sendo as descrições morfológica e morfométrica desse parasito ampliadas. E dentre as 19 aves do gênero *Ramphastos* amostradas, em cinco foi identificada a espécie *Plasmodium nucleophilum* (prevalência de 26,31% e parasitemia média de 0,04%). Nas análises filogenéticas, as duas espécies formaram clados separados com alto valor de suporte, sendo que a divergência genética média de *P. paranucleophilum* em relação à *P. nucleophilum* foi de 2,48%. A revisão de literatura e os dados do presente estudo demonstraram que a espécie *P. nucleophilum* possui maior número de registros no continente americano e parece apresentar baixa especificidade quanto aos hospedeiros. Este estudo contribui com novos dados morfológicos e moleculares acerca dos hemosporídeos de aves do Brasil, confirma a importância da taxonomia integrativa e o uso de abordagens moleculares e morfológicas combinadas para identificar e caracterizar espécies de hemosporídeos aviários e ainda destaca a necessidade de ampliação de estudos no país, uma vez que, a verdadeira diversidade de hemosporídeos aviários ainda é pouco conhecida e dada à enorme diversidade de vetores e espécies de aves brasileiras, pode haver grande número de espécies desses hemoparasitos ainda não descritas.

Palavras-chave: *Plasmodium* spp., Haemosporida, Aves neotropicais, Mata Atlântica, Taxonomia integrativa.

ABSTRACT

TOSTES, Raquel Cristina. **Morphological and molecular characterization of *Plasmodium* spp. (Apicomplexa, Haemosporida) in birds of fragments of the Atlantic Forest.** 2017. 102p. Thesis (Doctor in Sciences) Instituto de Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Plasmodium spp. are haemosporidian protozoa that cause avian malaria. These parasites alternate between dipteran bloodsucking of Culicidae family and vertebrate hosts in their life cycle and have been recorded in birds in many parts of the world. In Brazil, despite the great diversity of birds and vectors species, few studies are conducted with haemosporidian in the Atlantic Forest region. In this study, blood samples from 90 birds of four species of *Turdus* genus, collected in Atlantic Forest fragments of Minas Gerais and 80 birds of 15 species kept in captivity in southeastern Brazil were analyzed for the presence of *Plasmodium* spp. by microscopic analysis and sequencing of the mitochondrial gene cytochrome oxidase *b* (*cyt b*). In total, 58 birds of genus *Turdus* were positively infected with *Plasmodium unalis*, identified based on both methods, morphological and molecular, being recorded four new hosts for this parasite. The description of this haemosporidian was expanded and some features differ from the original description. Seven new lineages of *P. unalis* were added to databases. The TLJB34 and TLSB1096 lineages grouped in a separate clade with sequences of *Plasmodium* spp., being more distant in relation to the other obtained in the present study, with 3% of genetic divergence. Regarding the birds kept in captivity, among the 61 sampled, in nine were found the species *Plasmodium paranucleophilum* (prevalence 14.75% and mean parasitemia 0.58%), and the morphological and morphometric descriptions of this parasite were extended. And among the 19 birds of the genus *Ramphastos* sampled, in five was identified the species *Plasmodium nucleophilum* (prevalence 26.31% and mean parasitemia 0.04%). In phylogenetic analyzes, the two species formed separate clades with high support value, and the mean genetic divergence of *P. paranucleophilum* regarding *P. nucleophilum* was 2.48%. The literature review and the results of this study showed that *P. nucleophilum* species have a higher number of records in the Americas and appear to have low specificity as the hosts. This study provides new morphological and molecular data on birds haemosporidian of Brazil, confirms the importance of integrative taxonomy and the use of molecular and morphological approaches combined to identify and characterize species of avian haemosporidian and also emphasizes the need to expand studies in country, since the true diversity of haemosporidian aviaries is still little known and given the enormous diversity of vectors and species of Brazilian birds, there may be many species of these blood parasites not described yet.

Keywords: *Plasmodium* spp., Haemosporida, Neotropical birds, Atlantic forest, Integrative taxonomy.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Lista de subgêneros, espécies de *Plasmodium*, principais características de diagnóstico observadas no sangue periférico e hospedeiro em que foi descrita. 9

CAPÍTULO I

Tabela 1. Distribuição geográfica de *Turdus albicollis*, *Turdus flavipes*, *Turdus leucomelas* e *Turdus rufiventris* amostrados em fragmentos da Mata Atlântica do sudeste do Brasil e prevalência de *Plasmodium unalis* baseada na PCR e microscopia. 28

Tabela 2. Morfometria comparativa dos eritrócitos dos hospedeiros, merontes eritrocíticos e gametócitos de *Plasmodium unalis* de esfregaços sanguíneos de *Turdus rufiventris* e *Turdus fuscater* (MANTILLA et al., 2013b). 29

Tabela 3. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citovromo *b* entre *Plasmodium unalis* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. As divergências genéticas estão dadas em porcentagem. 36

CAPÍTULO II

Tabela 1. Aves amostradas na sede do IBAMA de Seropédica, Rio de Janeiro, número de aves examinadas e número de aves parasitadas por *Plasmodium paranucleophilum* baseado na PCR e microscopia. 49

Tabela 2. Morfometria completa de formas eritrocíticas de *Plasmodium paranucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Rupornis magnirostris* da Mata Atlântica do sudeste brasileiro mantidas em cativeiro. 50

Tabela 3. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citovromo *b* entre *Plasmodium paranucleophilum*, *Plasmodium nucleophilum* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. As divergências genéticas estão dadas em porcentagem. 56

CAPÍTULO III

Tabela 1. Revisão sobre registros de hospedeiros e regiões de ocorrência de *Plasmodium nucleophilum*. 68

Tabela 2. Divergências genéticas entre *Plasmodium nucleophilum*, *Plasmodium paranucleophilum* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. Todos os valores estão apresentados em porcentagem. 74

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*. Parte superior, no vetor; parte inferior, na ave: I, II - merogonia exo-eritrocítica primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 - esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoito em macrófago; 5, 6 - metacriptozoito; 7 - merozoítos no eritrócito; 8 - gametócitos; 9 - merozoito no eritrócito; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoito em célula endotelial de capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogameta; 18 - exflagelação de microgametas; 19 - fertilização de macrogameta; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos penetrando na glândula salivar do vetor (desenho retirado de VALKIŪNAS, 2005). 5

CAPÍTULO I

Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium unalis* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Turdus rufiventris* de fragmentos da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Trofozoítos (a-e); merontes (f-k); macrogametócitos (l-p) e microgametócitos (q-t). Setas pretas pequenas indicam o núcleo dos parasitos; setas pretas grandes indicam os vacúolos dos parasitos; setas brancas indicam grânulos refrativos claros; e cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína. Barras = 5 µm. 31

Figura 2. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos cladogramas (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos. 34

Figura 3. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de algumas espécies identificadas de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos cladogramas (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos. 35

Figura 4. Formas eritrocíticas de *Plasmodium lutzi* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Turdus leucomelas* de fragmentos da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Trofozoítos (a, b); merontes (c-k); macrogametócitos (l-p). Setas pretas pequenas indicam o núcleo dos parasitos; setas pretas grandes indicam os vacúolos dos parasitos; e cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína. Barras = 5 µm. 37

CAPÍTULO II

Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium paranucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Rupornis magnirostris* da Mata Atlântica do sudeste brasileiro mantidas em cativeiro. Trofozoito em um trombócito (a); linfócito com fanerozoítos (b-c); trofozoítos (d-g); merontes (g-l); gametócitos jovens (m-n); macrogametócitos (o-s, y); e microgametócitos (t-y). Setas brancas pequenas indicam trofozoítos; cabeças de seta brancas indicam fanerozoítos; setas brancas grandes indicam vacúolos dos parasitos; setas pequenas pretas indicam prolongamentos do citoplasma; cabeças de setas pretas indicam grânulos de hemozoína; e setas pretas grandes indicam núcleo dos parasitos. Barras = 5 µm. 52

Figura 2. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos cladogramas (ML /

BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos. 55

CAPÍTULO III

Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium nucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Ramphastos toco* do sudeste brasileiro mantidos em cativeiro. Merontes (a–c) e macrogametócitos (d–f). Cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína e setas indicam núcleo do parasito. Barras = 5µm. 67

Figura 2. Distribuição da espécie *Plasmodium nucleophilum* no mundo, de acordo com a revisão realizada no presente estudo. Legenda: bola preta representa pontos de amostragem de *Plasmodium nucleophilum*; estrela vermelha: representa pontos de amostragem da subespécie *Plasmodium nucleophilum toucani*. 68

Figura 3. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (cyt *b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos clados (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos. 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Caracterização geral da malária aviária	3
2.2 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.	4
2.3 Estudos sobre <i>Plasmodium</i> spp. no Brasil	5
2.3.1 Estudos sobre <i>Plasmodium</i> spp. em aves silvestres da Mata Atlântica	6
2.3.2 Estudos sobre <i>Plasmodium</i> spp. em aves da Mata Atlântica mantidas em cativeiro	7
2.3.3 Estudos sobre <i>Plasmodium</i> spp. em aves silvestres de outros biomas brasileiros	8
2.4 Identificação de <i>Plasmodium</i> spp.	9
2.4.1 Identificação por esfregaços sanguíneos	9
2.4.1 Identificação por marcadores moleculares	18
CAPÍTULO I	
3 FILOGENIA MOLECULAR E MORFOLOGIA DE UMA LINHAGEM BRASILEIRA DE <i>Plasmodium (Novyella) unalis</i> Mantilla et al., 2013, COM NOTAS SOBRE NOVOS HOSPEDEIROS E VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>Turdus</i> spp. (PASSERIFORMES) DE FRAGMENTOS DA MATA ATLÂNTICA	20
3.1 INTRODUÇÃO	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue	25
3.2.2 Análises morfológicas e morfométricas	25
3.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento	25
3.2.4 Análises filogenéticas	26
3.3 RESULTADOS	28
3.3.1 Prevalência e intensidade de infecção	28
3.3.2 Caracterização morfológica e morfométrica de <i>Plasmodium (Novyella) unalis</i>	28
3.3.3 Reconstruções filogenéticas	32
3.3.4 Observações	38
3.3.5 Sumário taxonômico	38
3.4 DISCUSSÃO	39
3.5 CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO II	
4 REDESCRIBÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE <i>Plasmodium (Novyella) paranucleophilum</i> Manwell & Sessler, 1971 EM AVES DA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE BRASILEIRO MANTIDAS EM CATIVEIRO	42
4.1 INTRODUÇÃO	45
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue	46
4.2.2 Análises morfológicas e morfométricas	46
4.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento	46
4.2.4 Análises filogenéticas	47
4.3 RESULTADOS	49
4.3.1 Prevalência e intensidade de infecção	49
4.3.2 Redescrção de <i>Plasmodium (Novyella) paranucleophilum</i>	49
4.3.3 Observações	54
4.3.4 Reconstruções filogenéticas	54
4.3.5 Sumário taxonômico	57

4.4 DISCUSSÃO	58
4.5 CONCLUSÕES	60

CAPÍTULO III

5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE <i>Plasmodium (Novyella) nucleophilum</i> Manwell, 1935 EM <i>Ramphastos</i> spp. (PICIFORMES) DA MATA ATLÂNTICA MANTIDOS EM CATIVEIRO, E NOTAS SOBRE DISTRIBUIÇÃO E ESPECIFICIDADE PARASITÁRIA	61
5.1 INTRODUÇÃO	64
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
5.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue	65
5.2.2 Análises morfológicas e morfométricas	65
5.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento	65
5.2.4 Análises filogenéticas	66
5.3 RESULTADOS	67
5.3.1 Identificação da espécie <i>Plasmodium nucleophilum</i>	67
5.3.2 Prevalência e intensidade de infecção	67
5.3.3 Distribuição geográfica e espécies de hospedeiros	67
5.3.4 Reconstruções filogenéticas	71
5.3.5 Sumário taxonômico	75
5.4 DISCUSSÃO	76
5.5 CONCLUSÕES	78
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ANEXOS

A – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) DA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF)	95
B – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 29266-3	96
C – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	99
D – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 39534-2	100

1 INTRODUÇÃO GERAL

Entre os hemoparasitos encontrados em aves silvestres estão os hemosporídeos (filo Apicomplexa, ordem Haemosporida), onde o gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 é um dos mais prevalentes (VALKIŪNAS, 2005). Esses hemoparasitos tem ciclos de vida heteroxenos, alternando entre um hospedeiro vertebrado (mamíferos, répteis ou aves) e um (vetor) invertebrado, dípteros hematófagos da família Culicidae (VALKIŪNAS, 2005; PERKINS, 2014). Esses hemosporídeos tem ampla distribuição geográfica, assim como seus vetores, sendo descritos em praticamente todo o mundo parasitando várias espécies de aves (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Nesses hospedeiros esses parasitos tem sido descritos como uma potencial causa de extinção e declínio de populações (VAN RIPER III et al., 1986, ATKINSON et al., 1995; 2000, MASSEY et al., 1996), reduzindo o fitness de seus hospedeiros (LEFÈVRE et al., 2008) podendo levar à morte (VANSTREELS et al., 2015). Entretanto, os padrões e as consequências de infecções maláricas permanecem insuficientemente compreendidos em populações de animais silvestres (GLAIZOT et al., 2012; MARZAL, 2012; GARCIA-LONGORIA et al., 2015; MARINOV et al., 2015; VALKIŪNAS et al., 2016).

Aproximadamente 80 morfoespécies de *Plasmodium* foram descritas em aves em muitas partes do mundo (VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2007; 2008a; 2009; 2014; 2016; PAPERNA et al., 2010; ZEHTINDJIEV et al., 2012; CHAGAS et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015). No Brasil, estudos tem investigado a ocorrência de parasitismo por *Plasmodium* spp. em aves silvestres em áreas com diferentes características ecológicas e de conservação (BENNETT & LOPES 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005; FECCHIO et al. 2007; 2011; 2013; BELO et al., 2009; 2011; SEBAIO et al., 2010; 2012; ANDERY et al. 2013; LACORTE et al. 2013; TOSTES et al., 2015a; 2015b; CHAGAS et al. 2015). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade de hemoparasitos de aves na Mata Atlântica do sudeste brasileiro, destacando a importância do presente estudo. Essa floresta é considerada um dos cinco biomas mundiais de importância prioritária para conservação (MYERS et al., 2000) e está entre as quatro regiões mais importantes dos neotrópicos em termos de diversidade de aves ameaçadas (STOTZ et al., 1996), demonstrando que estudos ecológicos, genéticos e evolutivos relacionados à parasitos da avifauna dessa região são muito importantes e podem ajudar na conservação de muitas espécies de aves. CLARK et al. (2014) destacam a importância de estudos com hemosporídeos na América do Sul, já que é a região com a maior diversidade de linhagens descritas para estes hemoparasitos, principalmente do gênero *Plasmodium*. Devido à grande diversidade de espécies de hospedeiros aviários nessa região CLARK et al. (2014) ainda destacam que a América do Sul pode ser a região mais rica do mundo em linhagens de hemosporídeos ainda não descritas, principalmente no Brasil, o que torna ainda mais relevante a realização do presente estudo.

A identificação de hemosporídeos aviários é baseada no exame de esfregaços sanguíneos, onde características morfológicas de formas encontradas durante a fase eritrocítica são observadas (trofozoítos, merontes e gametócitos), sendo também considerados dados de hospedeiros experimentais e especificidade de hospedeiros e vetores (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Adicionalmente, o uso de marcadores moleculares é uma importante técnica para auxílio na identificação de espécies desses hemoparasitos. Estudos recentes com alguns marcadores tem demonstrado que a diversidade de espécies de *Plasmodium* pode ser muito maior do que a diversidade estimada com base na taxonomia tradicional (BENSCH et al., 2000; 2004; PERKINS & SCHALL, 2002; BEADELL et al., 2004; 2006; HELLGREN et al., 2004; MARTINSEN et al., 2008; CLARK et al., 2014; IVANOVA et al., 2015). Entretanto, pouco mais de 20% das linhagens genéticas desses

parasitos tem sido relacionadas com descrições morfológicas, sendo a maioria dessas linhagens identificadas apenas ao nível de gênero (CLARK et al., 2015). Isso demonstra a necessidade de estudos adicionais usando ambas as técnicas, morfológica e molecular, para relacionar descrições morfológicas a sequências de DNA em hemosporídeos aviários, auxiliando assim identificações de espécies com a utilização de um código de barras de DNA (“*barcoding*”) em futuros estudos, pois o conhecimento sobre a diversidade de parasitos hemosporídeos é crucial para uma melhor compreensão da evolução, biologia e epidemiologia dos parasitos, principalmente em animais silvestres (VALKIŪNAS et al., 2016).

Outro problema relacionado aos hemosporídeos aviários é que não está estabelecida uma clara definição de quando uma espécie pode ser distinguida de outra, baseando-se em diferenças morfológicas das formas eritrocíticas e/ou em divergência genética em sequências do citocromo *b* (MANTILLA et al., 2013b). A fim de esclarecer essas dúvidas alguns estudos vem sugerindo o uso de divergências genéticas de linhagens do citocromo *b* para separação de espécies (HELLGREN et al., 2007; OUTLAW & RICKLEFS, 2014; VALKIŪNAS et al., 2009; 2014). Entretanto, a identificação de espécies baseada somente em marcadores genéticos é uma tarefa desafiadora, devido à variação genética em espécies de hemosporídeos. Em alguns casos, a variação intraespecífica pode atingir 2,6% (VALKIŪNAS et al., 2008), enquanto em outros, caracteres morfológicos distintos estão associados à divergência genética interespecífica de aproximadamente 1% (HELLGREN et al., 2007; LEVIN et al., 2012; DIMITROV et al., 2014). Isso demonstra que em estudos com taxonomia de hemosporídeos aviários é necessário melhorar a definição das espécies, integrando teoria e métodos de estudos, destacando a importância da taxonomia integrativa usando várias metodologias para a identificação e caracterização de espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização geral da malária aviária

A malária foi diagnosticada em aves pela primeira vez por Vasily Iakovlevich Danilewsky, em 1885, quando o pesquisador observou o quadro clínico da doença nesses animais, com sintomas como anemia aguda, aumento do fígado e do baço e acumulação de pigmentos nas células sanguíneas, percebendo assim a semelhança com a malária descrita em humanos (VALKIŪNAS, 2005). No início do século XX, a malária aviária tornou-se um importante sistema experimental para estudos dos aspectos da biologia e transmissão de parasitos maláricos e ainda foi fundamental para o desenvolvimento do primeiro antimalárico (BOEHME et al., 2016). Recentemente, a malária aviária voltou a ser foco de pesquisas para entender a ecologia e a evolução de parasitos, tanto em animais silvestres como em laboratório (PIGEAULT et al., 2015). Essa doença é causada por protozoários hemoparasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, do gênero *Plasmodium*. O filo Apicomplexa agrupa protozoários sem organelas locomotoras e que possuem um complexo apical característico, responsável pela penetração dos parasitos nas células hospedeiras (REMPLE, 2004). A ordem Haemosporida pode ser caracterizada por apresentar macrogametócitos e microgametócitos que se desenvolvem independentemente, zigoto móvel (ou oocineto), esporozoítos sem membrana e ciclo biológico heteroxeno, onde a esquizogonia ocorre em um hospedeiro vertebrado e a gametogonia e esporogonia em um vetor invertebrado, artrópodes dípteros hematófagos (REMPLE, 2004). Já as espécies do gênero *Plasmodium* diferenciam-se de outros hemosporídeos por apresentar reprodução assexuada (merogonia) em eritrócitos na circulação sanguínea (ATKINSON et al., 2008). Segundo VALKIŪNAS (2005) e ADL et al. (2012), são classificados taxonomicamente como:

Super grupo: Sar

Reino: Alveolata

Filo: Apicomplexa

Classe: Coccidea

Subclasse: Coccidia

Ordem: Haemosporida

Família: Plasmodiidae

Gênero: *Plasmodium*

Esses parasitos são muito prevalentes, sendo que em algumas populações até 100% das aves podem ser infectadas (SANTOS-PREZOTO et al., 2004). Estudos tem mostrado que em até 80% de populações de aves apresentaram sinais de morbidade devida a infecções por hemosporídeos (VALKIŪNAS, 2005; LARCOMBE et al., 2013), sendo que em algumas espécies de aves a malária é uma infecção grave, podendo levar à morte e causar extinção e declínio populacional (VAN RIPER et al., 1986; ATKINSON et al., 1995; 2000; MASSEY et al., 1996; PALINAUSKAS et al., 2011; DINHOPL et al., 2011; 2015), enquanto que para outras é uma infecção assintomática e raramente fatal (BENNETT et al., 1993a). Outro aspecto que é destacado em alguns estudos é a importância de parasitos do gênero *Plasmodium* como fator de seleção de populações de aves, já que esses hemosporídeos podem influenciar no comportamento das aves, como demonstrar mais comportamentos de risco e uma exploração mais rápida do ambiente, na escolha de parceiros sexuais, no sucesso reprodutivo, na busca por alimentos e na resposta imune dos hospedeiros (HAMILTON & ZUK, 1982; VAN RIPER III et al., 1994; OPPLIGER et al., 1996; KNOWLES et al., 2010; LARCOMBE et al., 2013; GARCIA-LONGORIA et al., 2015; MARINOV et al., 2015; MUKHIN et al., 2016).

2.2 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

Segundo GARNHAM (1966), REMPLÉ (2004) e VALKIŪNAS (2005) o ciclo biológico geral de *Plasmodium* spp. pode ser descrito em três fases distintas, sendo que as fases exoritrocíticas e eritrocíticas ocorrem na ave e a fase esporogônica no mosquito transmissor (Figura 1). De acordo com esses autores a fase exoeritrocítica inicia-se com a inoculação de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares dos mosquitos infectados, da família Culicidae, em aves durante o repasto sanguíneo. A merogonia exoeritrocitária primária consiste em duas gerações de formação de merontes, que são chamados criptozoítos e metacriptozoítos, respectivamente. A merogonia exoeritrocitária secundária inclui várias gerações de merontes, que são chamados de fanerozoítos. Os esporozoítos injetados pelo vetor nas aves dão origem à primeira geração de merontes exoeritrocíticos (criptozoítos). Eles se desenvolvem predominantemente nas células reticulares de muitos órgãos e tecidos, incluindo a pele, diferentemente de plasmódios de mamíferos. Eles ainda não podem infectar as células do sangue. Os merozoítos que se desenvolvem em criptozoítos induzem a segunda geração de merontes exoeritrocíticos primários (metacriptozoítos), que se desenvolvem em macrófagos em muitos órgãos. Os metacriptozoítos são parecidos com os criptozoítos, mas geralmente contem um maior número de merozoítos. Merozoítos formados em metacriptozoítos são capazes de infectar as células da série eritrocitária. Uma parte dos merozoítos desenvolvidos nos metacriptozoítos induz as próximas gerações de metacriptozoítos e fanerozoítos, enquanto outra parte invade os eritrócitos, dando origem a estágios agâmicos e gametócitos, que aparecem simultaneamente no sangue.

Na fase eritrocítica, os merozoítos que penetram em eritrócitos dividem-se assexuadamente por merogonia originando merontes, os quais se rompem liberando outros merozoítos. Ao penetrar em outra célula, reiniciam seu desenvolvimento por meio de sucessivas merogonias ou diferenciam-se em formas que darão origem aos gametas, denominadas gametócitos, os quais poderão ser ingeridos por mosquitos vetores. Após a ingestão dos gametócitos pelos mosquitos hematófagos tem início a fase esporogônica. Os gametócitos se desenvolvem no estômago do mosquito após tornarem-se livres. Os microgametócitos produzem por exflagelação microgametas, que se unem a macrogametas, produzidos a partir dos macrogametócitos, originando um zigoto, o qual se diferencia em uma forma móvel, denominada oocineto. O oocineto ultrapassa a parede estomacal e encista-se na hemocele do mosquito, formando o oocisto esporulado. Por esquizogonia o oocisto produz grande número de esporozoítos e quando maduro se rompe liberando-os na hemocele. Por meio da hemolinfa os parasitos chegam à glândula salivar, onde permanecem até que o mosquito se alimente, inoculando os esporozoítos juntamente com a saliva.

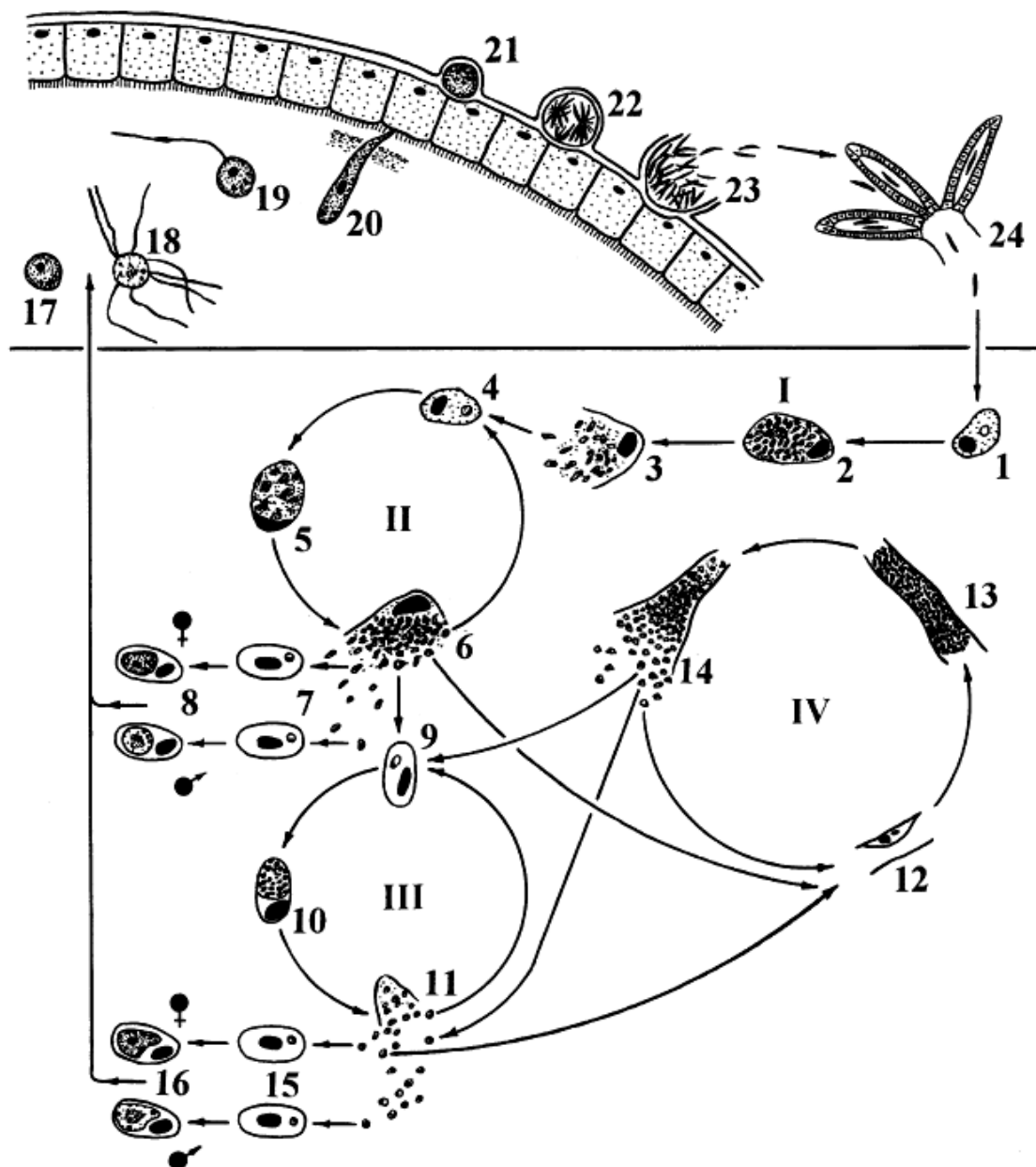


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*. Parte superior, no vetor; parte inferior, na ave: I, II - merogonia exo-eritrocítica primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 - esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoito em macrófago; 5, 6 - metacriptozoíto; 7 - merozoítos no eritrócito; 8 - gametócitos; 9 - merozoíto no eritrócito; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoíto em célula endotelial de capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogameta; 18 - exflagelação de microgametas; 19 - fertilização de macrogameta; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos penetrando na glândula salivar do vetor (esquema retirado de VALKIŪNAS, 2005).

2.3 Estudos sobre *Plasmodium* spp. no Brasil

CLARK et al. (2014) destacam a importância de estudos com hemosporídeos na América do Sul, já que é a região com a maior diversidade de linhagens descritas para estes

hemoparasitos, principalmente do gênero *Plasmodium*. Devido à grande diversidade de espécies de hospedeiros aviários nessa região CLARK et al. (2014) ainda destacam que a América do Sul pode ser a região mais rica do mundo em linhagens de hemosporídeos ainda não descritas, principalmente no Brasil, o que torna ainda mais relevante a realização do presente estudo. O país possui um nível particularmente elevado de diversidade e riqueza de espécies de aves silvestres em comparação com outros. Nas florestas brasileiras, algumas espécies de aves são consideradas prioridade para conservação por causa de seu alto grau de endemismo, ou o seu risco de extinção (BRAGA et al., 2011). Nesses hospedeiros, os padrões e as consequências de infecções maláricas permanecem insuficientemente compreendidos (GLAIZOT et al., 2012; MARZAL, 2012; GARCIA-LONGORIA et al., 2015; MARINOV et al., 2015; VALKIŪNAS et al., 2016), destacando a importância do presente estudo.

No Brasil, vários estudos tem investigado a ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres em áreas com diferentes características ecológicas e de conservação, incluindo aquelas mantidas em cativeiro (BENNETT & LOPES 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005; FECCHIO et al. 2007; 2011; 2013; BELO et al., 2009; 2011; SEBAIO et al., 2010; 2012; ANDERY et al. 2013; LACORTE et al. 2013; TOSTES et al., 2015a; 2015b; CHAGAS et al. 2015; 2017). Muitos estudos foram realizados com aves do Cerrado (FECCHIO et al. 2007; 2011; 2013; BELO et al., 2011) ou outros biomas brasileiros, como a Amazônia (SVENSSON-COELHO et al., 2013), no entanto, apesar de ser uma das regiões mais ricas em espécies de aves, pouco se sabe sobre a diversidade de hemosporídeos de aves na Mata Atlântica do sudeste brasileiro.

2.3.1 Estudos sobre *Plasmodium* spp. em aves silvestres da Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada um dos cinco biomas mundiais de importância prioritária para conservação (MYERS et al., 2000), apresentando um dos mais altos graus de riqueza de espécies e taxas de endemismo do mundo (RIBEIRO et al., 2009), estando entre as quatro regiões mais importantes dos neotrópicos em termos de diversidade de aves ameaçadas (STOTZ et al., 1996), demonstrando que estudos ecológicos, genéticos e evolutivos relacionados à parasitos da avifauna dessa região são muito importantes e podem ajudar na conservação de muitas espécies de aves. Entre os estudos realizados com aves da Mata Atlântica do sudeste brasileiro podemos destacar o de BENNETT & LOPES (1980), onde os autores estudaram 3.449 aves de 195 espécies em três áreas no estado de São Paulo e encontraram prevalência de 1,8% para *Plasmodium* spp. utilizando microscopia; o de WOODWORTH-LYNAS et al. (1989), também utilizando análises microscópicas, onde os autores estudaram 15.574 aves silvestres de 266 espécies também em três áreas do estado de São Paulo e encontraram prevalência de infecção de 7,5% para o gênero *Plasmodium*. SEBAIO et al. (2010), que estudaram a influência do tamanho do fragmento e dependência do hábitat em 925 aves de 109 espécies de aves da Floresta Atlântica e não foram encontradas diferenças na prevalência por hemosporídeos entre os fragmentos, encontrando prevalência para *Plasmodium* spp. de 9,2%. Em outro estudo realizado por RIBEIRO et al. (2005), foi analisada a prevalência de hemoparasitos por PCR em 275 Passeriformes de pequenos e grandes fragmentos da Mata Atlântica em Minas Gerais, correlacionando ainda características biológicas e encontrou-se prevalência total para *Plasmodium* spp. de 39,6%. Aves de fragmentos maiores apresentaram prevalência maior do que aves de fragmentos menores (51,9% e 28,5%, respectivamente). E em aves insetívoras a prevalência foi maior do que em outros grupos, destacando a importância do estudo de características biológicas e comportamentais de aves, que podem estar diretamente relacionadas com a prevalência de parasitos. SEBAIO et al. (2012) avaliaram a prevalência e a intensidade de hemosporídeos de 925 aves da Mata Atlântica no estado de Minas Gerais. Foram encontradas 146 aves

infectadas, e *Plasmodium* spp. foi detectado em todas as famílias de aves estudadas (Muscicapidae, Conopophagidae, Troglodytidae, Dendrocolaptidae, Tyrannidae, Emberizidae, Thamnophilidae, Vireonidae, Furnariidae, Pipridae) e teve a maior prevalência entre os hemoparasitos encontrados (54,8%). LACORTE et al. (2013) utilizaram técnicas moleculares para verificar a diversidade de hemoparasitos em três diferentes habitats do Brasil, entre eles a Mata Atlântica, sendo analisadas 1.545 aves de 194 espécies. Dentre elas, os autores identificaram 89 linhagens de *Plasmodium* spp., 68 somente na região de Mata Atlântica, e a prevalência para *Plasmodium* spp. foi de 84%. CHAGAS et al. (2015) estudaram 124 aves de 12 espécies de fragmentos da Mata Atlântica de São Paulo e encontram apenas quatro aves infectadas por *Plasmodium* spp. (prevalência de 3%).

Na maioria desses trabalhos realizados com aves da Mata Atlântica, não foram identificadas as espécies de *Plasmodium* encontradas, ou usou-se apenas uma técnica de diagnóstico (microscópica ou molecular).

2.3.2 Estudos sobre *Plasmodium* spp. em aves da Mata Atlântica mantidas em cativeiro

Entre os estudos realizados com *Plasmodium* spp. de aves em cativeiro no sudeste brasileiro, podemos destacar o realizado por BELO et al. (2009), onde os autores analisaram a prevalência de malária entre 127 psitacídeos de 21 espécies viventes em zoológicos do Sudeste e do Nordeste e encontraram prevalência de 36% para o gênero *Plasmodium*, utilizando marcadores moleculares do gene SSU rRNA. As espécies que apresentaram maior prevalência foram *Amazona aestiva*, *Ara ararauna* e *Amazona amazonica*. Outro trabalho foi o realizado por ANDERY et al. (2013), onde analisaram 89 aves das ordens Falconiformes, Strigiformes e Cathartiformes mantidas em cativeiro no CETAS (IBAMA) de Belo Horizonte e encontram 12 aves infectadas por *Plasmodium* spp. ou *Haemoproteus* spp. das espécies *Buteo brachyurus*, *Caracara plancus*, *Milvago chimachima*, *Rupornis magnirostris*, *Asio clamator*, e *Asio stygius*. Entretanto, não houve identificação ou caracterização desses parasitos encontrados. TOSTES et al. (2015a) analisaram 119 aves, de 36 espécies mantidas em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA) de Juiz de Fora e encontraram prevalência de mais de 80% para infecção de *Plasmodium* spp. Em outro estudo CHAGAS et al. (2017) analisaram 1254 amostras de sangue de 122 espécies de aves mantidas em cativeiro no zoológico de São Paulo, sendo Anseriformes e Psittaciformes as ordens com maior número de aves amostradas. Os autores encontraram 85 aves (12,6%) positivas para *Plasmodium* spp. ou *Haemoproteus* spp., sendo identificadas por comparação de sequências de DNA as espécies *Plasmodium nucleophilum* e *Plasmodium elongatum*, e depositadas seis novas linhagens de *Plasmodium* spp. em bancos de dados.

Alguns desses estudos tem demonstrado que infecções por hemosporídeos em aves mantidas em cativeiro podem apresentar alta prevalência (BELO et al., 2009; VANSTREELS et al., 2014; TOSTES et al., 2015a), o que pode ser explicado pelas condições de saúde dessas aves, as quais diferem das aves que vivem em condições naturais. O cativeiro pode acarretar em má alimentação e nutrição, prostração, estresse, baixa imunidade, sendo que todos estes fatores favorecem o desenvolvimento de infecções por vírus, bactérias, fungos e hemosporídeos (ALLEY et al., 2008). Mediante essas más condições de saúde, o impacto de infecções de hemosporídeos em aves mantidas em cativeiro pode ser muito maior que em aves em condições naturais (DONOVAN et al., 2008; CANNEL et al., 2013; TOSTES et al., 2015b), podendo muitas vezes levar à morte (GARDINER et al., 1984; SCHRENZEL et al., 2003; FERREL et al., 2007; DONOVAN et al., 2008; OLIAS et al., 2011; ILGŪNAS et al., 2016; SCAGLIONE et al., 2016). Esses dados podem ser preocupantes em relação à conservação de aves silvestres, pois as condições de cativeiro podem aumentar a taxa de transmissão de hemosporídeos entre diferentes espécies de aves, que em condições naturais

não viveriam próximas, pois muitas não são sociais, tem nichos e habitats diferentes na natureza. E ainda, além do impacto negativo que esses hemosporídeos podem causar nas aves mantidas em cativeiro, muitas dessas espécies são reintroduzidas na natureza, inclusive aves migrantes, as quais podem carrear esses parasitos para novas áreas e novas espécies, o que pode ter forte impacto negativo nos hospedeiros, especialmente quando uma espécie de ave é exposta ao parasito pela primeira vez ou quando as aves são expostas a espécies de hemosporídeos que não são encontrados no seu ambiente natural, principalmente com infecções *Plasmodium* spp. (VAN RIPER III et al., 1986). Por exemplo, a alta mortalidade de pinguins com infecção malárica causada por *Plasmodium relictum* Grassi and Feletti, 1891 em um zoológico no Brasil, como relatada por BUENO et al. (2010) e a extinção de aves nativas do Havaí devido a introdução de *P. relictum* em uma nova área (ATKINSON et al., 2000; BENSCH et al., 2000).

2.3.3 Estudos sobre *Plasmodium* spp. em aves silvestres de outros biomas brasileiros

Estudos com hemosporídeos de aves em outros biomas no Brasil, foram realizados no Cerrado por FECCHIO et al. (2007), onde os autores analisaram 508 aves de 26 espécies de aves, utilizando análises microscópicas, e encontraram 35 aves infectadas pelos gêneros *Plasmodium* ou *Haemoproteus* (prevalência de 6,9%), sendo uma das menores já registradas para comunidades de aves silvestres na região Neotropical. Os autores analisaram ainda a relação entre prevalência e estações seca e chuvosa e com o período reprodutivo das aves, não sendo observada nenhuma relação significativa. Ainda no Cerrado, FECCHIO et al. (2011) observaram diferentes fatores que podem alterar a acessibilidade de vetores as aves, e que podem influenciar a prevalência de infecção por hemoparasitos, como tamanho e tipo de ninho, massa corporal e socialização das aves, e destacaram que diferentes padrões de comportamento e reprodução podem influenciar na prevalência de alguns parasitos. Encontraram que aves que vivem em grupos e cooperam no cuidado parental apresentaram prevalência maior para *Haemoproteus* spp. e em aves com ninhos em cavidades ou lugares fechados apresentaram maior prevalência para *Plasmodium* spp.

Também no Cerrado FECCHIO et al. (2013) analisaram 790 amostras de sangue de 54 espécies, das quais 166 (21%) estavam infectadas com hemosporídeos, baseado em diagnóstico molecular e sequências parciais do gene do citocromo *b* revelaram 18 linhagens diferentes. Os autores analisaram também a relação entre os traços de história de vida (isto é, altura de nidificação, migração, tipo de ninho, socialidade, massa corporal e período de desenvolvimento embrionário) das 14 espécies de aves mais abundantes e verificaram que as espécies hospedeiras sociais apresentaram maior prevalência de *Haemoproteus* spp. do que as espécies de aves não sociais.

BELO et al. (2011) analisaram a influência de três diferentes habitats (ambiente intacto, alterado e em transição com a Floresta Amazônica) na prevalência de infecção por hemosporídeos em 676 aves do Cerrado do Brasil e não encontraram diferenças na prevalência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. quanto ao tipo de ambiente (prevalência de 49% em ambas técnicas, microscopia e molecular).

Outro bioma brasileiro que já teve aves estudadas foi a Amazônia, SVENSSON-COELHO et al. (2013), usando PCR e sequenciamento de fragmentos de DNA do gene citocromo *b*, analisaram 2488 aves de 104 espécies para a presença de hemosporídeos. Encontraram prevalência de 21,7% e identificaram 65 linhagens diferentes de hemosporídeos e a hipótese que prediz um aumento na prevalência de hemosporídeos com o nível de dimorfismo sexual e uma diminuição na prevalência com a altura de forrageamento foi parcialmente suportada nesse estudo.

2.4 Identificação de *Plasmodium* spp.

2.4.1 Identificação por esfregaços sanguíneos

O método de diagnóstico por observação de esfregaços sanguíneos é utilizado na grande maioria dos estudos, por ser uma técnica barata e que requer apenas material de rotina em laboratórios para sua preparação, por permitir a verificação da intensidade de infecção e a presença de co-infecções e por ser base para identificação taxonômica morfológica das espécies de hemoparasitos (VALKIŪNAS et al., 2008b). Essa técnica busca quantificar, com estimativas de prevalência e parasitemia (intensidade) de infecção, e identificar morfológicamente os estágios eritrocíticos dos hemoparasitos (trofozoítos, esquizontes e gametócitos). A detecção ocorre por observação de um determinado número de campos microscópicos e/ou determinado período de tempo, fornecendo uma estimativa do número de parasitos (VALKIŪNAS et al., 2008b). Entretanto durante as fases crônicas ou latentes de infecção, o que é encontrado na maioria das aves, a detecção de parasitos por meio dos esfregaços é mais complicada, já que nessas fases a parasitemia encontra-se reduzida na circulação.

A identificação por microscopia ocorre a partir da observação e comparação de características morfológicas do parasito em um esfregaço de sangue periférico corado com colorações do tipo Romanowsky (Leishman e colorações Giemsa) (CAMPBELL, 1995; VALKIŪNAS, 2005). A detecção de *Plasmodium* spp. é baseada na presença de gametócitos intraeritrocíticos (pigmentados), trofozoítos e esquizontes. Em infecções em fase inicial, somente trofozoítos e esquizontes podem ocorrer nos eritrócitos, o que dificulta o diagnóstico específico. Entretanto em infecções na fase crônica somente gametócitos podem estar presentes e em alguns casos, espécies com gametócitos grandes e alongados, podem ser facilmente confundidas com *Haemoproteus* spp. (CAMPBELL, 1995; PEIRCE, 2008).

Atualmente, 82 espécies morfológicamente caracterizadas de *Plasmodium* foram descritas em aves (VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2007; 2008a; 2009; 2014; 2016; PAPERNA et al., 2010; ZEHTINDJIEV et al., 2012; CHAGAS et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015), sendo agrupadas em cinco sub-gêneros divididos com base em características morfológicas e biológicas de estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos (*Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Bennettinia*, *Huffia* e *Novyella*) (VALKIŪNAS, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de subgêneros, espécies de *Plasmodium*, principais características de diagnóstico observadas no sangue periférico e hospedeiro em que foi descrita.

	Subgênero	Espécie	Características de diagnóstico observadas no sangue periférico	Hospedeiro em que foi descrito
1	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium relictum</i>	Sem múltipla infecção nas células; Trofozoítos jovens deslocam o núcleo	<i>Passer hispaniolensis</i>
2	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium supraecox</i>	Esquizontes e gametócitos maduros não ocupam mais que a metade do citoplasma do eritrócito	<i>Athene noctua</i>
3	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium caloti</i>	Parecido com <i>P. supraecox</i> , difere pelo número de merozoítos, maior quantidade de citoplasma, hipertrofia dos eritrócitos	<i>Alauda arvensis</i>
4	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium cathemerium</i>	Gametócitos maduros possuem pigmento alongado. Mais comuns em microgametócitos	<i>Passer domesticus</i>

Continuação

5	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium gallinaceum</i>	Trofozoítos jovens não deslocam o núcleo. Esquizontes e gametócitos deslocam o núcleo e deformam a célula	<i>Gallus gallus</i>
6	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium matutinum</i>	Esquizontes com vacúolos grandes, sem grânulos de pigmento acumulados em torno	<i>Turdus migratorius</i>
7	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium lutzi</i>	Grânulos de pigmentos redondos e se agrupam em uma massa na margem dos parasitos	<i>Aramides cajanea</i>
8	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium giovannolai</i>	Esquizontes com vacúolos grandes, sem pigmento em torno. Grânulos de pigmentos redondos (pequenos – médios)	<i>Turdus merula</i>
9	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium griffithsi</i>	Esquizontes com vacúolos grandes, sem pigmento em torno, com corpo residual em esquizontes maduros. Gametócitos são ovais – alongados.	<i>Meleagris gallopavo</i>
10	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium tejeraei</i>	Trofozoítos e esquizontes jovens possuem vacúolo grande e pigmentos ao redor do vacúolo. Pigmentos nos gametócitos são redondos e gametócitos lobulados presentes	<i>Meleagris gallopavo</i>
11	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium coturnixi</i>	Sem múltipla infecção em células. Trofozoítos não desloca o núcleo. Esquizontes e gametócitos maduros ocupam mais que a metade do citoplasma da célula, podendo ocupar todo ele. Esquizontes sem vacúolos grandes	<i>Coturnix coturnix</i>
12	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium bioccai</i>	Formas arredondadas deslocam o núcleo lateralmente. Esquizontes regulares redondos ou ovais	<i>Pica pica; Alauda arvensis</i>
13	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium dorsti</i>	Esquizontes jovens já deslocam o núcleo e maduros tem formas irregulares	<i>Pica pica</i>
14	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium coluzzii</i>	Parecido com <i>P. bioccai</i> , difere por possuir esquizontes menores, com cromatina dispersa e difusa, pode anuclear eritrócitos	<i>Alauda arvensis</i>
15	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium ginsburgi</i>	Pigmento fortemente agrupado e depois mais disperso. Cromatina mais difusa em esquizontes.	<i>Alauda arvensis</i>
16	<i>Haemamoeba</i>	<i>Plasmodium parvulum</i>	Parecido com <i>P. relictum</i> , difere por possuir esquizontes maduros com 6-8 merozoítos (esquizontes imaturos de <i>P. relictum</i>), menos citoplasma nos esquizontes, fica localizado no centro de uma roseta junto com pigmento e tem gametócitos menores	<i>Schetba rufa</i>

Continuação

17	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium fallax</i>	Esquizontes maduros possuem vacúolos pequenos e não possuem prolongamentos “como-dedos”. Gametócitos tem citoplasma vacuolado. Esquizontes e gametócitos são alongados, ocupam posição lateral ao núcleo, que não é ou é pouco deslocado	<i>Ciccaba woodfordii</i>
18	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium ghadiriani</i>	Esquizontes grandes e gametócitos alongados. Número mais elevado de merozoítos que <i>P. lophurae</i> . Difere de <i>P. circumflexum</i> por não envolver o núcleo. Difere de <i>P. fallax</i> pelo número de merozoítos, por não ter forma amebóide de esquizontes e por vacúolos pequenos	<i>Pica pica</i>
19	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium tranieri</i>	Forma mais reta e estreita do que <i>P. ghadiriani</i> . Não desloca ou desloca pouco o núcleo. Merozoítos mais periféricos. Pequenos vacúolos presentes, pouco amebóide	<i>Pica pica</i>
20	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium circumflexum</i>	Esquizontes e gametócitos maduros em torno do núcleo (envolvem totalmente). Grânulos de pigmentos agregados em massa na extremidade de esquizontes. Não desloca ou desloca pouco o núcleo	<i>Turdus pilaris</i>
21	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium homocircumflexum</i>	Semelhante a <i>P. buteus</i> , esquizontes crescem em torno de todo o núcleo, mas difere nos gametócitos, que também crescem em torno do núcleo (não ocorre em <i>P. buteus</i>). Distinguível de <i>P. circumflexum</i> somente pela morfometria	<i>Lanius collurio</i>
22	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium buteonis</i>	Eritrócitos deformados (alongados ou arredondados), infecções múltiplas. Esquizontes podem crescer em torno do núcleo. Gametócitos em forma de língua, algumas vezes com projeções	<i>Buteo buteo</i>
23	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium polare</i>	Esquizontes tem posição polar ou subpolar e ocupam menos que a metade do citoplasma. Gametócitos tem posição lateral e não possuem vacúolos	<i>Hirundo pyrrhonota</i>
24	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium lenoblei</i>	Parecido com <i>P. polare</i> , difere por possuir gametócitos mais finos, menores e em posição apical ou subapical e ausência de cromatina ligando os merozoítos, que são dispersos no citoplasma	<i>Pica pica</i>

Continuação

25	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium lophurae</i>	Trofozoítos e esquizontes jovens amebóides e vacuolados (prolong. curtos). Esquizontes e gametócitos alongados, não deslocam ou deslocam pouco o núcleo	<i>Lophura igniti</i>
26	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium durae</i>	Esquizontes maduros são redondos ou ovais e não ocupam todo o citoplasma. Gametócitos alongados, sem vacúolos e oblíquos no eritrócito	<i>Meleagris gallopavo</i>
27	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium pedioecetae</i>	Trofozoítos e esquizontes amebóides. Esquizontes podem ser arredondados, com prolongamento longo, ocupam menos que metade do citoplasma, polar ou subpolar e não tocam o núcleo, formato de leque ou roseta	<i>Tympanuchus phasianellus</i>
28	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium pinottii</i>	Esquizontes maduros sem prolongamentos grandes, são redondos, ovais ou levemente alongados. Ocupa mais que metade do citoplasma, mas nunca todo e desloca o núcleo. Gametócitos tem posição lateral e não deslocam ou deslocam pouco o núcleo. Grânulos diferem entre macro e micro	<i>Ramphastos toco</i>
29	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium formosanum</i>	Esquizontes maduros redondos, posição polar e não deslocam ou deslocam pouco o núcleo. Macrogametócitos com vacúolos grandes, com pigmento em torno	<i>Arborophila crudigularis</i>
30	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium gundersi</i>	Esquizontes e gametócitos maduros finos e alongados, sem vacúolos. Tem posição lateral e nunca desloca nem envolve o núcleo. Pigmento agrupado nos esquizontes	<i>Ciccaba woodfordii</i>
31	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium anasum</i>	Esquizontes jovens polares em forma de U, sem prolongamentos, não envolvem completamente o núcleo e não ocupam todo citoplasma, com pigmentos agrupados em uma massa na extremidade. Gametócitos alongados, sem vacúolos, laterais ou polares	<i>Anas clypeata</i>
32	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium golvani</i>	Mais parecida com <i>P. anasum</i> , difere pelo número de merozoítos (até 28), gametócitos não tocam o núcleo e crescem tocando as duas extremidades da célula	<i>Pica pica</i>
33	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium reniai</i>	Parecida com <i>P. golvani</i> , difere pela forma geral, que é mais fina e alongada, não tem saliência em volta do núcleo do eritrócito	<i>Alauda arvensis</i>

Continuação

34	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium garnhami</i>	Esquizontes jovens sem prolongamentos e os maduros são redondos ou irregulares, polares ou subpolares, deslocam o núcleo, mas não ocupam todo citoplasma. Gametócitos jovens são finos (forma de linguíça) e irregulares na extremidade, laterais, sem vacúolos grandes	<i>Upupa epops</i>
35	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium hegeneri</i>	Trofozoítos com vacúolo grande. Esquizontes jovens com prolongamentos longos e os maduros são redondos ou ovais, polares ou subpolares, deslocam levemente o núcleo e não ocupam todo citoplasma. Gametócitos jovens polares ou laterais e maduros são laterais, sem vacúolos grandes	<i>Anas crecca</i>
36	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium beaucournui</i>	Parecido com <i>P. hegeneri</i> , difere por não apresentar prolongamentos nos esquizontes jovens, gametócitos são mais arredondados, ausência de prolongamentos e vacúolo grande em trofozoítos e esquizontes jovens	<i>Pica pica</i>
37	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium octamerium</i>	Esquizontes jovens sem prolongamentos, maduros são alongados, pigmentos agrupados, laterais, nunca envolve completamente o núcleo e junto com gametócitos não possuem ou possuem vacúolos pequenos. Gametócitos são grossos e alongados, laterais, não envolvem o núcleo	<i>Vidua macroura</i>
38	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium dherteeae</i>	Parecida com <i>P. octamerium</i> . Difere por ausência de trofozoítos amebóides, gametócitos menores, não deslocam o núcleo, presença de vacúolos. Esquizontes com pigmentos aglomerados	<i>Pica pica</i>
39	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium gabaldoni</i>	Esquizontes e gametócitos grandes, crescem em torno do núcleo, comuns em eritrócitos jovens, deslocam o núcleo, deformam o eritrócito (arredondado) e ocupam todo citoplasma. Gametócitos envolvem o núcleo totalmente, mais de 30 grânulos	<i>Columba livia</i>
40	<i>Giovannolaia</i>	<i>Plasmodium leanucleus</i>	Esquizontes jovens sem prolongamentos e os maduros são alongados com poucos grânulos de pigmento, excedem pouco o tamanho do núcleo. Núcleo dos parasitos na extremidade. Gametócitos laterais, sem vacúolos grandes, envolvem o núcleo apenas nas extremidades	<i>Passer domesticus</i>

Continuação

41	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium vaughani</i>	Trofozoítos jovens amebóides, prolongamentos não excedem o tamanho do trofozoíto. Esquizontes possuem glóbulo refrativo e junto com gametócitos não tocam o núcleo normalmente. Gametócitos jovens não possuem prolongamentos finos	<i>Turdus migratorius</i>
42	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium unalis</i>	Parecido com <i>P. vaughani</i> , mas difere quanto à presença de um único, largo, circular grânulo de pigmento em trofozoítos e esquizontes. Vacúolos proeminentes em trofozoítos e esquizontes jovens. Esquizontes em forma de ventilador	<i>Turdus fuscater</i>
43	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium columbae</i>	Trofozoítos maduros com prolongamentos afilados, possuindo as vezes um vacúolo pequeno. Gametócitos tem agrupado de pigmentos na extremidade e os maduros são pequenos e vacuolizados	<i>Columba livia</i>
44	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium rouxi</i>	Esquizontes jovens binucleados em forma de gravata borboleta. Macro e microgametócitos pouco distinguíveis, com poucos ou sem vacúolos e não deslocam ou deslocam pouco núcleo lateralmente	<i>Passer hispaniolensis</i>
45	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium mohammedi</i>	Parecido com <i>P. rouxi</i> , mas difere na disposição de merozoítos (2 pares), com maior quantidade de citoplasma, 2 glóbulos azuis e 2 agregados de pigmento refrativos. Gametócitos alongados com extremidades não afiladas	<i>Passer domesticus</i>
46	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium pachysomum</i>	Difere de <i>P. rouxi</i> e <i>P. mohammedi</i> por possuir esquizontes redondos e merozoítos agrupados, com variação da distribuição e citoplasma mais abundante. Presença de glóbulos azuis (1 ou 2) refrativos e ausência ou raros esquizontes com forma retangular ou de gravata borboleta	<i>Anthus campestris</i>
47	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium pfefferi</i>	Difere de todas outras espécies tetranucleadas que contém glóbulos refrativos por possuir 4 núcleos oblongos arranjados em pares opostos em citoplasma delicado. Vacúolos presentes no lugar de glóbulos, como 2 ou 3 grânulos de pigmento	<i>Pica pica</i>
48	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium sergentorum</i>	4 núcleos arranjados longitudinalmente, forma de ventilador ou em pares, com citoplasma escasso e claro, com pequenos vacúolos e 2 grânulos de pigmento em vez de glóbulos	<i>Alauda arvensis</i>

Continuação

49	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium stellatum</i>	4 núcleos em forma de estrela, arranjados retangularmente, com citoplasma residual, o qual contém glóbulos azuis e grânulos de pigmento	<i>Muscicapa striata</i>
50	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium hexamerium</i>	Trofozoítos amebóides, prolongamentos não excedem o tamanho do corpo. Grânulos de pigmentos em esquizontes maduros são agregados em uma massa sólida. Gametócitos sem prolongamentos finos	<i>Sialia sialis</i>
51	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium parahexamerium</i>	Trofozoítos e esquizontes com glóbulo refrativo e posição terminal do núcleo em macrogametócitos maduros, diferentemente de <i>P. hexamerium</i> (sem glóbulos e posição central do núcleo)	<i>Alethe diademata</i>
52	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium nucleophilum</i>	Esquizontes e gametócitos são grudados no núcleo. Gametócitos não muito grandes. Esquizontes deslocam o núcleo, mas gametócitos não	<i>Dumetella carolinensis</i>
53	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium paranucleophilum</i>	Esquizontes e gametócitos são grudados no núcleo. Gametócitos maiores. Esquizontes não deslocam ou deslocam pouco o núcleo, mas gametócitos maduros deslocam	<i>Tachyphonus sp.</i>
54	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium homonucleophilum</i>	Aderência de esquizontes ao núcleo. Gametócitos não são nucleofílicos e são maiores que em <i>P. nucleophilum</i>	<i>Locustella naevia</i>
55	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium snounoui</i>	Parecido com <i>P. nucleophilum</i> , difere pela forma menos alongada, número de merozoítos, esquizontes não deslocam o núcleo	<i>Pica pica</i>
56	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium jeanriouxi</i>	Proximidade do núcleo, parecida com <i>P. snounoui</i> , difere por apresentar esquizontes alongados com cromatina densa e agrupada em massas alongadas laterais em formas jovens e em forma de coroa em formas maduras	<i>Alauda arvensis</i>
57	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium dissanaikei</i>	Trofozoítos amebóides com prolongamentos que não excedem o tamanho do corpo. Esquizontes polares ou subpolares, podem estar grudados no núcleo ou não. Gametócitos jovens tem prolongamentos afilados	<i>Psittacula krameri</i>
58	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium bertii</i>	Esquizontes bilobulares sem forma de gravata borboleta. Gametócitos com muitos vacúolos, que se acumulam nas extremidades. Gametócitos jovens grandes que deslocam o núcleo. Macro e microgametócitos bem diferentes	<i>Aramides cajanea</i>

Continuação

59	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium kempfi</i>	Trofozoítos e esquizontes jovens com vacúolo grande, refrativo e prolongamento afilado que pode exceder o tamanho do corpo. Esquizontes com forma de ventilador. Gametócitos com pigmentos espalhados ou agrupados em pequenos grupos	<i>Meleagris gallopavo</i>
60	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium multivacuolaris</i>	Macrogametócitos multivacuolados (vacúolos regulares) e prolongamentos afilados em microgametócitos. Parecida com <i>P. vaughani</i> , diferencia pelos glóbulos, que são refrativos e maiores em <i>P. vaughani</i>	<i>Andropadus latirostris</i>
61	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium lucens</i>	Esquizonte binuclear com vacúolo central e núcleo. Claras diferenças entre macro e microgametócitos	<i>Cyanomitra olivacea</i>
62	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium ashfordi</i>	Esquizontes em forma de ventilador. Grânulos de pigmento nos gametócitos são agrupados em uma massa proeminente com posição terminal. Macrogametócitos com citoplasma granular e núcleo difuso. Núcleo de microgametócitos compacto	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>
63	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium globularis</i>	Glóbulo azul não refrativo central e terminal em trofozoítos e esquizontes binucleares. Esquizontes maduros pigmentos são agrupados em massa perto do glóbulo azul. Gametócitos tem citoplasma granular (micro principalmente) com áreas sem corar e núcleo difuso. Microgametócitos tem núcleo com agregado de numerosos glóbulos	<i>Andropadus latirostris</i>
64	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium megaglobularis</i>	Parecido com <i>P. globularis</i> , mas os glóbulos são maiores nos trofozoítos e esquizontes, metade do número de grânulos de pigmento. Aparência globular do citoplasma de gametócitos	<i>Cyanomitra olivacea</i>
65	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium homopolare</i>	Posição polar ou subpolar de esquizontes e trofozoítos. Parecida com <i>P. polare</i> , mas esquizontes são menores e o número de merozoítos é menor (8) (16 na <i>P. polare</i>)	<i>Atlapetes albinucha</i> , <i>Zonotrichia capensis</i> , <i>Myiothlypis coronatus</i>
66	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium accipiteris</i>	Esquizontes e gametócitos em células maduras, não deslocam o núcleo. Esquizontes redondos, as vezes com 2 glóbulos azul-claro. Macrogametócito prolongado ou irregular e micro longo e fino, ambos maiores que o núcleo, vacuolados e as vezes com 4 glóbulos azuis, pigmento agrupado	<i>Accipiter brevipes</i>

Continuação

67	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium forresteri</i>	Vacúolos podem não estar presentes ou em pequena quantidade em gametócitos. Gametócitos são delgados e irregulares na extremidade e não deslocam ou deslocam pouco o núcleo. Macro muitas vezes com margens crenuladas	<i>Strix varia</i>
68	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium lusciniae</i>	Posição apical ou subapical. Esquizontes jovens com vacúolos grandes, com glóbulo refrativo azul presente (também nos maduros)	<i>Luscinia svecica</i>
69	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium phoenicuri</i>	Parecido com <i>P. lusciniae</i> , difere no tamanho dos esquizontes, são maiores com citoplasma mais abundante	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>
70	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium reticulatus</i>	Possui citoplasma reticulado em esquizontes jovens e forma pequena quantidade de merozoítos	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>
71	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium alloreticulatus</i>	Maior e mais merozoítos do que <i>P. reticulatus</i>	<i>Luscinia svecica</i>
72	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium bilobatus</i>	Trofozoítos amebóides, forma fusiforme de esquizontes binucleados com prolongamentos finos e alongados	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>
73	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium paranuclearis</i>	Aderência do esquizonte ao núcleo, presença de glóbulo refrativo azul	<i>Luscinia svecica</i>
74	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium synnuclearis</i>	Grau extremo de associação com núcleo, presença de glóbulo conpíscuo azul	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>
75	<i>Novyella</i>	<i>Plasmodium delichoni</i>	Merontes e gametócitos estritamente nucleofílicos e gametócitos maduros possuem grânulos de pigmento de tamanho variável, incluindo alguns grandes (1 µm de comprimento)	<i>Delichon urbicum</i>
76	<i>Bennettinia</i>	<i>Plasmodium juxtannucleare</i>	Esquizontes claramente nucleofílicos e gametócitos redondos são comuns	<i>Gallus gallus</i>
77	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium elongatum</i>	Merozoítos alongados. Fases eritrocíticas principalmente em células jovens, mas gametócitos desenvolvem-se em eritrócitos maduros. Gametócitos são finos e alongados, não atingem os pólos dos eritrócitos	<i>Serinus canaria</i>
78	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium valkiunasi</i>	Semelhante a <i>P. elongatum</i> , difere por não ter formas observadas em reticulócitos e pela forma triangular de esquizontes maduros. Merozoítos alongados em esquizontes em forma de leque, gametócitos alongados	<i>Pica pica</i>
79	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium alloelongatum</i>	Esquizontes em células jovens e gametócitos em maduras, posição polar, vacuolados, agregado de pigmentos. Gametócitos não deslocam o núcleo, nem deformam a célula, ondulações e prolongamentos afilados, vacuolados, pigmentos agregados em massas largas	<i>Accipiter brevipes</i>

Continuação

80	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium huffi</i>	Trofozoítos e esquizontes desenvolvem-se em células maduras. Merozoítos ovais ou alongados. Gametócitos deslocam o núcleo e vão até os pólos dos eritrócitos	<i>Ramphastos toco</i>
81	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium hermani</i>	Trofozoítos e esquizontes desenvolvem-se em eritrócitos jovens e gametócitos em maduros. Merozoítos redondos ou ovais. Gametócitos maiores, deslocam o núcleo e pode atingir os pólos dos eritrócitos	<i>Meleagris gallopavo</i>
82	<i>Huffia</i>	<i>Plasmodium polymorphum</i>	Esquizontes e gametócitos em células jovens, núcleo dos gametócitos grandes, o contorno de núcleos em esquizontes e gametócitos é marcadamente liso, e a divisão entre núcleo e citoplasma é distinta em esquizontes e gametócitos	<i>Alauda arvensis</i>

2.4.1 Identificação por marcadores moleculares

O uso de marcadores moleculares é uma importante técnica para auxílio na identificação de espécies de hemosporídeos aviários, o que é feito por comparação e semelhança ou divergência de fragmentos de sequências de DNA de diversos genes. Sequências do gene mitocondrial citocromo *b* são as mais utilizadas atualmente, como pode ser visto no banco de dados de sequências de DNA de hemosporídeos aviários MalAvi (BENSCH et al., 2009). Vários autores desenvolveram protocolos para detecção desses parasitos, utilizando diferentes marcadores e genes (BERNOTIENÉ et al., 2016), entretanto, os propostos por BENSCH et al. (2000) e HELLGREN et al. (2004) são os mais utilizados até o presente (VALKIŪNAS et al. 2008a; 2014; 2016; ZEHTINDJIEV et al. 2012; ILGŪNAS et al. 2013; ZEHTINDJIEV et al. 2013; VALKIŪNAS et al. 2014; WALTHER et al. 2014; GUTIÉRREZ-LÓPEZ et al. 2015; IVANOVA et al. 2015; GONZALEZ-QUEVEDO et al., 2016; BERNOTIENÉ & VALKIŪNAS, 2016; ILGŪNAS et al., 2016). Esses autores desenvolveram dois pares de iniciadores do gene mitocondrial citocromo *b* que amplificam fragmentos finais de DNA de 479 bp por *nested*-PCR. Primeiramente são utilizados os iniciadores HaemFNI e HaemNR3, que amplificam fragmentos de espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* e na segunda reação são utilizados os iniciadores HaemF e HaemR2, que amplificam fragmentos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

Estudos recentes com alguns marcadores tem demonstrado que a diversidade de espécies de *Plasmodium* pode ser muito maior do que a diversidade estimada com base na taxonomia tradicional (BENSCH et al., 2000; 2004; PERKINS & SCHALL, 2002; BEADELL et al., 2004; 2006; HELLGREN et al., 2004; MARTINSEN et al., 2008; CLARK et al., 2014; IVANOVA et al., 2015). Atualmente existem pouco mais de 700 sequências do gene mitocondrial citocromo *b* de *Plasmodium* spp. depositadas no banco de dados MalAvi (banco de dados exclusivo para depósito de sequências de hemosporídeos aviários) (BENSCH et al., 2009), entretanto, pouco mais de 20% das linhagens genéticas desses parasitos tem sido relacionadas com descrições morfológicas, sendo a maioria dessas linhagens identificadas

apenas ao nível de gênero (CLARK et al., 2015). E ainda, somente o uso de técnicas moleculares pode subestimar o número de espécies de parasitos encontradas, pois essa técnica pode não detectar coinfeções de dois ou mais parasitos (BERNOTIENÉ et al., 2016), o que é muito comum entre os hemosporídeos aviários. Estudos vem reportando prevalências de até 80% de coinfeções em muitas espécies de aves do mundo (VALKIŪNAS et al., 2003; 2006; BEADELL et al., 2004; LOISEAU et al., 2010; DIMITROV et al., 2014). Isso demonstra a necessidade de estudos adicionais usando ambas as técnicas, morfológica e molecular, para relacionar descrições morfológicas a sequências de DNA em hemosporídeos aviários, auxiliando assim identificações de espécies com a utilização de um código de barras de DNA (“*barcoding*”) em futuros estudos, pois o conhecimento sobre a diversidade de parasitos hemosporídeos é crucial para uma melhor compreensão da evolução, biologia e epidemiologia dos parasitos, principalmente em animais silvestres (VALKIŪNAS et al., 2016).

Em hemosporídeos aviários não está estabelecida uma clara definição de quando uma espécie pode ser distinguida de outra, baseando-se em graus de divergência genética de sequências de fragmentos do citocromo *b* (MANTILLA et al., 2013b). A fim de esclarecer essas dúvidas, HELLGREN et al. (2007) e VALKIŪNAS et al. (2009, 2014), sugeriram que espécies com divergências genéticas de 5% ou mais para o gene *cyt b* podem ser diferenciadas morfológicamente e podem ser classificadas como espécies diferentes. Já OUTLAW & RICKLEFS (2014) propuseram três divergências genéticas, 1%, 3% e 5%, para a discriminação de espécies baseada também no marcador molecular *cyt b*, onde sequências com divergência > 1% são consideradas novas e devem ser examinadas como potencialmente novas espécies de hemosporídeos. As sequências que diferem em pelo menos 3% ou 5% são consideradas diferentes e muitas vezes apresentam diferenças morfológicas, que podem ou não levar à identificação de uma nova espécie. No entanto, a delimitação de espécies baseada exclusivamente em marcadores genéticos é uma tarefa desafiadora devido à variação genética intraespecífica em espécies de hemosporídeos aviários. Em alguns casos, a variação intraespecífica pode chegar a 2,6% (VALKIŪNAS et al., 2008c), enquanto em outros casos, caracteres morfológicos distintos estão associados a divergência genética interespecífica de aproximadamente 1% (HELLGREN et al., 2007; DIMITROV et al., 2014). Basear-se unicamente no grau de divergência ou similaridade em dados moleculares ou morfológicos pode levar a erros de identificação de espécies, uma vez que o grau de diversidade genética que separa claramente duas espécies ainda é discutível e as espécies crípticas podem ser mais comuns entre hemosporídeos do que o encontrado, como *Plasmodium homocircumflexum*, descrito por PALINAUSKAS et al. (2015), devido ao uso exclusivo de descrições morfológicas em muitos estudos. Isso demonstra que em estudos com taxonomia de hemosporídeos aviários é necessário melhorar a definição das espécies, integrando teoria e métodos de estudos, destacando a importância da taxonomia integrativa usando várias metodologias para a identificação e caracterização de espécies. Apesar do grande número de estudos com esses parasitos, um número crescente de sequências é depositado sem dados morfológicos e / ou identificado apenas ao nível gênero ou erroneamente. Estudos relatando caracterizações mais completas, tal como no presente estudo, são importantes para a identificação e caracterização das espécies, sendo essencial a utilização de várias abordagens, incluindo diagnóstico baseado na microscopia tradicional, análises de sequências genéticas, e, se possível, estudos experimentais, como ensaios de hibridação “*in vivo*”.

CAPÍTULO I

3 FILOGENIA MOLECULAR E MORFOLOGIA DE UMA LINHAGEM BRASILEIRA DE *Plasmodium (Novyella) unalis* Mantilla et al., 2013, COM NOTAS SOBRE NOVOS HOSPEDEIROS E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Turdus* spp. (PASSERIFORMES) DE FRAGMENTOS DA MATA ATLÂNTICA

RESUMO

Plasmodium spp. são protozoários hemosporídeos que alternam seu ciclo de vida entre mosquitos hematófagos da família Culicidae e hospedeiros vertebrados. Esses parasitos tem sido registrados em aves do gênero *Turdus* em várias partes do mundo. Neste estudo, amostras de sangue de 90 aves do gênero *Turdus* coletadas em fragmentos da Mata Atlântica no sudeste do Brasil foram analisadas para a presença de *Plasmodium* spp. por análises microscópicas e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase *b* (*cyt b*). No total, 58 aves (47 *Turdus rufiventris*, 9 *Turdus leucomelas*, 1 *Turdus albicollis* e 1 *Turdus flavipes*) foram positivamente infectados com *Plasmodium unalis*, com base em ambos os métodos, morfológico e molecular, apresentando prevalência de 64,44% e parasitemia média de 0,82%. *Plasmodium lutzi* também foi registrado em 3 *Turdus rufiventris* e 2 *Turdus leucomelas* (prevalência de 5,5% e parasitemia média de 0,23%). No presente estudo, quatro novos hospedeiros foram registrados para *P. unalis*. Esse hemosporídeo foi previamente detectado em *Turdus fuscater* na Colômbia e em pinguins no Brasil. A descrição desse parasito foi ampliada e alguns caracteres apresentaram polimorfismos em relação à descrição original, como o registro de trofozoítos em forma de anel, o número de merozoítos em sua maioria quatro, as larguras dos macrogametócitos e microgametócitos excederam 2,6 μm e 2,8 μm , respectivamente, e os gametócitos que atingiram os pólos dos eritrócitos infectados em seu comprimento. Sete novas linhagens de *P. unalis* do gene citocromo *b* foram adicionadas a bancos de dados. As linhagens do presente estudo TLJB34 e TLSB1096 agruparam-se em um clado separado juntamente com sequências de *Plasmodium* spp., sendo mais distantes em relação as outras obtidas no presente estudo, apresentando 3% de divergência genética. O conjunto de dados obtidos destaca a importância da taxonomia integrativa e o uso de abordagens moleculares e morfológicas combinadas para identificar e caracterizar espécies de hemosporídeos aviários.

Palavras-chave: Malária aviária. Haemosporida. Região Neotropical. Turdidae. Aves silvestres.

ABSTRACT

Plasmodium spp. are haemosporidian protozoans that alternate between bloodsucking dipteran belong to the family Culicidae and vertebrate hosts. They have been recorded in birds of the *Turdus* genus in various parts of the world. In this work, blood samples obtained from 90 *Turdus* individuals collected from the Atlantic Forest in southeastern Brazil were evaluated for the presence of *Plasmodium* spp. by light microscopy and cytochrome oxidase b (cyt b) gene sequencing. In total, 58 birds (47 *Turdus rufiventris*, 9 *Turdus leucomelas*, 1 *Turdus albicollis*, and 1 *Turdus flavipes*) were positively infected based on both morphological and molecular methods, with a prevalence of 64.44% and a mean parasitemia of 0.82%. *Plasmodium lutzii* was also recorded in 3 *Turdus rufiventris* and 2 *Turdus leucomelas* (prevalence of 5.5% and mean parasitemia of 0.23%). In the present study, four new hosts were recorded for *P. unalis*. This haemosporidian previously detected in *Turdus fuscater* in Colombia and in penguins in Brazil. The morphological description of these parasite has been expanded and some characters presented polymorphisms in relation to the original description, such as, trophozoites in ring-shaped were found, the number of merozoites, which in most was four, the macrogametocyte and microgametocyte widths exceeded 2.6 μm and 2.8, respectively, and the gametocytes filled infected erythrocytes up to their poles. Seven new sequences of *P. unalis* cyt b gene were added to the databases. The TLJB34 and TLSB1096 lineages of the present study clustered in a separate clade together with sequences of *Plasmodium* spp. and are the most distantly related with 3% of sequence divergence. The set of data obtained highlight the importance of integrative taxonomy and the use of combined molecular and morphological approaches to accurately identify and characterize avian haemosporidian species.

Key-words: Avian malaria. Haemosporida. Neotropical area. Turdidae. Wild birds.

3.1 INTRODUÇÃO

Plasmodium spp. são protozoários hemosporídeos (filo Apicomplexa) parasitos intracelulares obrigatórios que alternam seu ciclo de vida entre dípteros hematófagos da família Culicidae e hospedeiros vertebrados (répteis, aves e mamíferos) (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Aproximadamente 80 morfoespécies de *Plasmodium* foram descritas causando malária em aves em várias partes do mundo (VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2007; 2008b; 2009; 2016; PAPERNA et al., 2010; ZEHTINDJIEV et al., 2012; CHAGAS et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015).

Espécies do gênero *Turdus* (Passeriformes, Turdidae) tem ampla distribuição geográfica, sendo um dos poucos gêneros de Passeriformes que se irradia extensivamente na África, Américas Central e do Sul e regiões Oriental e Paleártica (CLEMENT & HATHWAY, 2000; COLLAR, 2005; NYLANDER et al., 2008), sendo que a maior diversidade de espécies ocorre nas Américas do Sul e Central (NYLANDER et al., 2008). Essas aves são onívoras e se adaptam bem a habitats diversos, desde as estepes da Sibéria à floresta tropical da Amazônia, podendo ainda ocupar com sucesso ambientes urbanos (HUTCHINS et al., 2002). Até o momento foram descritas cerca de 65 espécies pertencentes a esse gênero, das quais 15 podem ser encontradas no Brasil (NYLANDER et al., 2008; SIGRIST, 2014). *Plasmodium* spp. vem sendo registradas em aves do gênero *Turdus* em várias partes do mundo (KIM et al., 2009; HELLGREN et al., 2011; EWEN et al., 2012; LOISEAU et al., 2012; LACORTE et al., 2013; MANTILLA et al., 2013a; b; DROVETSKI et al., 2014; OAKGROVE et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2015; LUTZ et al., 2015; MATÍNEZ-DE LA PUENTE et al., 2015), incluindo *Plasmodium relictum* (BEIER et al., 1981; TOMPKINS & GLEESON, 2006), *Plasmodium matutinum* (CORRADETTI et al., 1960), *Plasmodium vaughani* (CORRADETTI et al., 1961; CORRADETTI & SCANGA, 1972; TELFORD & FORRESTER, 1992; HATCHWELL et al., 2000; VALKIŪNAS et al., 2009; DIMITROV et al., 2010), *Plasmodium giovannolai* (CORRADETTI et al., 1963; HATCHWELL et al., 2000), *Plasmodium circumflexum* (BEIER et al., 1981; DIMITROV et al., 2010), *Plasmodium meruale* (CHAVATTE et al., 2010) e *Plasmodium elongatum* (LACORTE et al., 2013). Além dessas, *Plasmodium lutzii* (MANTILLA et al., 2013a) e *Plasmodium unalis* (MANTILLA et al., 2013b) encontrados em *Turdus fuscater* em áreas de altitude elevada na Colômbia, sendo a última encontrada também por GONZÁLEZ et al. (2015) na mesma região e no mesmo hospedeiro e registrada ainda por VANSTREELS et al. (2015) em pinguins no Brasil.

A identificação de espécies de hemosporídeos aviários tem sido baseada no exame de esfregaços sanguíneos, onde são observadas características morfológicas das formas encontradas na fase eritrocítica (trofozoítos, merontes e gametócitos), sendo considerados ainda dados de hospedeiros experimentais e de especificidade (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Adicionalmente, marcadores moleculares tornaram-se importante ferramenta para identificação das espécies de hemosporídeos. Estudos genéticos recentes tem demonstrado que a diversidade de espécies de *Plasmodium* pode ser muito maior do que as estimativas anteriores de diversidade baseadas na taxonomia tradicional (BENSCH et al., 2000; PERKINS & SCHALL, 2002; BEADELL et al., 2004; BENSCH et al., 2004; HELLGREN et al., 2004; BEADELL et al., 2006; MARTINSEN et al., 2008; CLARK et al., 2014; IVANOVA et al., 2015). Entretanto, menos de 20% das linhagens genéticas desses parasitos tem sido associadas a descrições morfológicas e a maior parte destas linhagens foram apenas identificados ao nível de gênero (CLARK et al., 2015). Isto reforça a necessidade de estudos adicionais, utilizando métodos morfológicos e moleculares para associar descrições morfológicas a códigos de barras (“*barcoding*”) de DNA para identificação de hemosporídeos aviários.

O objetivo desse estudo foi realizar caracterização multidisciplinar de uma população brasileira de *P. unalis* encontrado em quatro espécies de *Turdus* em fragmentos de Mata Atlântica, com detalhes da morfologia, morfometria, sequências do gene citocromo *b* (*cyt b*), análises filogenéticas, e também parasitemia e prevalência deste parasito. A presença de outros hemosporídeos também foi registrada.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue

Foram realizadas coletas entre dezembro de 2012 a dezembro de 2014 em cinco fragmentos da Mata Atlântica de Minas Gerais e um total de 90 aves do gênero *Turdus* foram amostradas, incluindo 70 *Turdus rufiventris*, 15 *Turdus leucomelas*, 4 *Turdus albicollis* e 1 *Turdus flavipes* (Tabela 1). Esse estudo faz parte de um projeto mais amplo que visa realizar inventário de ectoparasitos e hemoparasitos de aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais. Neste projeto, as aves são capturadas com auxílio de redes de neblina e amostras de sangue (aproximadamente 30µL) são coletadas por punção na veia braquial para análises microscópicas e moleculares. As aves analisadas nesse estudo foram identificadas por comparação com as pranchas disponíveis em RIDGELY & TUDOR (2009) e SIGRIST (2014), baseadas em análises morfométricas e observações de características fenotípicas como tamanho, plumagem, bico, cor da íris e pernas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo protocolo nº 042/2012 (Anexo A) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268-3 (Anexo B).

3.2.2 Análises morfológicas e morfométricas

Foram feitos pelo menos quatro esfregaços sanguíneos de cada ave para cálculo da prevalência de infecção, da parasitemia e para identificação e caracterização morfológica das espécies de hemoparasitos encontradas. Os esfregaços foram secados ao ar, fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos e corados pelo Giemsa (Eosina e Azul de Metileno) por aproximadamente 40 minutos, na diluição de 1:9 em água destilada. Os esfregaços foram analisados sob lente de imersão em microscópio de campo claro Olympus BX-51 (Tóquio, Japão) em aumento de 600x durante 20 min e 100 campos microscópicos foram observados em aumento de 1000x para cálculo da prevalência segundo BUSH et al. (1997) e da parasitemia (intensidade de infecção), onde o número de formas de cada parasito foi quantificado (GODFREY et al. 1987). Para preparação de imagens e realização de análises morfométricas foi utilizado microscópio de campo claro Olympus BX-51 equipado com sistema de captura e análise de imagem (Image Pro Plus 6.0), onde foram medidas características morfológicas descritas em VALKIŪNAS (2005), MANTILLA et al. (2013b) e WALTHER et al. (2014), além do comprimento e área dos pigmentos encontrados em merontes e gametócitos, comprimento e área dos merozoítos e comprimento e área dos vacúolos encontrados nos microgametócitos. Para calcular a taxa de deslocamento do núcleo (“*nucleus displacement ratio*”, NDR) de acordo com BENNETT & CAMPBELL (1972), a fórmula $2X/(X + Y)$ foi usada, onde Y representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo do eritrócito no lado ocupado pelo parasito e X representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo do eritrócito no lado não ocupado pelo parasito.

3.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. O DNA total do sangue de aves positivas na análise microscópica foi extraído usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as instruções do fabricante. *Nested-PCR* foi utilizada para amplificar um fragmento final do gene mitocondrial citocromo *b* de 479-bp. Na primeira reação os iniciadores propostos por HELLGREN et al.

(2004), HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') foram utilizados. Esses iniciadores amplificam fragmentos de DNA de espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Na segunda reação, os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), propostos por BENSCH et al. (2000) foram usados para amplificar fragmentos de 479bp dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Esses iniciadores vem sendo usados em muitos estudos de hemosporídeos aviários (VALKIŪNAS et al., 2008a; 2014; ZEHTINDJIEV et al., 2012; 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; GUTIÉRREZ-LÓPEZ et al., 2015; IVANOVA et al., 2015) e foram considerados por BERNOTIENĖ et al. (2016) os melhores iniciadores para amplificação de DNA de hemosporídeos aviários em infecções simples. A primeira reação consistiu em um volume final de 25µL, onde foram utilizados 12,5µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10µM (HaemFNI e HaemR2), 5µL de DNA genômico e água deionizada para completar o volume até 25µL. Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, e extensão final em 72°C por 10 min (HELLGREN et al., 2004). As mesmas condições foram usadas na segunda reação, exceto que 1µL do produto da primeira reação foi utilizado substituindo o DNA genômico e 1µL dos iniciadores HaemF e HaemR2 a uma concentração de 10µM foram usados. Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 2% com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras amplificadas de aves com maior intensidade de infecção e que não apresentavam coinfeção com outras espécies de parasitos foram purificadas usando o kit de purificação QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciadas no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os eletroferogramas foram visualizados no programa Geneious 6.0 (KEARSE et al., 2012) e amostras que não apresentaram eletroferogramas de boa qualidade foram descartadas.

3.2.4 Análises filogenéticas

Reconstruções filogenéticas foram feitas usando sequências do gene *cyt b* de hemosporídeos aviários obtidas do banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009) e de sequências dos parasitos obtidas no presente estudo. Todas as manipulações do conjunto de dados foram realizadas utilizando o programa ARB package (LUDWIG et al., 2004), incluindo alinhamento das sequências e remoção de sequências relacionadas com os iniciadores. Depois disso as sequências foram ajustadas manualmente para produzir um conjunto de dados de igual comprimento (479bp). jModelTest_2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) foi usado para selecionar o melhor modelo evolutivo. A análise por Inferência Bayesiana (BI) foi realizada usando o programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), onde o modelo GTR + G + I foi aplicado. Duas corridas independentes de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) compostas cada uma, de uma cadeia fria e 3 quentes foram realizadas ao longo de 1 milhão de gerações aplicando-se ao final um “burn-in” de 25% (25% das primeiras árvores geradas foram descartadas da análise). A análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi feita usando o programa PhyML v3.0 (GUINDON et al., 2010), aplicando o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I. A confiabilidade dos ramos internos foi avaliada usando o método “bootstrap” não paramétrico com 1000 psedorélicas. As árvores resultantes foram visualizadas no programa FigTree 1.4.2. Para cálculo da divergência genética entre as sequências obtidas no presente estudo e outras já depositadas em bancos de dados foi

utilizado o programa ARB package (LUDWIG et al., 2004), onde foi usado o modelo de “Kimura two-parameter” com taxa de distribuição gamma (+G).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Prevalência e intensidade de infecção

Dentre as 90 aves examinadas, 58 estavam infectadas com *P. unalis* (prevalência de 64,44%), incluindo 47 *T. rufiventris*, 9 *T. leucomelas*, 1 *T. albicollis* e 1 *T. flavipes*. Registrou-se pela primeira vez esse parasito para cada uma das espécies de aves. A parasitemia média foi de 0,82%. Adicionalmente a espécie *P. lutzi* foi encontrada em cinco aves (prevalência de 5,5%), sendo três *T. rufiventris* e duas *T. leucomelas*, com parasitemia média de 0,23%. Nessas cinco aves infectadas por *P. lutzi* houve co-infecção com *P. unalis* (prevalência de 5,5%). A caracterização morfológica detalhada e análise de polimorfismo de *P. lutzi* encontrado nas duas espécies de *Turdus* e em outras espécies de aves silvestres da Mata Atlântica serão apresentadas em outro artigo.

Tabela 1. *Turdus albicollis*, *Turdus flavipes*, *Turdus leucomelas* e *Turdus rufiventris* amostrados em fragmentos da Mata Atlântica do sudeste do Brasil, número de aves examinadas, número de aves parasitadas por *Plasmodium unalis* e *Plasmodium lutzi* e distribuição geográfica.

Espécies de aves	Número de aves examinadas	Número de aves parasitadas por <i>P. unalis</i>	Número de aves parasitadas por <i>P. lutzi</i>	Localidade onde foi amostrada
<i>Turdus albicollis</i>	2	1	0	21° 43' 53.8" S, 43° 22' 17.3" O
	2	0	0	21° 46' 39.0" S, 43° 22' 14.9" O
<i>Turdus flavipes</i>	1	1	0	21° 43' 53.8" S, 43° 22' 17.3" O
<i>Turdus leucomelas</i>	8	4	1	21° 43' 53.8" S, 43° 22' 17.3" O
	2	1	0	21° 48' 23.0" S, 43° 15' 45.7" O
	1	1	0	21° 40' 18.2" S, 43° 13' 14.2" O
	2	1	0	21° 48' 24.8" S, 43° 19' 34.1" O
	2	2	1	21° 46' 39.0" S, 43° 22' 14.9" O
<i>Turdus rufiventris</i>	48	29	2	21° 43' 53.8" S, 43° 22' 17.3" O
	16	15	1	21° 48' 23.0" S, 43° 15' 45.7" O
	2	1	0	21° 40' 18.2" S, 43° 13' 14.2" O
	3	2	0	21° 48' 24.8" S, 43° 19' 34.1" O
	1	0	0	21° 46' 39.0" S, 43° 22' 14.9" O
Total	90	58	5	

3.3.2 Caracterização morfológica e morfométrica de *Plasmodium (Novyella) unalis*

Todas as formas foram encontradas em eritrócitos maduros, com exceção de alguns trofozoítos, que foram observados também em eritrócitos policromáticos (Figura 1a). As análises morfométricas de merontes eritrocíticos e gametócitos do parasito no hospedeiro tipo e nos hospedeiros relatados no presente estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Trofozoítos: foram encontrados em eritrócitos maduros e em eritrócitos policromáticos (Figura 1a). Foram observadas formas redondas ou ovais, com registro do formato em anel (Figura 1b). Glóbulos refrativos e vacúolos foram observados (Figura 1b–d, e), além de único grânulo de hemozoína, de forma circular (Figura 1b–e). O núcleo foi observado em algumas formas jovens e nas mais maduras, apresentando pigmentação rósea (Figura 1a, c–e). Geralmente os trofozoítos não tocam o núcleo do eritrócito e tem posição polar ou subpolar

(Figura 1a–e). Não foi observada influência dos parasitos sobre a forma e tamanho dos eritrócitos infectados.

Merontes eritrocíticos: apresentaram citoplasma escasso em formas maduras, sendo visto em maior quantidade em formas mais jovens (Figura 1f–k). Foram observados glóbulos refrativos e vacúolos (Figura 1h–j), além de único grânulo de hemozoína de forma circular, com área variando de 0,27 a 0,86 μm^2 ($0,51 \pm 0,12$) (Tabela 2, Figura 1f–k), encontrando-se similar aos registrados nos trofozoítos. Os merontes apresentaram frequentemente formato de leque ou roseta (Figura 1g–j) e ocasionalmente formas irregulares (Figura 1h, k). O tamanho dos merontes não excedeu o tamanho do núcleo do eritrócito, variando de 1,82 a 3,92 μm ($3,06 \pm 0,54$) (Tabela 2, Figura 1f–k). Merontes observados apresentaram entre três e oito (mais frequentemente quatro) merozoítos, que variaram de 0,32 a 1,06 μm^2 ($0,79 \pm 0,15$) (Tabela 2, Figura 1h–j). A maioria dos merontes foi observada em posição polar ou subpolar (Figura 1f–k), e em alguns casos o meronte foi observado tocando o núcleo do eritrócito infectado (Figura 1h). Não foi observada influência dos parasitos sobre a forma e tamanho dos eritrócitos infectados.

Tabela 2. Morfometria comparativa dos eritrócitos dos hospedeiros, merontes eritrocíticos e gametócitos de *Plasmodium unalis* de esfregaços sanguíneos de *Turdus rufiventris* e *Turdus fuscater* (MANTILLA et al., 2013b).

Características	<i>Plasmodium unalis</i> de <i>Turdus rufiventris</i> (presente estudo) ^a	<i>Plasmodium unalis</i> de <i>Turdus fuscater</i> (MANTILLA et al., 2013b) ^a
Eritrócitos não infectados	<i>n</i> =30	
Comprimento	9,48–10,78 ($10,15 \pm 0,31$)	–
Largura	5,82–7,67 ($6,91 \pm 0,45$)	–
Área	50,18–64,77 ($57,05 \pm 4,1$)	–
Núcleo dos eritrócitos não infectados		
Comprimento	4,45–5,58 ($5,11 \pm 0,28$)	–
Largura	1,97–3,15 ($2,52 \pm 0,23$)	–
Área	9,14–14,88 ($11,29 \pm 1,25$)	–
Merontes	<i>n</i> =45	<i>n</i> =40
Comprimento	1,82–3,92 ($3,06 \pm 0,54$)	2,2–9,1 ($3,2 \pm 1,1$)
Largura	1,51–3,73 ($2,39 \pm 0,48$)	1,6–2,8 ($2,2 \pm 0,3$)
Área	3,84–7,49 ($5,5 \pm 0,79$)	3,8–13,3 ($5,1 \pm 1,7$)
Nº de merozoítos	3–8 ($4,54 \pm 0,93$)	3–8 ($5 \pm 0,6$)
Comprimento dos merozoítos	0,53–1,21 ($0,92 \pm 0,12$)	–
Área dos merozoítos	0,32–1,06 ($0,79 \pm 0,15$)	–
Comprimento dos grânulos de pigmento	0,4–1,09 ($0,71 \pm 0,12$)	–
Área dos grânulos de pigmento	0,27–0,86 ($0,51 \pm 0,12$)	0,2–0,7 ($0,4 \pm 0,1$)
Área dos glóbulos	0,27–0,98 ($0,56 \pm 0,19$)	0,1–0,4 ($0,2 \pm 0,1$)
Eritrócitos infectados		
Comprimento	9,26–12,85 ($10,91 \pm 0,84$)	–
Largura	5,23–7,41 ($6,48 \pm 0,47$)	–
Área	9,47–13,79 ($11,8 \pm 1,0$)	–

Continuação

	<i>n</i> =36	<i>n</i> =20
Macrogametócitos		
Comprimento	9,78–15,17 (12,7 ± 1,14)	11,3–12,6 (11,3 ± 0,8)
Largura	1,53–3,52 (2,41 ± 0,33)	1,4–2,6 (2,2 ± 0,3)
Área	19,32–30,68 (24,87 ± 2,87)	19,4–29,1 (24,1 ± 2,9)
Núcleo do gametócito		
Comprimento	1,62–3,43 (2,57 ± 0,44)	1,6–2,5 (1,9 ± 0,3)
Largura	0,61–1,7 (0,91 ± 0,19)	1,0–1,8 (1,4 ± 0,3)
Área	1,39–3,71 (2,38 ± 0,56)	1,4–3,8 (2,1 ± 0,6)
Grânulos de pigmento	2–6 (3,85 ± 0,69)	4–11 (6,3 ± 1,9)
Área dos grânulos de pigmento	0,46–1,36 (0,78 ± 0,22)	–
NDR ^b	0,37–0,94 (0,75 ± 0,13)	–
Eritrócitos infectados		
Comprimento	9,64–12,89 (10,71 ± 0,73)	–
Largura	5,38–7,64 (6,46 ± 0,53)	–
Área	46,21–67,75 (57,43 ± 4,44)	–
Núcleo dos eritrócitos infectados		
Comprimento	4,68–5,85 (5,32 ± 0,38)	–
Largura	2,01–2,77 (2,4 ± 0,2)	–
Área	9,79–13,02 (11,07 ± 0,64)	–
Microgametócitos		
	<i>n</i> =36	<i>n</i> =20
Comprimento	10,14–17,86 (13,46 ± 1,23)	10,2–12,9 (11,6 ± 0,9)
Largura	1,54–3,46 (2,61 ± 0,37)	1,8–2,8 (2,1 ± 0,3)
Área	27,86–32,15 (27,51 ± 3,12)	17,6–26,6 (23,3 ± 3,3)
Núcleo dos gametócitos		
Comprimento	2,54–4,35 (3,35 ± 0,45)	2,5–4,8 (3,5 ± 0,6)
Largura	1,52–3,46 (2,32 ± 0,47)	1,3–1,9 (1,6 ± 0,3)
Área	3,36–7,84 (6,15 ± 1,07)	2,5–4,8 (4,5 ± 1,0)
Grânulos de pigmento	3–8 (4 ± 1,21)	5–9 (6,2 ± 1,5)
Área dos grânulos de pigmento	0,33–1,72 (0,82 ± 0,31)	–
NDR ^b	0,33–0,98 (0,73 ± 0,15)	–
Eritrócitos infectados		
Comprimento	10,05–12,7 (11,12 ± 0,81)	–
Largura	5,46–8,51 (6,8 ± 0,65)	–
Área	51,14–70,93 (60,93 ± 5,61)	–
Núcleo dos eritrócitos infectados		
Comprimento	4,56–6,54 (5,43 ± 0,48)	–
Largura	2,04–3,23 (2,48 ± 0,26)	–
Área	9,95–13,55 (11,64 ± 0,92)	–

^a Todas as medidas estão em micrômetros (µm). ^b NDR (nucleus displacement ratio), deslocamento do núcleo, de acordo com BENNETT & CAMPBELL (1972). – medida não realizada no trabalho de MANTILLA et al. (2013b). Valores mínimos e máximos estão apresentados, seguidos pela média aritmética e desvio padrão em parênteses. *n*: número de formas medidas.

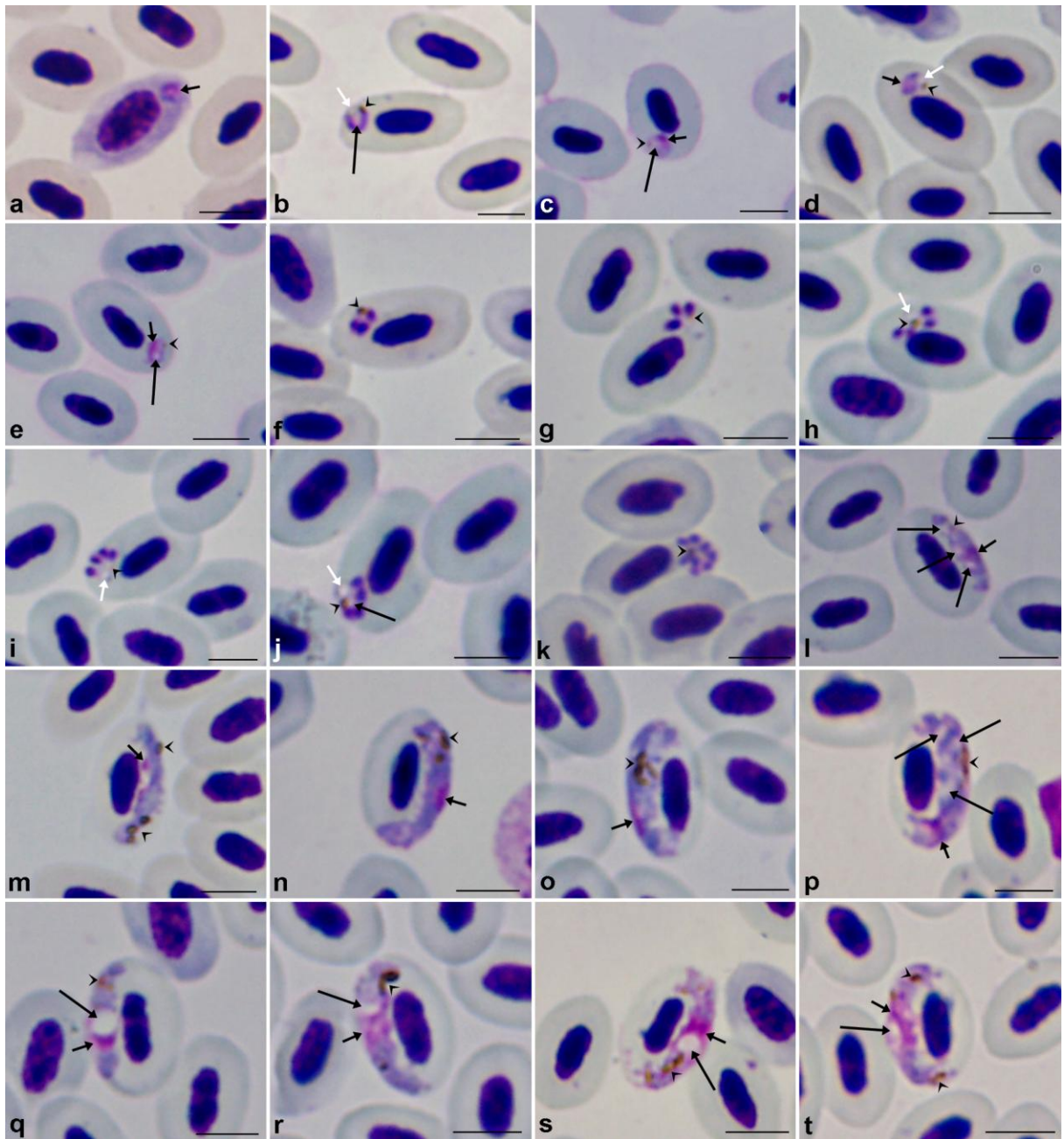


Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium unalis* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Turdus rufiventris* de fragmentos da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Trofozoítos (a–e); merontes (f–k); macrogametócitos (l–p) e microgametócitos (q–t). Setas pretas pequenas indicam o núcleo dos parasitos; setas pretas grandes indicam os vacúolos dos parasitos; setas brancas indicam grânulos refrativos claros; e cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína. Barras = 5 µm.

Macrogametócitos: apresentaram forma alongada e estavam localizados lateralmente ao núcleo do eritrócito parasitado (Figura 1l–p). Foi observado acúmulo de grânulos de hemozoína (Figura 1n–p) e citoplasma granular e denso (Figura 1l–p). A largura máxima das formas maduras foi 3,52 µm (Tabela 2). O núcleo do parasito é pequeno, compacto, e variável na forma, mais frequentemente observado na posição média (Figura 1l–p). Vacúolos no citoplasma foram observados ocasionalmente (Figura 1l, p). Gametócitos maduros geralmente tocam o núcleo e a membrana plasmática do eritrócito parasitado e crescem até atingirem os pólos dos mesmos (Figura 1n–p). As extremidades dos parasitos podem ser irregulares (Figura 1m–p). Grânulos de pigmento foram ovais ou redondos, médios (0,5–1 µm) ou grandes (>1 µm), não numerosos 2–6 ($3,69 \pm 1,03$) (Tabela 2), geralmente acumulados em um ou mais grupos, formando uma massa sólida (Figura 1n–p). Foi observada influência dos gametócitos nos eritrócitos parasitados, podendo deslocar o núcleo lateralmente, NDR=0,37–0,94 ($0,75 \pm 0,13$) (Tabela 2, Figura 1o–p).

Microgametócitos: apresentaram também acúmulo de grânulos de hemozoína e citoplasma granular e denso (Figura 1q–t). A largura máxima encontrada foi de 3,46 µm (Tabela 2). O núcleo é maior do que visto nos macrogametócitos (Tabela 2) e um vacúolo grande (>1µm) pode ser visto em grande parte das formas encontradas, localizado próximo ao núcleo do parasito, muitas vezes observado entre o núcleo (Figura 1q–t). As extremidades dos parasitos são irregulares, mais do que encontrado nos macrogametócitos (Figura 1s–t). Foi observada influência dos gametócitos nos eritrócitos parasitados, podendo deslocar o núcleo lateralmente, NDR=0,33–0,98 ($0,73 \pm 0,15$) (Tabela 2). As outras características são similares aos macrogametócitos, com o usual dimorfismo sexual entre as formas dos hemosporídeos aviários.

3.3.3 Reconstruções filogenéticas

Todas as linhagens de *P. unalis* que foram identificadas e sequenciadas nesse estudo, em todos os métodos de reconstrução filogenética (Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana), agruparam-se em um clado monofilético com inclusão da linhagem previamente caracterizada de *P. unalis* TFUS06 (KF537293), com altos valores de suporte (91/1) e com *P. vaughani* (DQ847271) como grupo irmão (Figura 2). A média de divergência genética entre as sequências foi de 0,73% (min = 0,2% e max = 1,5%) (Tabela 3), o que está de acordo com a identificação morfológica. Esse clado foi dividido em dois sub-clados (A e B na Figura 2) baseados nas relações filogenéticas e na divergência das sequências (Tabela 3). *Plasmodium unalis* TRJB483 (KU573816) foi mais próximo da linhagem previamente caracterizada de *P. unalis* TFUS06 (KF537293), com 0,02% de divergência genética, enquanto *P. unalis* TLJB34 (KU573814) e TLSB1096 (KU573813) foram mais distantes, com 3% de divergência entre as sequências.

A maioria das espécies de hemosporídeos aviários com sequências disponíveis em bancos de dados não estão classificadas ao nível específico. No presente estudo foi usado dois conjuntos de dados, um composto por sequências já identificadas de *P. unalis* dentro do banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009) (Figura 3) e outro, onde foram adicionadas ao conjunto de dados sequências de citocromo *b* intimamente relacionados à *P. unalis*, mas não identificadas (Figura 2), sendo realizadas análises filogenéticas para identificar as unidades operacionais taxonômicas dentro do clado de *P. unalis* (Figura 2). Esta análise pode fornecer uma visão mais ampla da variabilidade genética intra-específica e melhorar a nossa compreensão da gama de possíveis hospedeiros deste hemoparasito. Estes resultados indicam que, além de Turdidae, espécies que pertencem a Galbulidae, Muscicapidae e Bucconidae, podem também ser susceptíveis a infecção com este hemoparasito.

Um segundo parasito encontrado nas amostras de sangue de *T. rufiventris* e *T. leucomelas* foi morfologicamente e molecularmente identificado como *P. lutzii* (TRJB16, KU573819) (Figura 4). Nas análises filogenéticas do presente estudo a linhagem TRJB16 formou um clado monofilético com outra sequência previamente caracterizada como *P. lutzii*, bem como com outras sequências morfologicamente não caracterizadas, apresentando altos valores de suporte (87/97) (Figura 2).

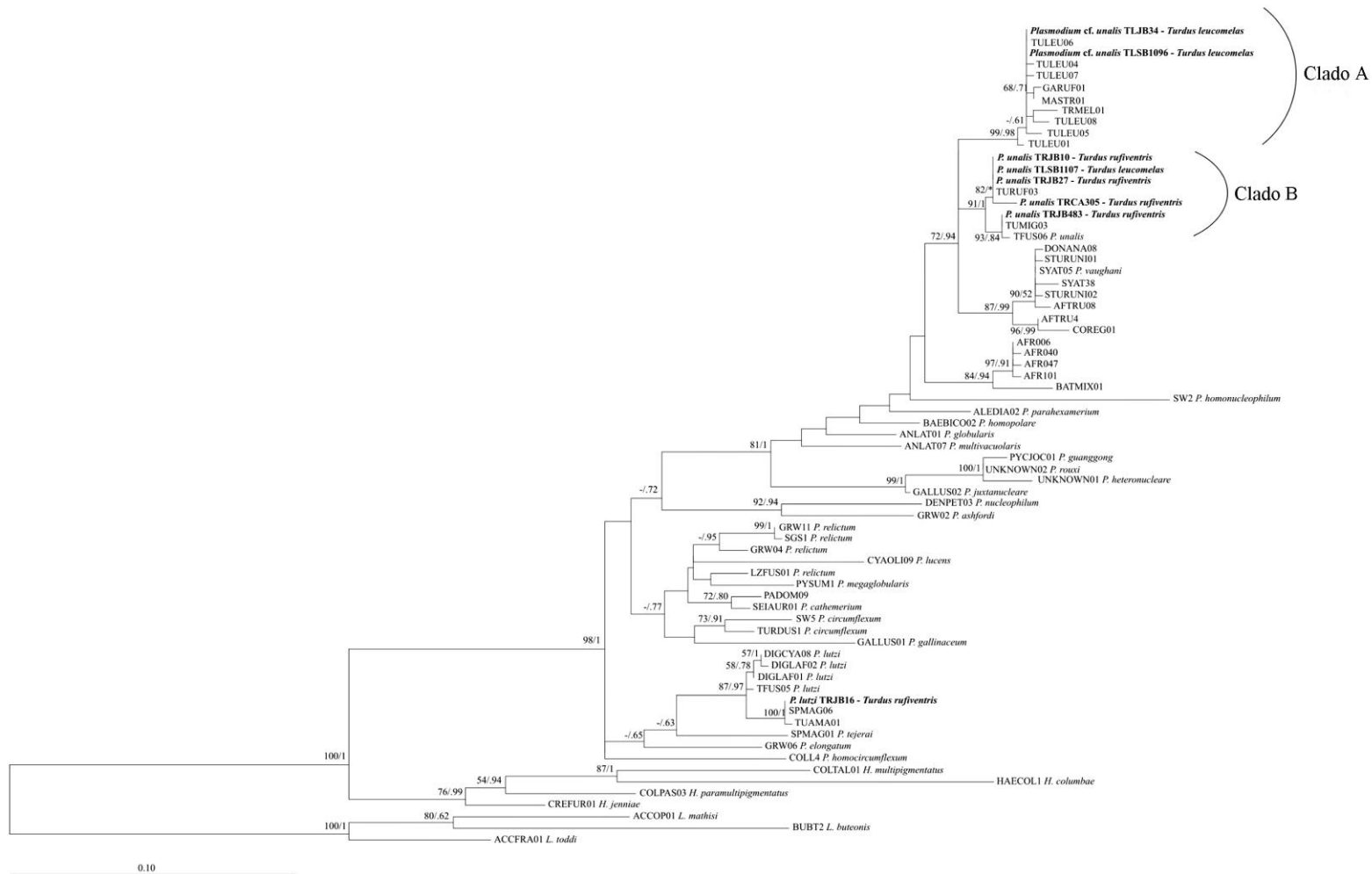


Figura 2. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos clados (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

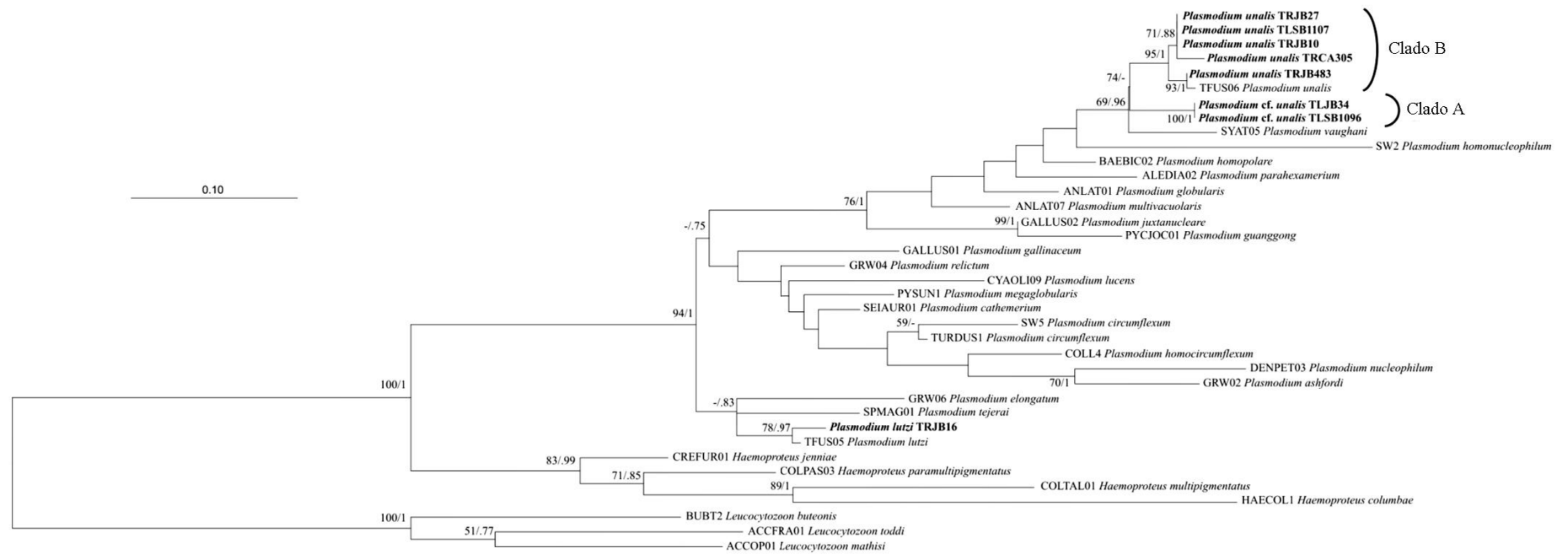


Figura 3. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de algumas espécies identificadas de hemossporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos clados (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

Tabela 3. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* entre *Plasmodium unalis* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. As divergências genéticas estão dadas em porcentagem.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 <i>Plasmodium cf. unalis</i> (TLJB34)	0,0																										
2 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU06)	0,0	0,0																									
3 <i>Plasmodium cf. unalis</i> (TLJB1096)	0,0	0,0	0,0																								
4 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU04)	0,2	0,2	0,2	0,0																							
5 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU07)	0,2	0,2	0,2	0,4	0,0																						
6 <i>Plasmodium</i> sp. (GARUF01)	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,0																					
7 <i>Plasmodium</i> sp. (MASTR01)	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,0																				
8 <i>Plasmodium</i> sp. (TRMEL01)	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	1,3	1,0	0,0																			
9 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU08)	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	0,8	1,0	0,0																		
10 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU05)	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	0,6	1,3	1,0	0,0																	
11 <i>Plasmodium</i> sp. (TULEU01)	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	0,6	1,3	1,0	0,8	0,0																
12 <i>Plasmodium unalis</i> (TRJB483)	2,7	2,7	2,7	2,9	2,9	3,1	2,9	2,7	3,3	2,7	2,7	0,0															
13 <i>Plasmodium</i> sp. (TUMIG03)	2,7	2,7	2,7	2,9	2,9	3,1	2,9	2,7	3,3	2,7	2,7	0,0	0,0														
14 <i>Plasmodium unalis</i> (TFUS06)	2,9	2,9	2,9	3,1	3,1	3,3	3,1	2,9	3,6	2,9	2,9	0,2	0,2	0,0													
15 <i>Plasmodium unalis</i> (TRCA305)	3,1	3,1	3,1	3,4	3,4	3,1	2,9	3,1	3,8	3,1	3,1	1,3	1,3	1,5	0,0												
16 <i>Plasmodium</i> sp. (TURUF03)	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7	2,5	2,3	2,5	3,1	2,5	2,5	0,6	0,6	0,8	0,6	0,0											
17 <i>Plasmodium unalis</i> (TRJB27)	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7	2,5	2,3	2,5	3,1	2,5	2,5	0,6	0,6	0,8	0,6	0,0	0,0										
18 <i>Plasmodium unalis</i> (TRJB10)	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7	2,5	2,3	2,5	3,1	2,5	2,5	0,6	0,6	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0									
19 <i>Plasmodium unalis</i> (TLSB1107)	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7	2,5	2,3	2,5	3,1	2,5	2,5	0,6	0,6	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0								
20 <i>Plasmodium</i> sp. (AFTRU4)	3,6	3,6	3,6	3,8	3,8	4,0	3,8	3,6	4,2	3,6	3,6	2,9	2,9	3,1	3,4	2,7	2,7	2,7	2,7	0,0							
21 <i>Plasmodium</i> sp. (COREG01)	4,4	4,4	4,4	4,6	4,6	4,8	4,6	4,0	5,0	4,4	4,4	3,3	3,3	3,6	4,2	3,6	3,6	3,6	3,6	0,8	0,0						
22 <i>Plasmodium</i> sp. (AFTRU08)	4,0	4,0	4,0	4,2	4,2	4,0	4,2	4,0	4,6	4,0	4,0	3,3	3,3	3,1	3,8	3,1	3,1	3,1	3,1	1,7	2,5	0,0					
23 <i>Plasmodium</i> sp. (SYAT38)	4,2	4,2	4,2	4,4	4,4	4,2	4,4	4,2	4,8	4,2	4,2	3,6	3,5	3,8	4,0	3,3	3,3	3,3	3,3	1,9	2,7	1,0	0,0				
24 <i>Plasmodium</i> sp. (STURUNI02)	3,8	3,8	3,8	4,0	4,0	3,8	4,0	3,8	4,4	3,8	3,8	3,1	3,1	3,3	3,6	2,9	2,9	2,9	2,9	1,5	2,3	0,6	0,8	0,0			
25 <i>Plasmodium vaughani</i> (SYAT05)	3,6	3,6	3,6	3,8	3,8	3,6	3,8	3,6	4,2	3,6	3,6	2,9	2,9	3,1	3,4	2,7	2,7	2,7	2,7	1,3	2,1	0,4	0,6	0,2	0,0		
26 <i>Plasmodium</i> sp. (DONANA08)	3,8	3,8	3,8	4,0	4,0	3,8	4,0	3,8	4,4	3,8	3,8	3,1	3,1	3,3	3,6	2,9	2,9	2,9	2,9	1,5	2,3	0,6	0,8	0,4	0,2	0,0	
27 <i>Plasmodium</i> sp. (STURUNI01)	3,8	3,8	3,8	4,0	4,0	3,8	4,0	3,8	4,4	3,8	3,8	3,1	3,1	3,3	3,6	2,9	2,9	2,9	2,9	1,5	2,3	0,6	0,8	0,4	0,2	0,4	0,0

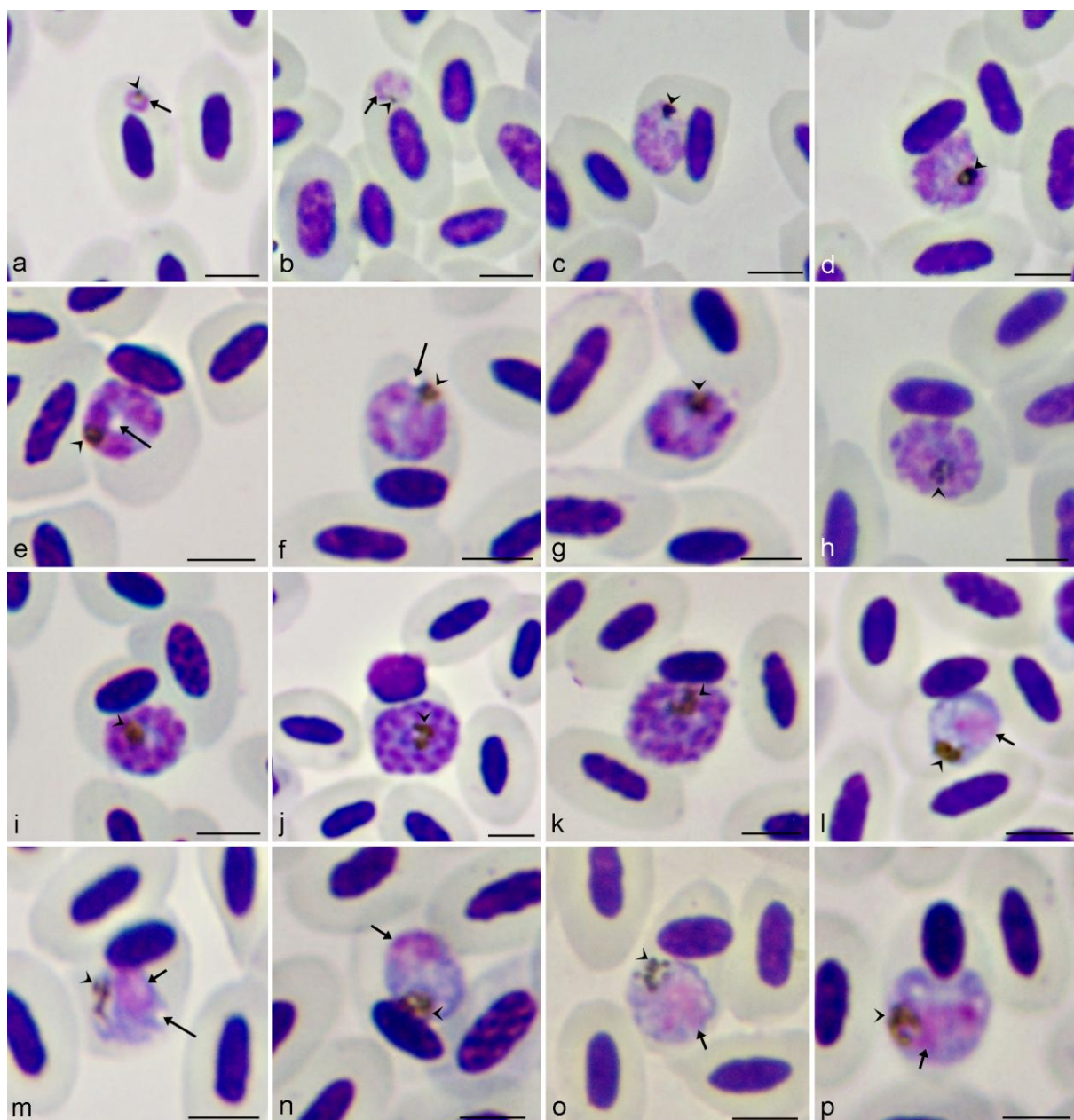


Figura 4. Formas eritrocíticas de *Plasmodium lutzii* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Turdus leucomelas* de fragmentos da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Trofozoítos (a, b); merontes (c–k); macrogametócitos (l–p). Setas pretas pequenas indicam o núcleo dos parasitos; setas pretas grandes indicam os vacúolos dos parasitos; e cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína. Barras = 5 μ m.

3.3.4 Observações

As linhagens de *P. unalis* descritas na presente estudo foram identificadas primariamente baseadas nas relações filogenéticas entre os parasitos e por apresentar semelhanças morfológicas com as descritas por MANTILLA et al. (2013b), tais como (1) a presença de um grânulo de pigmento único, grande e de forma circular em trofozoítos e merontes eritrocíticos; (2) presença de vacúolos em trofozoítos e merontes eritrocíticos jovens; (3) merontes apresentando frequentemente formato de leque ou roseta; (4) presença de glóbulos refrativos claros em trofozoítos e merontes; (5) macrogametócitos e microgametócitos apresentam acúmulo de grânulos de hemozoína e (6) macrogametócitos e microgametócitos apresentam citoplasma granular e denso. As três primeiras características ainda diferenciam a espécie de outras do subgênero *Novyella*, como *P. vauhani*, que morfológicamente é similar a *P. unalis*.

As linhagens de *P. unalis* TLJB34 (KU573814) e TLSB1096 (KU573813) encontradas em *T. leucomelas* e que formaram um clado separado nas análises filogenéticas (Figura 2), com divergência genética de 3% (Tabela 3) e apresentaram características morfológicas um pouco distintas das encontradas nas outras linhagens, como (1) merontes eritrocíticos que não possuíam um formato de leque; (2) núcleo dos macrogametócitos um pouco menor; (3) diferenças no número e distribuição de grânulos de hemozoína nos macro e microgametócitos; (4) grânulos de hemozoína nos macro e microgametócitos se apresentaram menos acumulados; e (5) ausência de vacúolos grandes nos microgametócitos. Estas diferenças morfológicas e a divergência genética de 3% podem estar relacionadas com um polimorfismo intraespecífico, no entanto, a baixa prevalência da infecção e parasitemia, não permitiram uma análise morfológica e morfométrica mais aprofundada, requerendo futuros estudos mais detalhados.

3.3.5 Sumário taxonômico

Sequências de DNA: Linhagens do gene mitochondrial citocromo *b*: TRJB10, TLSB1107, TRJB27, TRCA305, TRJB483, TLJB34 e TLSB1096 (478 bp, números de acesso no GenBank: KU573813, KU573814, KU573815, KU573816, KU573817, KU573818 e KU573820).

Local da infecção: Eritrócitos maduros, sendo que trofozoítos podem ser também encontrados em eritrócitos imaturos.

Prevalência: Entre as 90 aves analisadas no presente estudo, 58 estavam infectadas com a espécie *P. unalis*, com prevalência total de 64,44%. Entre elas 47 eram da espécie *T. rufiventris* (prevalência de 52,22%), 9 *T. leucomelas* (prevalência de 10%), 1 *T. albicollis* (prevalência de 1,11%) e 1 *T. flavipes* (prevalência de 1,11%).

Hospedeiros adicionais: O parasito foi registrado em quatro espécies adicionais do gênero *Turdus* (*T. rufiventris*, *T. leucomelas*, *T. albicollis* e *T. flavipes*).

Distribuição geográfica adicional: No presente estudo a espécie foi encontrada em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil (Tabela 1).

Esfregaços sanguíneos representativos: Esfregaços representativos da espécie foram depositados na coleção do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (números de acesso: lâminas 10, 27, 34, 305, 483, 1096 e 1107).

3.4 DISCUSSÃO

Espécies do gênero *Turdus* tem sido frequentemente reportadas como hospedeiros de diferentes hemsporídeos em várias partes do mundo (DURRANT et al., 2006; MERINO et al., 2008; BEADELL et al., 2009; KIM et al., 2009; LOBATO et al., 2011; EWEN et al., 2012; MANTILLA et al., 2013a; b; DROVETSKI et al., 2014; OAKGROVE et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2015; LUTZ et al., 2015; MATÍNEZ-DE LA PUENTE et al., 2015). No Brasil, *Plasmodium* spp. foram observadas em *Turdus* spp. por RIBEIRO et al. (2005), SEBAIO et al. (2010; 2012), LOBATO et al. (2011), BELO et al. (2011), FECCHIO et al. (2013) e LACORTE et al. (2013). Com exceção de LACORTE et al. (2013), onde foi identificada a espécie *P. elongatum* baseando-se nas análises filogenéticas, todos os outros trabalhos não identificaram os parasitos ao nível específico. Nesses estudos prévios a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. encontrada foi menor quando comparada à infecção por *P. unalis* observada no presente estudo (64,44%). Essa prevalência pode ser explicada por diferenças na susceptibilidade à infecção, associada com a genética, comportamento, exposição aos parasitos ou fatores ambientais (MARINI et al., 1996; LEE et al., 2006).

Segundo VALKIŪNAS (2005), espécies da família Turdidae tem uma tendência a ser mais susceptíveis a infecções por *Plasmodium* spp., sendo uma das famílias com mais alta prevalência de infecção entre os Passeriformes. Uma das principais razões destacadas pelo autor é o tamanho dos indivíduos dessa família, que podem ser mais atrativos e mais convenientes para os vetores (insetos dípteros hematófagos). MANTILLA et al. (2013a) sugeriram ainda que os membros desta família podem criar uma resposta imunológica que controla a infecção, mantendo uma parasitemia baixa, permitindo assim a sobrevivência tanto do parasito como do hospedeiro.

Plasmodium unalis foi originalmente descrito em associação com *Turdus fuscater* em áreas de altitude da Colômbia. Essa ave não é uma espécie migratória e sua distribuição está restrita aos Andes da Venezuela à Bolívia (RIDGELY & TUDOR, 2009). Esse é o primeiro registro de *P. unalis* para as quatro espécies de aves (*T. rufiventris*, *T. leucomelas*, *T. albicollis* e *T. flavipes*). Morfologicamente, a espécie foi identificada com base nas características apresentadas na descrição original. Algumas diferenças na morfologia foram observadas, como trofozoítos em formato de anel foram observados (Figura 1b), o número de merozoítos que foi em sua maioria igual a quatro (Figura 1h–j), a largura dos macrogametócitos e microgametócitos que excederam 2,6 μm e 2,8 μm , respectivamente (Tabela 2), os gametócitos atingiram os pólos dos eritrócitos no comprimento (Figura 1n–p, r–t) e poucos vacúolos foram observados no citoplasma dos parasitos (Tabela 2, Figura 1l–t).

As linhagens de *P. unalis* TLJB34 e TLSB1096 foram encontradas em *T. leucomelas* na mesma região geográfica, mas exibiram sutis diferenças nas características morfológicas quando comparadas as outras linhagens (TRJB10, TLSB1107, TRJB27, TRCA305 e TRJB483), o que pode representar polimorfismos intraespecíficos, como (1) merontes que não exibiam forma de leque; (2) núcleos menores nos macrogametócitos; (3) diferenças no número e distribuição de grânulos de pigmento de macro e microgametócitos; (4) grânulos de pigmento nos macro e microgametócitos apresentaram menor acúmulo; e (5) a ausência de grandes vacúolos em microgametócitos. Essas linhagens (TLJB34 e TLSB1096) formaram um clado distinto, agrupando-se com linhagens de aves do sudeste do Brasil depositadas por LACORTE et al. (2013). Esses dois clados de *P. unalis* (A e B, Figura 2) apresentaram sequências com divergência genética média de 3%. As diferenças morfológicas entre espécies dos clados A e B (Figura 2) pode não ser suficientes para a atribuição de uma nova espécie, porque a baixa prevalência de infecção e parasitemia nos hospedeiros não permitiu uma análise morfológica e morfométrica mais detalhada. Embora haja alta divergência genética

(3%) entre as linhagens, são necessários dados sobre a biologia e ecologia das espécies que compõe os dois cladogramas (A e B), como uma maior amostragem de aves da espécie *T. leucomelas* na região do estudo, infecção experimental para análise da fase exoeritrocítica, estudos de formas em vetores e análise filogenética multigênica, para esclarecer se são duas espécies ou polimorfismo de *P. unalis*.

Estudos prévios com espécies de *Plasmodium* em aves relataram divergências entre espécies podem variar de cerca de 3% (VALKIŪNAS et al., 2008a; 2009; 2014; WALTHER et al., 2014) até 11,7% (VALKIŪNAS et al., 2008c). As divergências genéticas de *P. unalis* registradas por MANTILLA et al. (2013b) foram 3,2% e 4% com *P. vaughani* e *P. parahexamerium*, respectivamente e 3% com *P. vaughani* de acordo com GONZÁLEZ et al. (2015). Uma definição clara de como as espécies de hemosporídeos aviários podem ser distinguidas com base em diferenças morfológicas de formas eritrocitárias e divergência de sequências do gene *cyt b* ainda não foi estabelecida (MANTILLA et al., 2013b). OUTLAW & RICKLEFS (2014) propuseram três divergências genéticas, 1%, 3% e 5%, para separação de espécies baseado em no marcador molecular *cyt b*, onde sequências com divergência >1% são consideradas novas e devem ser estudadas como potencialmente novas espécies de hemosporídeos. As sequências que diferem em pelo menos 3% ou 5% são consideradas diferentes e muitas vezes apresentam diferenças morfológicas e isso pode ou não levar à identificação de uma nova espécie. No entanto, a delimitação de espécies baseada unicamente em marcadores genéticos é uma tarefa desafiadora devido à variação genética intraespecífica em hemosporídeos aviários. Em alguns casos, a variação intraespecífica pode atingir 2,6% (VALKIŪNAS et al., 2008a), enquanto que em outros casos, características morfológicas distintas estão associados a divergência genética interespecífica de aproximadamente 1% (HELLGREN et al., 2007; LEVIN et al., 2012; DIMITROV et al., 2014). *Plasmodium homocircumflexum*, a primeira espécie críptica entre os hemosporídeos aviários, foi descrita por PALINAUSKAS et al. (2015), apresentou divergência de 5,5% com *P. circumflexum* (TURDUS1) e características morfológicas idênticas. No presente estudo, apenas a divergência de 3% do clado com as linhagens TLJB34 e TLSB1096 não é o bastante para indicar uma espécie críptica e as diferenças observadas na morfologia podem representar polimorfismos intraespecíficos e não são suficientes para caracterizar uma nova espécie.

Podemos concluir que a verdadeira diversidade de hemosporídeos aviários ainda é largamente subestimada e que mais estudos combinando análises morfológicas e moleculares, como o presente trabalho, são necessários para a exata caracterização / identificação de espécies, além de auxiliar na compreensão das interações parasitos-hospedeiros na Mata Atlântica brasileira, onde estes dados são escassos. Dado a enorme diversidade aviária e de vetores na região de estudo, pode haver um número elevado de espécies de hemoparasitos ainda não descritas.

3.5 CONCLUSÕES

1. Espécies do gênero *Turdus* amostrados em fragmentos da Mata Atlântica de Minas Gerais apresentam infecção por *Plasmodium unalis* e por *Plasmodium lutzi* (*Turdus rufiventris* e *Turdus leucomelas*);
2. *Turdus rufiventris*, *Turdus leucomelas*, *Turdus albicollis* e *Turdus flavipes* são registrados como novos hospedeiros de *P unalis*;
3. *Plasmodium unalis* pode exibir polimorfismo e divergência genética acentuados, mesmo em hospedeiros amostrados na mesma região;

CAPÍTULO II

4 REDESCRIÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE *Plasmodium* (*Novyella*) *paranucleophilum* Manwell & Sessler, 1971 EM AVES DA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE BRASILEIRO MANTIDAS EM CATIVEIRO

RESUMO

Hemoparasitos do gênero *Plasmodium* são agentes causadores da malária aviária em várias partes do mundo. Apesar da grande diversidade da avifauna brasileira, poucos estudos ainda são realizados com hemosporídeos de aves silvestres da Mata Atlântica, principalmente daquelas mantidas em cativeiro. Assim, o presente estudo teve por objetivo redescrever a espécie *Plasmodium paranucleophilum*, utilizando caracterização multidisciplinar, com análises morfológicas, morfométricas, moleculares e filogenéticas. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 61 aves de 13 espécies da Mata Atlântica mantidas em cativeiro no sudeste brasileiro, para realização da caracterização morfométrica e morfológica, amplificação de fragmentos de DNA do gene mitocondrial citocromo *b*, sequenciamento e análises filogenéticas. Dentre as 61 aves analisadas, nove estavam infectadas por *P. paranucleophilum*, apresentando prevalência total de 14,75% e a parasitemia média de 0,58%. Seis espécies foram registradas como novos hospedeiros para esse parasito (*Asio clamator*, *Pulsatrix koeniswaldiana*, *Buteo brachyurus*, *Rupornis magnirostris*, *Caracara plancus* e *Falco peregrinus*). As descrições morfológica e morfométrica desse parasito foram ampliadas. Nas análises filogenéticas, as espécies *P. paranucleophilum* e *P. nucleophilum* formaram clados separados com alto valor de suporte, sendo que a divergência genética média de linhagens das duas espécies foi de 2,48%. Este estudo contribui com novos dados morfológicos e moleculares acerca dos hemosporídeos de aves silvestres no Brasil, e destaca a necessidade de ampliação destes estudos uma vez que, a real diversidade de hemosporídeos aviários no país ainda é pouco conhecida e dada à enorme diversidade de vetores e espécies de aves, pode haver grande número de espécies desses hemoparasitos ainda não descritas.

Palavras-chave: Malária aviária. Haemosporida. Aves Neotropicais. *Plasmodium* spp. Mata Atlântica.

ABSTRACT

Blood parasites of the genus *Plasmodium* are agents that cause avian malaria in many parts of the world. Despite the great diversity of Brazilian avifauna, few studies are conducted with haemosporidian of wild birds particularly those kept in captivity. Thus, this study aimed to redescribe the *Plasmodium paranucleophilum* species, using multidisciplinary characterization, with morphological, morphometric, molecular and phylogenetic analyzes. For this, blood samples were collected from 61 birds of 13 species of the Atlantic Forest in captivity in southeastern Brazil, to perform the morphometric and morphological characterization, amplification of DNA fragments of mitochondrial cytochrome *b* gene, sequencing and phylogenetic analysis. Among the 61 birds analyzed, nine were infected by *P. paranucleophilum*, presenting a total prevalence of 14.75% and a mean parasitemia of 0.58%. Six species were recorded as new hosts for this parasite (*Asio clamator*, *Pulsatrix koeniswaldiana*, *Buteo brachyurus*, *Rupornis magnirostris*, *Caracara plancus* and *Falco peregrinus*). The morphological and morphometric descriptions of this parasite were amplified. In the phylogenetic analyzes, the *P. paranucleophilum* and *P. nucleophilum* species formed separate clades with a high support value. The mean genetic divergence of the two species was 2.48%. This study provides new morphological and molecular data on haemosporidian of wild birds in Brazil, but also highlights the need to expand these studies since, the true diversity of avian haemosporidian in the country is still little known and given the enormous diversity of vectors and bird species, there may be many species of these blood parasites not described yet.

Keywords: Avian malaria. Haemosporida. Neotropical birds. *Plasmodium* spp. Atlantic Forest.

4.1 INTRODUÇÃO

Hemosporídeos do gênero *Plasmodium* (Apicomplexa, Haemosporida) são protozoários hemoparasitos com ciclos de vida complexos envolvendo fêmeas de mosquitos da família Culicidae como hospedeiros definitivos e animais vertebrados como hospedeiros intermediários, incluindo répteis, aves e mamíferos (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Dentre esses parasitos está o gênero *Plasmodium*, que possui cerca de 80 morfoespécies descritas causando malária em aves no mundo todo (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2007; 2008a; 2009; 2016; ZEHTINDJIEV et al., 2012; MANTILLA et al., 2013a; 2013b; CHAGAS et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013; VANTREELS et al., 2014; 2015; WALTHER et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015), das quais destaca-se a espécie pertencente ao subgênero *Novyella*, *Plasmodium paranucleophilum* Manwell & Sessler, 1971, que tem como principais características apresentar merontes eritrocíticos e gametócitos muito próximos aos núcleos dos eritrócitos infectados (nucleofílicos), merontes maduros que não deslocam o núcleo do eritrócito e gametócitos com comprimento maior que 10 µm e que podem deslocar o núcleo do eritrócito (VALKIŪNAS, 2005). Essa espécie de parasito foi encontrada e descrita no Brasil no ano de 1971 por MANWELL & SESSLER, em um Passeriforme do gênero *Tachyphonus*, e desde então não foi mais registrada, até o presente estudo.

No Brasil, poucos estudos tem sido realizados com hemosporídeos de aves silvestres da Mata Atlântica, principalmente daquelas mantidas em cativeiro (BELO et al., 2009; FERREIRA JÚNIOR, 2012; ANDERY et al., 2013; CHAGAS et al., 2015; TOSTES et al., 2015a; 2015b), as quais podem apresentar alta prevalência de infecção por hemosporídeos, como já demonstrado (BELO et al., 2009; VANSTREELS et al., 2014; TOSTES et al., 2015a), podendo levar ao desenvolvimento de alterações bioquímicas e histopatológicas em vários órgãos (TOSTES et al., 2015b) ou à morte (GARDINER et al., 1984; FERREL et al., 2007; DONOVAN et al., 2008; OLIAS et al., 2011; SCAGLIONE et al., 2016). Assim, dados de prevalência e parasitemia de hemosporídeos em aves mantidas em cativeiro são importantes por fornecerem informações sobre a infecção desses hemoparasitos em aves que dificilmente são capturadas em condições naturais, como aves de rapina e por auxiliarem na conservação de algumas espécies, por meio do desenvolvimento de novas medidas para manutenção e tratamento de aves mantidas em cativeiro a partir destas informações sobre as taxas de parasitismo.

Com o uso de marcadores genéticos, como os do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*), para aplicação de código de barras (“*barcoding*”) em hemosporídeos aviários, mais de 700 linhagens de *Plasmodium* spp. foram identificadas e depositadas no banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009). Apesar do grande número de estudos, um número crescente de sequências é depositado sem dados morfológicos e/ou identificado apenas ao nível de gênero, com apenas 20% das linhagens desses parasitos associadas a descrições morfológicas (CLARK et al., 2015). Portanto são necessários mais estudos que utilizem a taxonomia integrativa, usando várias metodologias para a identificação e caracterização de espécies, combinando o uso de dados morfológicos e moleculares (VALKIŪNAS et al., 2008b; 2014; 2016; BRAGA et al., 2011; CLARK et al., 2015; PALINAUSKAS et al., 2015). Desse modo, os objetivos do presente estudo foram redescrever de forma multidisciplinar a espécie *Plasmodium paranucleophilum*, utilizando caracterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue

Foi amostrado, no período de janeiro a julho de 2013, um total de 61 aves, pertencentes a 13 espécies das ordens Passeriformes, Strigiformes, Accipitriformes, Falconiformes e Cathartiformes (Tabela 1), mantidas em cativeiro em uma sede do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no município de Seropédica, Rio de Janeiro (22°43'S, 43°42'O). Essa sede do IBAMA recebe aves apreendidas pela polícia florestal ou entregues pela população de localidades próximas à cidade de Seropédica. Informações acerca do tempo de permanência destas aves em cativeiro, não foram disponibilizadas. As aves foram capturadas com auxílio de puçá e amostras de sangue (aproximadamente 30µL) foram coletadas por punção na veia braquial ou metatarsal, para análises microscópicas e moleculares. As aves utilizadas nesse estudo foram identificadas por comparação com as pranchas disponíveis em RIDGELY & TUDOR (2009) e SIGRIST (2014), baseadas em análises morfométricas e observações de características fenotípicas como tamanho, plumagem, bico, cor da íris e pernas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo nº 121/2014) (Anexo C) e ainda pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitações número 39534-2 (Anexo D).

4.2.2 Análises morfológicas e morfométricas

Foram feitos pelo menos quatro esfregaços sanguíneos de cada ave para cálculo da prevalência de infecção, da parasitemia e para identificação e caracterização morfológica das espécies de hemoparasitos encontradas. Os esfregaços foram secados ao ar, fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos e corados pelo Giemsa (Eosina e Azul de Metileno) por aproximadamente 40 minutos, na diluição de 1:9 em água destilada. Os esfregaços foram analisados sob lente de imersão em microscópio de campo claro Olympus BX-51 (Tóquio, Japão) em aumento de 600x durante 20 min e 100 campos microscópicos foram observados em aumento de 1000x para cálculo da prevalência segundo BUSH et al. (1997) e da parasitemia (intensidade de infecção), onde o número de formas de cada parasito foi quantificado (GODFREY et al. 1987). Para preparação de imagens e realização de análises morfométricas foi utilizado microscópio de campo claro Olympus BX-51 equipado com sistema de captura e análise de imagem (Image Pro Plus 6.0), onde foram medidas características morfológicas descritas em VALKIŪNAS (2005) e WALTHER et al. (2014), além do comprimento, largura e área dos pigmentos encontrados nos gametócitos, comprimento, largura e área dos merozoítos e comprimento, largura e área dos vacúolos encontrados nos gametócitos. Para calcular a taxa de deslocamento do núcleo (“*nucleus displacement ratio*”, NDR) de acordo com BENNETT & CAMPBELL (1972), a fórmula $2X/(X + Y)$ foi usada, onde Y representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo do eritrócito no lado ocupado pelo parasito e X representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo do eritrócito no lado não ocupado pelo parasito.

4.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. O DNA total do sangue de aves positivas na análise microscópica foi extraído usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as instruções do

fabricante. *Nested-PCR* foi utilizada para amplificar um fragmento final do gene mitocondrial citocromo *b* de 479-bp. Na primeira reação os iniciadores propostos por HELLGREN et al. (2004), HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') foram utilizados. Esses iniciadores amplificam fragmentos de DNA de espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Na segunda reação, os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), propostos por BENSCH et al. (2000) foram usados para amplificar fragmentos de 479bp dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Esses iniciadores vem sendo usados em muitos estudos de hemosporídeos aviários (VALKIŪNAS et al., 2008a; 2014; ZEHTINDJIEV et al., 2012; 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; GUTIÉRREZ-LÓPEZ et al., 2015; IVANOVA et al., 2015) e foram considerados por BERNOTIENĖ et al. (2016) os melhores iniciadores para amplificação de DNA de hemosporídeos aviários em infecções simples. A primeira reação consistiu em um volume final de 25µL, onde foram utilizados 12,5µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10µM (HaemFNI e HaemR2), 5µL de DNA genômico e água deionizada para completar o volume até 25µL. Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, e extensão final em 72°C por 10 min (HELLGREN et al., 2004). As mesmas condições foram usadas na segunda reação, exceto que 1µL do produto da primeira reação foi utilizado substituindo o DNA genômico e 1µL dos iniciadores HaemF e HaemR2 a uma concentração de 10µM foram usados. Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 2% com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob luz ultravioleta. Todos os produtos amplificados foram purificados usando o kit de purificação QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os eletroferogramas foram visualizados no programa Geneious 6.0 (KEARSE et al., 2012) e amostras que não apresentaram eletroferogramas de boa qualidade foram descartadas.

4.2.4 Análises filogenéticas

Reconstruções filogenéticas foram feitas usando sequências do gene *cyt b* de hemosporídeos aviários obtidas dos bancos de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009) e GenBank e de sequências dos parasitos obtidas no presente estudo. O conjunto de dados foi alinhado usando o programa MAFFT ver. 7.055b, empregando o método progressivo (FFT-NS-2) (KATO & STANDLEY, 2013). O conjunto de dados alinhado foi manualmente verificado, onde foram removidas sequências relacionadas com os iniciadores e de locais ambíguos. Após isso as sequências foram cortadas para produzir um conjunto de dados de igual comprimento (479bp) usando o programa SeaView ver. 4.6 (GOUY et al., 2010). jModelTest_2.1.4 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003) foi usado para selecionar o melhor modelo de substituição evolutivo sob o critério de informação de Akaike. A análise por Inferência Bayesiana (BI) foi realizada usando o programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), onde o modelo GTR + G + I foi aplicado. Duas corridas independentes de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) compostas cada uma, de uma cadeia fria e 3 quentes foram realizadas ao longo de 1 milhão de gerações aplicando-se ao final um “burn-in” de 25% (25% das primeiras árvores geradas foram descartadas da análise). A análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi feita usando o programa PhyML v3.0 (GUINDON et al., 2010), aplicando o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I. A confiabilidade dos ramos internos foi avaliada usando o método “bootstrap” não paramétrico

com 1000 psedorélicas. As árvores resultantes foram visualizadas no programa FigTree 1.4.2. Para cálculo da divergência genética entre as sequências obtidas no presente estudo e outras já depositadas em bancos de dados foi utilizado o programa SeaView ver. 4.6 (GOUY et al., 2010), usando as distâncias observadas (sem correções).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Prevalência e intensidade de infecção

Dentre as 61 aves amostradas em 29,5% (n=18) foram encontradas evidências microscópicas e moleculares de infecção por *Plasmodium* spp., sendo a maioria infectada por *Plasmodium paranucleophilum* (prevalência total de 14,75% [n=9]). As espécies infectadas foram *Asio clamator* (Vieillot, 1808) (4,91% [n=3]); *Pulsatrix koeniswaldiana* (Bertoni & Bertoni, 1901) (1,63% [n=1]); *Buteo brachyurus* Vieillot, 1816 (1,63% [n=1]); *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) (1,63% [n=1]); *Caracara plancus* (Miller, 1777) (3,27% [n=2]); e *Falco peregrinus* Tunstall, 1771 (1,63% [n=1]) (Tabela 1). Este é o primeiro registro de *P. paranucleophilum* desde sua descrição original por MANWELL & SESSLER (1971b) e o primeiro estudo a demonstrar que esse parasito pode infectar uma ampla variedade de espécies de aves. A parasitemia média foi de 0,58% ($\pm 1,25$), sendo a espécie *R. magnirostris* a mais parasitada, com parasitemia de 3,88%.

Tabela 1. Aves amostradas no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA) de Seropédica, Rio de Janeiro, número de aves examinadas e número de aves parasitadas por *Plasmodium paranucleophilum* baseado na PCR e microscopia.

Ordem/ Família / Espécies de aves	Nº de aves examinadas	Nº de aves parasitadas
Passeriformes		
Thraupidae		
<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye, 1837	20	0
Strigiformes		
Strigidae		
<i>Asio clamator</i> (Vieillot, 1808)	4	3
<i>Pulsatrix koeniswaldiana</i> (Bertoni & Bertoni, 1901)	2	1
<i>Strix virgata</i> (Cassin, 1849)	2	0
Accipitriformes		
Accipitridae		
<i>Buteo albonotatus</i> Kaup, 1847	1	0
<i>Buteo brachyurus</i> Vieillot, 1816	2	1
<i>Geranoaetus albicaudatus</i> (Vieillot, 1816)	1	0
<i>Heterospizias meridionalis</i> (Latham, 1790)	2	0
<i>Rupornis magnirostris</i> (Gmelin, 1788)	5	1
Falconiformes		
Falconidae		
<i>Caracara plancus</i> (Miller, 1777)	14	2
<i>Falco femoralis</i> Temminck, 1822	2	0
<i>Falco peregrinus</i> Tunstall, 1771	3	1
Cathartiformes		
Cathartidae		
<i>Coragyps atratus</i> (Bechstein, 1793)	3	0
Total	61	9 (14,75%)

4.3.2 Redescrição de *Plasmodium* (*Novyella*) *paranucleophilum*

Alguns trofozoítos foram observados em trombócitos (Figura 1a). Fanerozoítos foram observados em linfócitos (Figura 1b–c). Assim como na descrição original, foi observado

aumento da quantidade de citoplasma e presença de vacúolos nos linfócitos infectados (Figura 1c), entretanto formas livres no sangue não foram encontradas. Todas as outras formas foram encontradas em eritrócitos maduros (Figura 1d–y). A morfometria completa das formas eritrocíticas está apresentada na Tabela 2.

Trofozoítos: foram vistos em eritrócitos maduros (Figura 1d–g) e em alguns trombócitos (Figura 1a), o que não foi comumente encontrado. O formato de anel não foi característico das formas mais maduras (Figura 1e–g), mas foi observado ocasionalmente nas formas mais jovens (Figura 1d). Um vacúolo foi frequentemente presente nas formas mais jovens e maduras (Figura 1d–g). Parasitos em crescimento foram vistos em qualquer lugar nos eritrócitos infectados, mas com maior frequência vistos em posição polar ou subpolar nos eritrócitos (Figura 1d–e), e as formas mais maduras tendem a se posicionar mais lateralmente ao núcleo do eritrócito, sendo mais nucleofílicas (Figura 1f–g). Trofozoítos apresentaram formas variáveis, sendo algumas vezes levemente amebóides (Figura 1e), mas prolongamentos amebóides e longos do citoplasma não foram visualizados. O núcleo do parasito foi frequentemente visto, com coloração rósea ou arroxeada (Figura 1d, f–g). Grânulos de pigmento de hemozoína marrons ou marrom escuros foram observados acumulados em uma das extremidades do parasito (Figura 1d, f–g). Múltiplas infecções no eritrócito foram observadas algumas vezes (Figura 1d, g). Influência dos parasitos no comprimento, largura e área dos eritrócitos infectados não foi observada (Figura 1d–g).

Tabela 2. Morfometria completa de formas eritrocíticas de *Plasmodium paranucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Rupornis magnirostris* da Mata Atlântica do sudeste brasileiro mantidas em cativeiro.

Características	Medidas de <i>Plasmodium paranucleophilum</i> ^a	n
Eritrócitos não infectados		
Comprimento	11,93–14,72 (13,12 ± 0,72)	31
Largura	6,48–8,21 (7,37 ± 0,36)	31
Área	65,01–88,4 (75,89 ± 5,72)	31
Núcleos dos eritrócitos não infectados		
Comprimento	6,08–7,81 (6,83 ± 0,38)	31
Largura	2,36–3,16 (2,84 ± 0,18)	31
Área	13,18–17,4 (15,53 ± 1,06)	31
Merontes		
Comprimento	3,94–7,78 (5,23 ± 0,84)	31
Largura	1,64–3,44 (2,46 ± 0,5)	31
Área	7,54–17,07 (10,9 ± 2,19)	31
Nº de merozoítos	4–9 (6,24 ± 1,74)	31
Comprimento dos merozoítos	0,62–1,2 (0,97 ± 0,13)	31
Largura dos merozoítos	0,59–1,08 (0,79 ± 0,13)	31
Área dos merozoítos	0,59–1,33 (0,91 ± 0,19)	31
Nº de grânulos de pigmento ^b	–	–
Área dos grânulos de pigmento ^b	–	–
Comprimento dos grânulos de pigmento ^b	–	–
Eritrócitos infectados		
Comprimento	10,27–15,1 (13,18 ± 1,12)	31
Largura	6,26–7,81 (7,12 ± 0,46)	31
Área	54,78–90,6 (75,2 ± 10,08)	31
Núcleos dos eritrócitos infectados		
Comprimento	5,23–7,45 (6,31 ± 0,63)	31
Largura	1,97–2,92 (2,46 ± 0,25)	31
Área	10,9–15,32 (12,97 ± 1,44)	31

Continuação

Macrogametócitos		
Comprimento	10,57–16,24 (12,8 ± 1,22)	31
Largura	1,78–3,19 (2,61 ± 0,29)	31
Área	19,05–36,1 (27,68 ± 4,21)	31
Núcleos dos gametócitos		
Comprimento	1,75–4,24 (3,09 ± 0,49)	31
Largura	1,21–2,08 (1,53 ± 0,25)	31
Área	2,94–6,21 (4,15 ± 0,74)	31
Nº de grânulos de pigmento ^b	–	–
Comprimento dos grânulos de pigmento	0,43–0,76 (0,56 ± 1,11)	10
Largura dos grânulos de pigmento	0,33–0,62 (0,42 ± 0,09)	10
Área dos grânulos de pigmento	0,31–0,64 (0,4 ± 0,09)	10
NDR ^c	0,5–0,97 (0,79 ± 0,11)	31
Comprimentos dos vacúolos		
Largura dos vacúolos	0,6–1,14 (0,84 ± 0,18)	15
Área dos vacúolos	0,41–1,12 (0,74 ± 0,18)	15
Eritrócitos infectados		
Comprimento	12,26–16,28 (13,84 ± 0,98)	31
Largura	6,29–8,01 (7,28 ± 0,46)	31
Área	67,2–99,04 (82,12 ± 8,58)	31
Núcleos dos eritrócitos infectados		
Comprimento	5,33–8,64 (6,79 ± 0,72)	31
Largura	2,2–3,43 (2,65 ± 0,26)	31
Área	11,62–16,76 (14,54 ± 1,21)	31
Microgametócitos		
Comprimento	10,48–15,49 (12,57 ± 1,28)	31
Largura	2,13–3,19 (2,47 ± 0,25)	31
Área	19,98–32,46 (25,75 ± 3,77)	31
Núcleos dos gametócitos		
Comprimento	3,04–5,73 (4,75 ± 0,65)	25
Largura	0,9–2,46 (1,59 ± 0,33)	25
Área	3,15–9,6 (6,35 ± 1,46)	25
Nº de grânulos de pigmento ^b	–	–
Comprimento dos grânulos de pigmento	0,44–0,89 (0,63 ± 0,12)	13
Largura dos grânulos de pigmento	0,34–0,75 (0,47 ± 0,12)	13
Área dos grânulos de pigmento	0,34–0,72 (0,47 ± 0,13)	13
NDR ^c	0,6–1 (0,84 ± 0,09)	31
Comprimentos dos vacúolos		
Largura dos vacúolos	0,66–1,01 (0,84 ± 0,14)	4
Área dos vacúolos	0,62–0,83 (0,71 ± 0,11)	4
Eritrócitos infectados		
Comprimento	12,15–15,82 (14,48 ± 0,93)	31
Largura	5,75–8,15 (7,19 ± 0,54)	31
Área	65,47–96,82 (83,56 ± 8,87)	31
Núcleos dos eritrócitos infectados		
Comprimento	5,43–8 (6,77 ± 0,57)	31
Largura	2,18–3,06 (2,62 ± 0,2)	31
Área	12,36–16,85 (14,64 ± 1,2)	31

^aTodas as medidas estão em micrômetros (µm). ^b Formas difíceis de medir. ^c NDR (nucleus displacement ratio), deslocamento do núcleo, de acordo com BENNETT & CAMPBELL (1972). Valores mínimos e máximos estão apresentados, seguidos pela média aritmética e desvio padrão em parênteses. *n*: número de formas medidas.

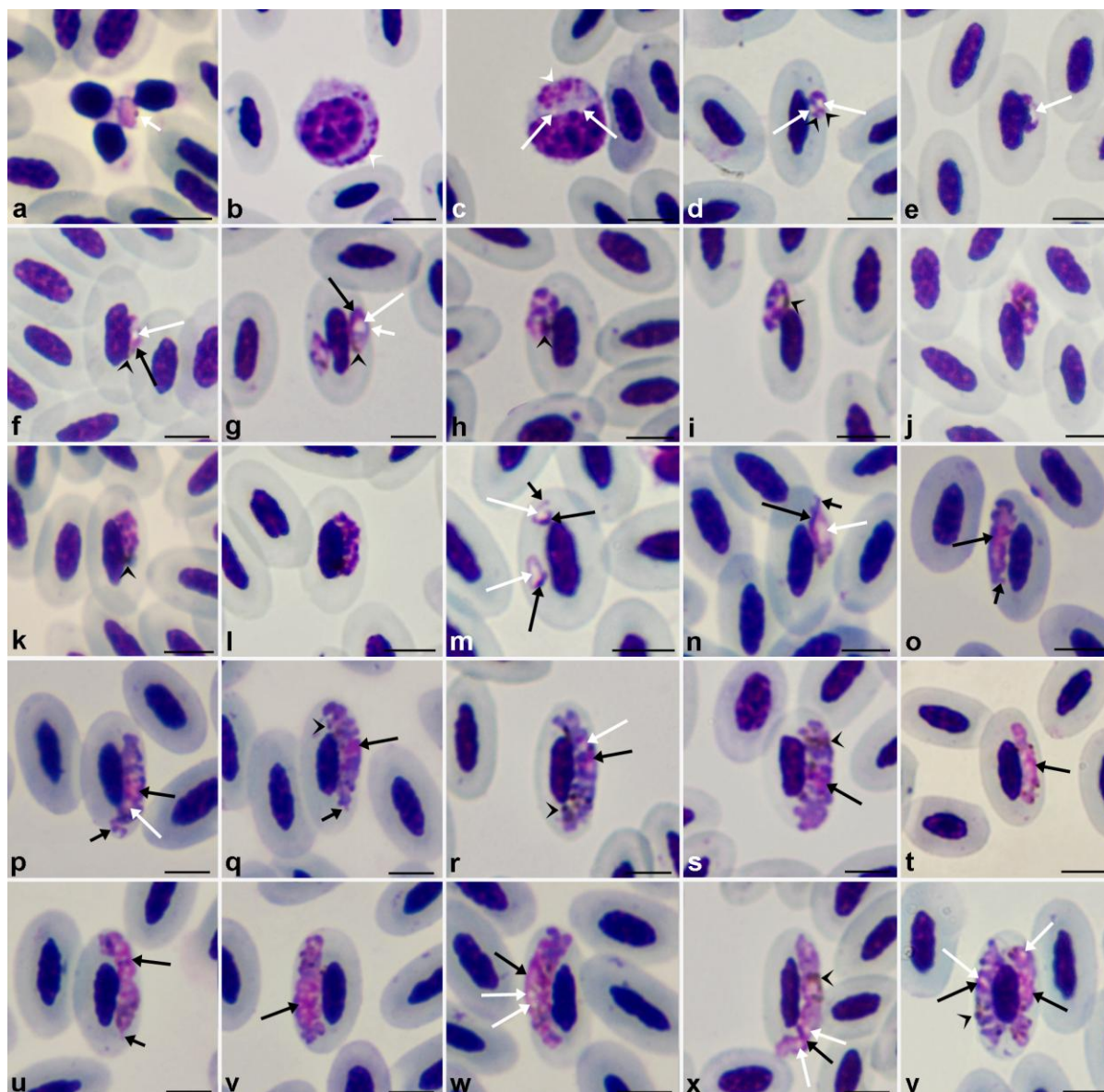


Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium paranucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Rupornis magnirostris* da Mata Atlântica do sudeste brasileiro mantidas em cativeiro. Trofozoíto em um trombócito (a); linfócito com fanerozoítos (b–c); trofozoítos (d–g); merontes (g–l); gametócitos jovens (m–n); macrogametócitos (o–s, y); e microgametócitos (t–y). Setas brancas pequenas indicam trofozoítos; cabeças de seta brancas indicam fanerozoítos; setas brancas grandes indicam vacúolos dos parasitos; setas pequenas pretas indicam prolongamentos do citoplasma; cabeças de setas pretas indicam grânulos de hemozoína; e setas pretas grandes indicam núcleo dos parasitos. Barras = 5 µm.

Merontes eritrocíticos: foram vistos em eritrócitos maduros (Figura 1g–l). O citoplasma apresentou coloração clara, sendo mais abundante em merontes binucleares (Figura 1g), mas diminuiu acentuadamente com o desenvolvimento do parasito (Figura 1h–l). Formas mais jovens foram usualmente vistas na posição lateral, polar ou subpolar nos eritrócitos infectados (Figura 1g–j). Merontes multinucleares observados foram muito nucleofílicos e esse contato geralmente não foi interrompido como o desenvolvimento do parasito. Formas mais maduras foram mais frequentemente vistas em posição lateral ao núcleo dos eritrócitos infectados (Figura 1k–l), mas podem ser vistas em posição polar ou subpolar das células hospedeiras e não deslocam lateralmente o núcleo do eritrócito (Figura

1h-l). Merontes maduros podem apresentar formas variadas sendo arredondados, alongados ou irregulares (Figura 1h-l). Em alguns casos formas maduras podem atingir comprimento de 3,94 a 7,78 μm ($5,23 \pm 0,84$), e largura de 1,64 a 3,44 μm ($2,46 \pm 0,5$) (Tabela 2), sendo que alguns são maiores do que o núcleo do eritrócito. Os núcleos dos parasitos foram randomicamente distribuídos nos merontes (Figura 1g-l). Parasitos maduros usualmente continham de 4 a 9 merozoítos (Figura 1h-l) (mais frequentemente 6) (Tabela 2). Grânulos de pigmento observados foram marrons escuros, usualmente agrupados (Figura 1h, i, k), podendo ser agregados em uma ou duas massas sólidas (Figura 1j), não sendo possível contar e medir os mesmos. Múltiplas infecções no eritrócito foram observadas (Figura 1g). Influência dos merontes no comprimento, largura e área dos eritrócitos infectados não foi observada (Figura 1g-l).

Gametócitos jovens: podem ser diferenciados dos trofozoítos por não apresentarem grânulos de hemozoína e serem menos nucleofílicos em suas formas iniciais (Figura 1m). Foram observados vacúolos bem destacados (Figura 1m-n) e núcleo do parasito, tanto nas formas iniciais, quanto nas mais maduras (Figura 1m-n). A forma dos parasitos pode variar, sendo mais arredondada em seus estágios iniciais, tornando-se mais alongada e amebóide em estágios mais avançados (Figura 1m-n). Foi observado ainda prolongamentos “*fingerlike*” do citoplasma (Figura 1m-n), o que permanece até a diferenciação em macro ou microgametócito (Figura 1o-q, u). Influência dos gametócitos jovens no comprimento, largura e área dos eritrócitos infectados não foi observada (Figura 1m-n).

Macrogametócitos: foram vistos em eritrócitos maduros (Figura 1o-s). O citoplasma corou irregularmente, com aparência granular e irregular (Figura 1o-s), usualmente com vários vacúolos presentes, vistos desde formas jovens até formas maduras (Figura 1p, r, y). Desde as primeiras fases do seu desenvolvimento, gametócitos são alongadas, com posição lateral ao núcleo dos eritrócitos infectados e nucleofílicos (Figura 1o-s, y). Esse contato com o núcleo não é interrompido com o desenvolvimento dos parasitos. As extremidades dos gametócitos são variáveis, com aparência lisa, irregular ou amebóide (Figura 1o-s), as quais foram observadas nas formas jovens e maduras, sendo em alguns casos altamente amebóide (Figura 1o, s). Foram observados ainda prolongamentos do citoplasma “*fingerlike*” nas formas mais jovens (Figura 1o-q). O núcleo do parasito não é compacto, de forma variável, com coloração rósea, usualmente com posição mediana, podendo ser observado nas formas mais jovens até as maduras (Figura 1o-s, y) e por não ser compacto, em alguns casos dificulta sua mensuração. Os grânulos de pigmento são escuros, pequenos ($<0,5 \mu\text{m}$) ou médios ($0,5$ to $1,0 \mu\text{m}$) (Tabela 2) no tamanho, não numerosos, mais frequentemente se acumulam em um local e até mesmo sendo agregados em várias massas sólidas, sendo difícil de contar o número dos mesmos (Figura 1r-s). Em alguns casos podem ser observados também randomicamente espalhados no citoplasma (Figura 1q, y); e ainda agregados em massas e espalhados randomicamente podem ser observados no mesmo gametócito (Figura 1r). Gametócitos maduros variaram de 10,57 to 16,24 μm (média de $12,8 \pm 1,22$) (Tabela 2) no comprimento, podendo crescer até os pólos do eritrócito (Figura 1r-s). A largura variou entre 1,78 a 3,19 μm ($2,61 \pm 0,29$) (Tabela 2), podendo frequentemente deslocar o núcleo dos eritrócitos lateralmente (Figura 1r-s), NDR = 0,5–0,97 ($0,79 \pm 0,11$) (Tabela 2). Múltiplas infecções no eritrócito foram observadas (Figura 1y). Gametócitos usualmente não deformaram o comprimento, largura e área dos eritrócitos infectados (Figura 1o-s, y).

Microgametócitos: apresentaram características semelhantes aos macrogametócitos, com usual dimorfismo sexual observado em hemosporídeos (Figura 1t-x). Em alguns casos o citoplasma foi pouco corado, com aparência clara, principalmente nas formas mais jovens (Figura 1t). Vacúolos foram observados (Figura 1w-y). O núcleo dos parasitos é difuso e não definido (Figura 1t-y), sendo difícil de medir em alguns gametócitos. Gametócitos maduros variaram de 10,48 a 15,49 μm (média de $12,57 \pm 1,28$) (Tabela 2) no comprimento, podendo

crescer até os pólos do eritrócito (Figura 1w–x). A largura variou entre 2,13 a 3,19 μm ($2,47 \pm 0,25$) (Tabela 2), podendo frequentemente deslocar o núcleo dos eritrócitos lateralmente (Figura 1v–w), $\text{NDR} = 0,6\text{--}1$ ($0,84 \pm 0,09$) (Tabela 2). As outras características foram semelhantes aos macrogametócitos. Múltiplas infecções no eritrócito foram observadas (Figura 1y). Gametócitos usualmente não alteraram o comprimento, largura e área dos eritrócitos infectados (Figura 1t–y).

4.3.3 Observações

As linhagens de *P. paranucleophilum* encontradas no presente estudo apresentaram similaridades nas características morfológicas apresentadas na descrição original realizada por MANWELL & SESSLER (1971b), como (1) trofozoítos, merontes e gametócitos maduros muito próximos do núcleo do eritrócito infectado (nucleofílicos); (2) tamanho maior dos gametócitos em relação aos gametócitos de *Plasmodium nucleophilum*, que podem deslocar o núcleo dos eritrócitos lateralmente e crescer até atingir os pólos dos eritrócitos infectados; (3) presença de fanerozoítos nos linfócitos no sangue periférico; (4) esquizontes maduros não deslocam o núcleo do eritrócito parasitado; (5) trofozoítos e merontes são observados na posição polar ou subpolar na maioria das vezes; (6) pigmentos de hemozoína acumulados em trofozoítos, merontes e gametócitos. *P. paranucleophilum* é principalmente similar a *P. nucleophilum*, da qual se distingue pelas características (2), (3) e (4), não observadas em *P. nucleophilum*. Outras espécies próximas de *P. paranucleophilum* são *Plasmodium homonucleophilum*, que se diferencia por apresentar formas não nucleofílicas, sendo comuns gametócitos que não aderem ao núcleo do eritrócito parasitado (ILGŪNAS et al., 2013) e *Plasmodium delichoni*, que apesar de apresentar formas muito nucleofílicas, se diferencia pelos grânulos de pigmento grandes ($\geq 1\mu\text{m}$ no comprimento) nos gametócitos e distintos aglomerados de cromatina nos núcleos de merontes eritrocíticos maduros (VALKIŪNAS et al., 2016).

4.3.4 Reconstruções filogenéticas

Nesse trabalho foram obtidas seis sequências idênticas de *P. paranucleophilum* de cinco espécies de aves mantidas em cativeiro no sudeste do Brasil (*A. clamator*, *B. brachyurus*, *C. plancus*, *F. peregrinus* e *R. magnirostris*), sendo essas, as primeiras sequências dessa espécie de parasito depositadas em bancos de dados. As prováveis relações filogenéticas entre as seis linhagens de *P. paranucleophilum* isoladas neste estudo e outras linhagens de *Plasmodium* spp. foram reconstruídas (Figura 2). Independentemente do método de reconstrução utilizado (ML ou BI), todas as seis sequências de *P. paranucleophilum* se agruparam em um clado monofilético juntamente com sequências de uma espécie de *Plasmodium* não caracterizada (JX546134–JX546140) previamente isolada de *Mycteria americana* no Nordeste do Brasil (VILLAR et al., 2013) (Figura 2). Houve uma estimativa de divergência genética mínima e máxima de 0% e 0,4%, respectivamente, entre as linhagens do presente estudo e aquelas depositadas por VILLAR et al. (2013) (Tabela 3). A análise do presente estudo demonstra um clado formado por várias linhagens de *P. nucleophilum*, linhagens de *Plasmodium* sp., com uma linhagem de *Plasmodium* sp. como grupo irmão (95/1) e *Plasmodium ashfordi* (GRW02) como grupo externo (92/1) (Figura 2). A análise das linhagens de *P. nucleophilum* e *P. paranucleophilum* mostrou divergência genética média de 2,48% (mínimo 2,3% e máximo 2,7%) (Tabela 3). Essa proximidade filogenética (Figura 2) apóia nossa observação de fortes semelhanças morfológicas entre essas duas espécies. No entanto, a diferença entre variações inter- (média 2,48%) e intra-específica (máximo de 0,4%) sugere que as duas linhagens são espécies independentes.

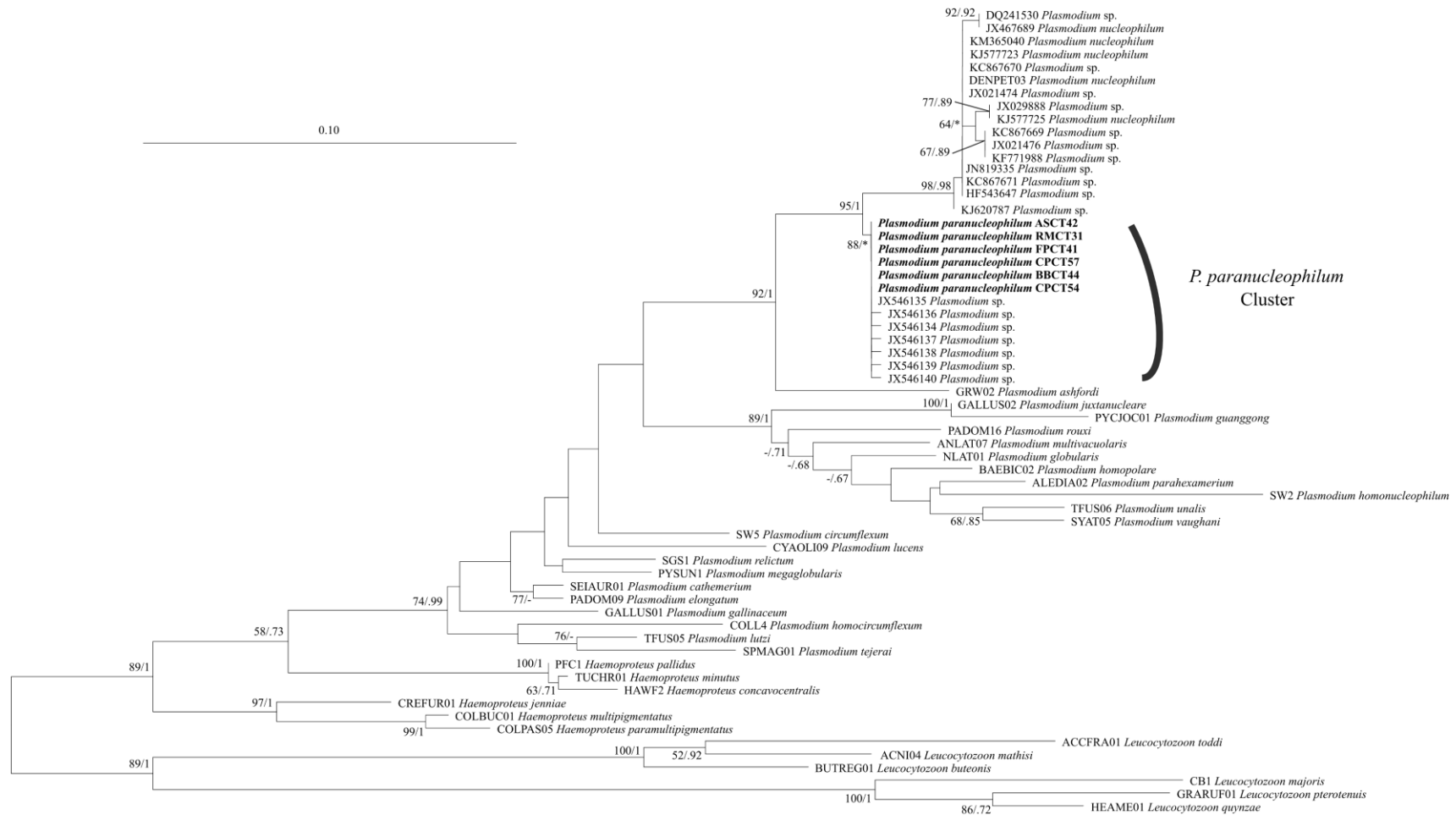


Figura 2. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos clados (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

Tabela 3. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* entre *Plasmodium paranucleophilum*, *Plasmodium nucleophilum* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. As divergências genéticas estão dadas em porcentagem.

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
1 <i>Plasmodium</i> sp. (DQ241530)	0.0																															
2 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (JX467689)	0.0	0.0																														
3 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KM365040)	0.0	0.0	0.0																													
4 <i>Plasmodium</i> sp. (JN819335)	0.0	0.0	0.0	0.0																												
5 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KJ577723)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																											
6 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867670)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																										
7 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867671)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																									
8 <i>Plasmodium</i> sp. (HF543647)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																								
9 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (DENPET03)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																							
10 <i>Plasmodium</i> sp. (JX021474)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																						
11 <i>Plasmodium</i> sp. (JX029888)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0																					
12 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KJ577725)	0.4	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0																				
13 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867669)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0																			
14 <i>Plasmodium</i> sp. (JX021476)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0																		
15 <i>Plasmodium</i> sp. (KF771988)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0																	
16 <i>Plasmodium</i> sp. (KJ620787)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.0																
17 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (ASCT42)	2.5	2.7	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0															
18 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (RMCT31)	2.5	2.7	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0														
19 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (FPCT41)	2.5	2.7	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0	0.0													
20 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (CPCT57)	2.5	2.7	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0												
21 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (BBCT44)	2.3	2.5	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0											
22 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (CPCT54)	2.4	2.5	2.4	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
23 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546135)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0									
24 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546136)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0							
25 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546134)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.0					
26 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546137)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.0				
27 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546138)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.0			
28 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546139)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0		
29 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546140)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	
30 <i>Plasmodium ashfordi</i> (GRW02)	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.2	5.2	5.6	5.6	5.6	5.4	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0.0	

4.3.5 Sumário taxonômico

Plasmodium (Novyella) paranucleophilum MANWELL & SESSLER, 1971b

Sequências de DNA: linhagens do gene mitocondrial citocromo *b*: RMCT31, FPCT41, ACCT42, BBCT44, CPCT54 e CPCT57 (479bp, números de acesso no GenBank: KX159490, KX159491, KX159492, KX159493, KX159494 e KX159495).

Local de infecção: fanerozoítos foram observados infectando linfócitos e alguns trofozoítos foram observados em trombócitos. Todas as outras formas foram observadas em eritrócitos maduros.

Prevalência: das 68 aves examinadas, nove estavam infectadas por *P. paranucleophilum*, com prevalência total de 14,75%. As aves infectadas incluíram 3 *Asio clamator* (prevalência de 4,91%), 1 *Pulsatrix koeniswaldiana* (prevalência de 1,63%), 1 *Buteo brachyurus* (prevalência de 1,63%), 1 *Rupornis magnirostris* (prevalência de 1,63%), 2 *Caracara plancus* (prevalência de 3,27%), e 1 *Falco peregrinus* (prevalência de 1,63%).

Hospedeiros adicionais: A espécie de parasito foi registrada em seis espécies adicionais: *Asio clamator*, *Pulsatrix koeniswaldiana*, *Buteo brachyurus*, *Caracara plancus*, *Falco peregrinus* e *Rupornis magnirostris*.

Distribuição geográfica: Parece restrito ao Brasil, pois foi descrito neste país em 1971, e somente após 45 anos de sua descrição é que está sendo novamente observado, e no mesmo país.

Esfregaços sanguíneos representativos: Esfregaços sanguíneos representativos da espécie foram depositados na coleção do Laboratório de Protozoologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (números de acesso: lâminas 31, 41, 42, 44, 54 e 57).

4.4 DISCUSSÃO

Plasmodium paranucleophilum foi registrada em seis espécies de aves no presente estudo (*A. clamator*, *P. koeniswaldiana*, *B. brachyurus*, *R. magnirostris*, *C. plancus* e *F. peregrinus*), sendo todas reportadas como novos hospedeiros, o que destaca a falta de estudos com hemossporídeos aviários no Brasil, principalmente em aves de rapina. Esse parasito foi identificado com base na caracterização morfológica dos esfregaços sanguíneos, onde foram visualizadas características morfológicas encontradas na descrição original de MANWELL & SESSLER (1971b). As principais características que diferenciam a espécie de outras, principalmente de *P. nucleophilum*, a qual pode ser confundida nos estágios jovens, são: (1) gametócitos maiores, que podem deslocar lateralmente o núcleo do eritrócito, podendo crescer até atingir os pólos do eritrócito parasitado; (2) fanerozoítos em células do sangue periférico; e (3) esquizontes maduros que não deslocam o núcleo do eritrócito parasitado. A re-descrição desse hemossporídeo, realizada no presente estudo, acrescentou novas características morfológicas e morfométricas que podem auxiliar em sua identificação (Figura 1, Tabela 2).

Essa espécie de parasito foi descrita na ave *Tachyphonus* sp. (Passeriformes, Thraupidae) no Brasil e desde então só foi encontrada e redescrita no presente estudo parasitando seis espécies de aves das ordens Accipitriformes, Strigiformes e Falconiformes mantidas em cativeiro no sudeste brasileiro (Tabela 1), o que pode indicar a baixa especificidade quanto aos hospedeiros. Esse hemossporídeo parece ser mais encontrado na América do Sul, pois apesar da grande quantidade de estudos com hemossporídeos aviários realizados no mundo inteiro, desde sua descrição está sendo observada agora pela segunda vez apenas no Brasil.

Nas análises filogenéticas, as linhagens de *P. paranucleophilum* obtidas (ASCT42, RMCT31, FPCT41, CPCT57, BBCT44 e CPCT54) agruparam com sequências de *Plasmodium* sp. já depositadas em bancos de dados por VILLAR et al. (2013), apresentando entre elas divergência genética variando de 0% a 0,4% (Tabela 3), ficando abaixo de 1% proposto por OUTLAW & RICKLEFS (2014). Os autores propuseram três divergências genéticas, 1%, 3% e 5%, para separação de espécies de hemossporídeos aviários baseadas em sequências do gene *cyt b*, onde sequências com divergência >1% são consideradas novas e podem representar uma nova espécie, necessitando de estudo morfológico. Já sequências que diferirem em 3% ou 5% são consideradas diferentes e podem muitas vezes exibir diferenças morfológicas, e isso pode ou não levar a identificação de novas espécies. As sequências de DNA de *Plasmodium* sp. (JX546134–JX546140) encontradas em aves da espécie *Mycteria americana* amostradas na região central do Brasil e depositadas por VILLAR et al. (2013) formaram um clado monofilético, com altos valores de suporte, com as sequências do presente estudo, demonstrando que o parasito encontrado em 2013 pode ter sido *P. paranucleophilum*, entretanto como não foram feitas análises morfológicas e como ainda não havia sequências de DNA já depositadas para essa espécie, o parasito não foi identificado, o que evidencia mais uma vez a importância de estudos multidisciplinares com hemossporídeos aviários.

Em estudos anteriores que utilizaram apenas dados morfológicos ou moleculares, a espécie *P. paranucleophilum* pode ter sido muitas vezes confundida e identificada com *P. nucleophilum*, pois suas formas eritrocíticas jovens são muito semelhantes e as sequências de DNA do gene *cyt b* das duas espécies mostraram ser muito próximas, formando um clado monofilético com altos valores de suporte (Figura 2) e apresentando divergência genética média de 2,48% (mínimo 2,3% e máximo 2,7%) (Tabela 3). A falta de estudos morfológicos realizados em união com estudos moleculares e filogenéticos pode ter contribuído com a ausência de registros da espécie *P. paranucleophilum*. A combinação destes métodos proporciona oportunidades para explorar informações adicionais, as quais tem sido

acumuladas independentemente em ambas as técnicas da investigação. Os marcadores moleculares melhoraram acentuadamente possibilidades para o estudo dos processos genéticos de populações e as relações filogenéticas, mas são limitados no que eles podem dizer sobre a biologia, em particular taxonomia e ecologia dos parasitos, o que tem sido acumulado pela parasitologia tradicional (VALKIŪNAS et al., 2013b; 2014). A caracterização molecular de espécies que vem sendo feita nos últimos trabalhos é o primeiro passo para a união dessas duas técnicas, o que é um importante avanço em estudos com hemospóridios aviários (DIMITROV et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; MANTILLA et al., 2013a; 2013b; MATTA et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2013; PERKINS, 2014; VALKIŪNAS et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015).

Estudos tem demonstrado que infecções por hemospóridios em aves mantidas em cativeiro podem apresentar alta prevalência (BELO et al., 2009; VANSTREELS et al., 2014; TOSTES et al., 2015a), o que pode ser explicado pelas condições de saúde dessas aves, as quais diferem das aves que vivem em condições naturais. O cativeiro pode acarretar em má alimentação e nutrição, prostração, estresse, baixa imunidade, sendo que todos estes fatores favorecem o desenvolvimento de infecções por vírus, bactérias, fungos e hemospóridios (ALLEY et al., 2008). Mediante essas más condições de saúde, o impacto de infecções de hemospóridios em aves mantidas em cativeiro pode ser muito maior que em aves em condições naturais (DONOVAN et al., 2008; CANNEL et al., 2013; TOSTES et al., 2015b), podendo muitas vezes levar à morte (GARDINER et al., 1984; SCHRENZEL et al., 2003; FERREL et al., 2007; DONOVAN et al., 2008; OLIAS et al., 2011; SCAGLIONE et al., 2016). Esses dados podem ser preocupantes em relação à conservação de aves silvestres, pois as condições de cativeiro onde as aves vivem podem aumentar a taxa de transmissão de hemospóridios entre diferentes espécies de aves, que em condições naturais não viveriam próximas, como pode ter ocorrido na presente estudo, onde *P. paranucleophilum* foi encontrado em seis espécies de aves de rapina mantidas no mesmo recinto. E ainda, além do impacto negativo que esses hemospóridios podem causar nas aves mantidas em cativeiro, muitas dessas espécies são reintroduzidas na natureza, inclusive aves migrantes, as quais podem carrear esses parasitos para novas áreas e novas espécies, o que pode ter forte impacto negativo nos hospedeiros, especialmente quando uma espécie de ave é exposta ao parasito pela primeira vez ou quando as aves são expostas a espécies de hemospóridios que não são encontrados no seu ambiente natural, principalmente com infecções *Plasmodium* spp. (VAN RIPER III et al., 1986). Por exemplo, a alta mortalidade de pinguins com infecção malárica causada por *Plasmodium relictum* Grassi and Feletti, 1891 em um zoológico no Brasil, como relatada por BUENO et al. (2010) e a extinção de aves nativas do Havaí devido a introdução de *P. relictum* em uma nova área (ATKINSON et al., 2000; BENSCH et al., 2000).

Nesse trabalho, novas espécies de hospedeiros foram registradas para *P. paranucleophilum*, o que demonstra que estudos com aves silvestres no Brasil ainda são necessários, principalmente na Mata Atlântica, para melhor conhecer os hemospóridios aviários dessa região e assim auxiliar na conservação de espécies de aves brasileiras. Além disso, condições de cativeiro, onde as aves vivem muito próximas e em alta densidade, podem favorecer a transmissão de parasitos, podendo as aves ainda, quando reintroduzidas na natureza, com a presença de vetores, carrear esses parasitos para espécies de diferentes regiões. A combinação da parasitologia tradicional com dados microscópicos e abordagens moleculares oferece oportunidades para explorar informações adicionais sobre hemospóridios aviários, informações essas que tem sido acumuladas de forma independente em ambos os campos de pesquisa.

4.5 CONCLUSÕES

1. *Plasmodium paranucleophilum* observado no presente estudo apresenta novas características morfológicas, sendo depositadas as primeiras sequências de DNA em bancos de dados para esse parasito;
2. *Asio clamator*, *Pulsatrix koeniswaldiana*, *Buteo brachyurus*, *Rupornis magnirostris*, *Caracara plancus* e *Falco peregrinus* são registrados como novos hospedeiros de *Plasmodium paranucleophilum*;
3. As primeiras sequências de DNA da espécie *P. paranucleophilum* são depositadas em bancos de dados;

CAPÍTULO III

5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* Manwell, 1935 EM *Ramphastos* spp. (PICIFORMES) DA MATA ATLÂNTICA MANTIDOS EM CATIVEIRO, E NOTAS SOBRE DISTRIBUIÇÃO E ESPECIFICIDADE PARASITÁRIA

RESUMO

Plasmodium nucleophilum foi registrada em todas as regiões zoogeográficas, com exceção da Austrália e Antártida, sendo observada parasitando as mais diversas ordens de aves. Assim o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização molecular e filogenética de *Plasmodium nucleophilum* em *Ramphastos* spp. e realizar levantamento acerca da distribuição e especificidade de hospedeiros para essa espécie de hemosporídeo. Para isso foram coletadas amostras de sangue de 19 aves das espécies *Ramphastos toco* (n=16) e *Ramphastos vitellinus* (n=3) em dois Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA) no sudeste do Brasil. Dentre as 19 aves analisadas, cinco estavam infectadas por *P. nucleophilum*, apresentando prevalência total de 26,31% e parasitemia média de 0,04%. Nas análises filogenéticas sequências do gene *cyt b* isoladas no presente estudo agruparam com linhagens de *Plasmodium* spp. e com de *P. nucleophilum* já caracterizadas e disponíveis em bancos, apresentando *P. paranucleophilum* como grupo irmão. A revisão de literatura e os dados do presente estudo demonstraram que a espécie de parasito em questão possui maior número de registros no continente americano, sendo o Panamá e o Brasil, os de maior destaque, e parece apresentar baixa especificidade quanto aos hospedeiros, pois foi registrada em aproximadamente em 108 espécies de aves das mais variadas ordens. Mesmo utilizando análise multidisciplinar, não foi possível uma separação e identificação das subespécies *P. nucleophilum toucani* e *P. nucleophilum nucleophilum*, pois não foram visualizadas diferenças na morfologia das formas eritrocíticas e nas sequências de DNA obtidas. Para maior esclarecimento dessas questões e para obtenção de mais informações acerca dessas subespécies são necessários mais estudos com observação de formas exoeritrocíticas, infecção experimental em diferentes hospedeiros e análises filogenéticas usando múltiplos marcadores moleculares.

Palavras-chave: Malária aviária. Haemosporida. *Plasmodium* spp. Mata Atlântica. Aves Neotropicais. Tucanos.

ABSTRACT

Plasmodium nucleophilum was recorded in all zoological regions, with the exception of Australia and Antarctica, being observed parasitizing as more diverse orders of birds. As the aim of the present study was make molecular and phylogenetic characterization of *Plasmodium nucleophilum* in *Ramphastos* spp. and conduct a survey on the distribution and host specificity for this species of haemosporidian. For this, blood samples from 19 birds of the *Ramphastos toco* (n = 16) and *Ramphastos vitellinus* (n = 3) species were collected at two Wild Animal Screening Centers (CETAS / IBAMA) in southeastern Brazil. Among the 19 birds analyzed, five were infected by *P. nucleophilum*, presenting a total prevalence of 26.31% and a mean parasitemia of 0.04%. In the phylogenetic analyzes sequences of the *cyt b* gene isolated in the present study grouped with *P. nucleophilum* and *Plasmodium* spp. lineages available in databases, presenting a clade with *P. paranucleophilum* as sister group. The review of the literature and the data of the present study demonstrated that the species of parasite in the greatest number of records of American continent, being Panama and Brazil, the main highlight, and seems to present low specificity as to the hosts, and seems to present low host specificity, as it was recorded in approximately 108 species of birds in more varied orders. The use of a multidisciplinary analysis, it was not possible to separate and identify the subspecies *P. nucleophilum toucani* and *P. nucleophilum nucleophilum*, no differences were observed in the morphology of the erythrocyte forms and in the DNA sequences obtained. For further clarification of probability and obtaining more information about the subspecies are more studies with observation of exoerythrocytic forms, experimental infection in different hosts and multigenic phylogenetic analyzes.

Key words: Avian malaria. Haemosporida. *Plasmodium* spp. Atlantic forest. Neotropical birds. Toucans.

5.1 INTRODUÇÃO

Parasitas do gênero *Plasmodium* (Haemosporida, Plasmodiidae) são comuns em todos os continentes, com exceção da Antártida (VALKIŪNAS, 2005). Cerca de 80 espécies de *Plasmodium* foram descritas nas mais diferentes espécies de aves (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2007; 2008a; 2009; 2016; ZEHTINDJIEV et al., 2012; MANTILLA et al., 2013a; 2013b; CHAGAS et al., 2013; ILGŪNAS et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013; VANTREELS et al., 2014; 2015; WALTHER et al., 2014; PALINAUSKAS et al., 2015). Esses parasitos apresentam uma diversidade genética alta, indicando que muitas espécies novas ainda não foram descritas (BENSCH et al., 2009; CLARK et al., 2014; PERKINS, 2014; OUTLAW & RICKLEFS 2014; VALKIŪNAS et al., 2016). O conhecimento sobre a diversidade desses parasitos é fundamental para melhor compreensão da biologia e epidemiologia da malária aviária em aves silvestres (VALKIŪNAS et al., 2016).

Uma das espécies mais comuns dentro do gênero *Plasmodium* é a *Plasmodium nucleophilum* Manwell, 1935, pertencente ao subgênero *Novyella*, e tem como principais características apresentar merontes eritrocíticos e gametócitos muito próximos aos núcleos dos eritrócitos infectados (nucleofílicos), sendo que este contato não é interrompido com o desenvolvimento dos parasitos, gametócitos pequenos (menores que 10µm) e merontes menores que o núcleo do eritrócito, podendo deslocá-lo lateralmente (VALKIŪNAS, 2005). Essa espécie foi bem caracterizada, sendo registrada em todas as regiões zoogeográficas, com exceção da Austrália e Antártida, sendo frequentemente registrada no continente americano (CHAGAS et al., 2013). Foi registrada em aves da ordem Passeriformes, onde é mais comum, mas foi identificada também em espécies das ordens Anseriformes, Columbiformes, Psittaciformes e Piciformes (RICKLEFS & FALLON, 2002; SZYMANSKI & LOVETTE, 2005; VALKIŪNAS, 2005; DURRANT et al., 2006; PAGENKOPP et al., 2008; MARZAL et al., 2011; CHAGAS et al., 2013).

Essa espécie de parasito foi dividida em duas subespécies: *P. nucleophilum toucani*, descrita em tucanos da espécie *Ramphastos toco* (Piciformes, Ramphastidae) por MANWELL & SESSLER (1971a), que se diferencia por apresentar merontes eritrocíticos jovens menos nucleofílicos e numerosos fanerozoítos que se desenvolvem em canários; e *P. nucleophilum nucleophilum*, descrita em na espécie *Dumetella carolinensis* (Passeriformes, Mimidae) por MANWELL (1935), que apresenta características como o não desenvolvimento de fanerozoítos em canários. Apesar dessa separação pouco se sabe sobre as diferenças morfológicas após 1971, filogenéticas e moleculares entre essas duas subespécies. *P. nucleophilum toucani* foi descrita em coinfeção com *Plasmodium huffi* e isso pode ter alterado muitas características encontradas no estudo de MANWELL & SESSLER (1971a), destacando a importância de estudos com *P. nucleophilum* em tucanos. Outro ponto que podemos destacar é a dificuldade de amostragem de aves da família Ramphastidae, portanto animais em cativeiro podem ser de grande auxílio no estudo de hemossporídeos dessas espécies.

Os objetivos do presente estudo foram realizar caracterização molecular e filogenética de *Plasmodium nucleophilum* em *Ramphastos* spp., para tentativa de separação e caracterização das subespécies *P. nucleophilum toucani* e *P. nucleophilum nucleophilum*, e ainda realizar levantamento acerca da distribuição e especificidade de hospedeiros para *P. nucleophilum*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo e obtenção das amostras de sangue

Foi amostrado um total de 19 aves mantidas em cativeiro em dois Centros de Triagem de Animais Silvestres, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no sudeste do Brasil, nos estados de Minas Gerais (21°47'S, 43°22'O) e do Rio de Janeiro (22°43'S, 43°42'O), pertencentes às espécies *Ramphastos toco* Statius Muller, 1776 (n=16) e *Ramphastos vitellinus* Lichtenstein, 1823 (n=3). Essas duas sedes do IBAMA recebem aves apreendidas pela polícia florestal ou entregues pela população da Mesorregião da Zona da Mata (Minas Gerais) e de localidades próximas à cidade de Seropédica, Rio de Janeiro. Informações acerca do tempo de permanência destas aves em cativeiro, não foram disponibilizadas. As aves foram capturadas com auxílio de puçá e amostras de sangue (aproximadamente 30 µL) foram coletadas por punção na veia braquial ou metatarsal, para análises microscópicas e moleculares. As aves analisadas nesse estudo foram identificadas por comparação com as pranchas disponíveis em RIDGELY & TUDOR (2009) e SIGRIST (2014), baseadas em análises morfométricas e observações de características fenotípicas como tamanho, plumagem, bico, cor da íris e pernas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo no 42/2012) (Anexo A), pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo n° 121/2014) (Anexo C), e ainda pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitações número 29268-3 (Anexo B), e 39534-2 (Anexo D).

5.2.2 Análises morfológicas e morfométricas

Foram feitos pelo menos quatro esfregaços sanguíneos de cada ave para cálculo da prevalência de infecção, da parasitemia e para identificação e caracterização morfológica das espécies de hemoparasitos encontradas. Os esfregaços foram secados ao ar, fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos e corados pelo Giemsa (Eosina e Azul de Metileno) por aproximadamente 40 minutos, na diluição de 1:9 em água destilada. Os esfregaços foram analisados sob lente de imersão em microscópio de campo claro Olympus BX-51 (Tóquio, Japão) em aumento de 600x durante 20 min e 100 campos microscópicos foram observados em aumento de 1000x para cálculo da prevalência segundo BUSH et al. (1997) e da parasitemia (intensidade de infecção), onde o número de formas de cada parasito foi quantificado (GODFREY et al. 1987). Para preparação de imagens e identificação da espécie do parasito, foi utilizado microscópio de campo claro Olympus BX-51 equipado com sistema de captura e análise de imagem (Image Pro Plus 6.0).

5.2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. O DNA total do sangue de aves positivas na análise microscópica foi extraído usando o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as instruções do fabricante. *Nested*-PCR foi utilizada para amplificar um fragmento final do gene mitocondrial citocromo *b* de 479-bp. Na primeira reação os iniciadores propostos por HELLGREN et al. (2004), HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') foram utilizados. Esses iniciadores amplificam fragmentos de DNA de espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*.

Na segunda reação, os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), propostos por BENSCH et al. (2000) foram usados para amplificar fragmentos de 479bp dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Esses iniciadores vem sendo usados em muitos estudos de hemosporídeos aviários (VALKIŪNAS et al., 2008a; 2014; ZEHTINDJIEV et al., 2012; 2013; ILGŪNAS et al., 2013; WALTHER et al., 2014; GUTIÉRREZ-LÓPEZ et al., 2015; IVANOVA et al., 2015) e foram considerados por BERNOTIENĖ et al. (2016) os melhores iniciadores para amplificação de DNA de hemosporídeos aviários em infecções simples. A primeira reação consistiu em um volume final de 25µL, onde foram utilizados 12,5µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10µM (HaemFNI e HaemR2), 5µL de DNA genômico e água deionizada para completar o volume até 25µL. Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, e extensão final em 72°C por 10 min (HELLGREN et al., 2004). As mesmas condições foram usadas na segunda reação, exceto que 1µL do produto da primeira reação foi utilizado substituindo o DNA genômico e 1µL dos iniciadores HaemF e HaemR2 a uma concentração de 10µM foram usados. Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 2% com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizados sob luz ultravioleta. Todos os produtos amplificados foram purificados usando o kit de purificação QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os eletroferogramas foram visualizados no programa Geneious 6.0 (KEARSE et al., 2012) e amostras que não apresentaram eletroferogramas de boa qualidade foram descartadas.

5.2.4 Análises filogenéticas

Reconstruções filogenéticas foram feitas usando sequências do gene *cyt b* de hemosporídeos aviários obtidas dos bancos de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009) e GenBank e de sequências dos parasitos obtidas no presente estudo. O conjunto de dados foi alinhado usando o programa MAFFT ver. 7.055b, empregando o método progressivo (FFT-NS-2) (KATO & STANDLEY, 2013). O conjunto de dados alinhado foi manualmente verificado, onde foram removidas sequências relacionadas com os iniciadores e de locais ambíguos. Após isso as sequências foram cortadas para produzir um conjunto de dados de igual comprimento (479bp) usando o programa SeaView ver. 4.6 (GOUY et al., 2010). jModelTest_2.1.4 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003) foi usado para selecionar o melhor modelo de substituição evolutivo sob o critério de informação de Akaike. A análise por Inferência Bayesiana (BI) foi realizada usando o programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), onde o modelo GTR + G + I foi aplicado. Duas corridas independentes de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) compostas cada uma, de uma cadeia fria e 3 quentes foram realizadas ao longo de 1 milhão de gerações aplicando-se ao final um “burn-in” de 25% (25% das primeiras árvores geradas foram descartadas da análise). A análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi feita usando o programa PhyML v3.0 (GUINDON et al., 2010), aplicando o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I. A confiabilidade dos ramos internos foi avaliada usando o método “bootstrap” não paramétrico com 1000 psedorélicas. As árvores resultantes foram visualizadas no programa FigTree 1.4.2. Para cálculo da divergência genética entre as sequências obtidas no presente estudo e outras já depositadas em bancos de dados foi utilizado o programa SeaView ver. 4.6 (GOUY et al., 2010), usando as distâncias observadas (sem correções).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Identificação da espécie *Plasmodium nucleophilum*

A espécie *P. nucleophilum* foi identificada por apresentar características morfológicas semelhantes às descritas em VALKIŪNAS (2005) e em CHAGAS et al. (2013), tais como (1) trofozoítos, esquizontes e gametócitos muito próximos ao núcleo dos eritrócitos infectados (Figura 1a–f); (2) esquizontes maduros pequenos (menores que o núcleo do eritrócito) e que podem deslocar o núcleo do eritrócito infectado (Figura 1a–c); (3) gametócitos maduros pequenos, apresentando na maioria das vezes comprimento médio menor que 10 μm (Figura 1d–f). Devido à baixa parasitemia de infecção, não foi realizada análise morfométrica e descrição morfológica completa da espécie para averiguação da ocorrência de subespécies *P. nucleophilum toucani* e *P. nucleophilum nucleophilum*.

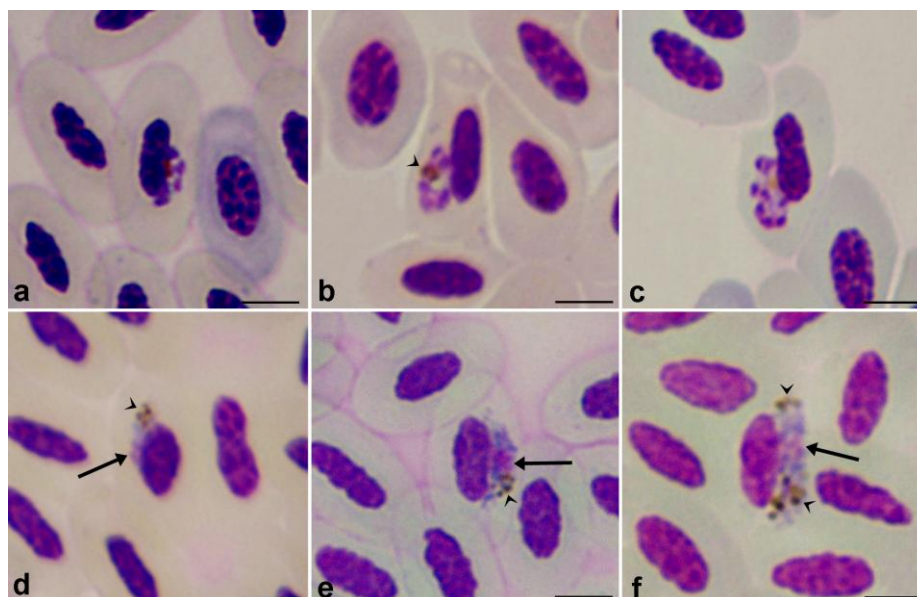


Figura 1. Formas eritrocíticas de *Plasmodium nucleophilum* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Ramphastos toco* do sudeste brasileiro mantidos em cativeiro. Merontes (a–c) e macrogametócitos (d–f). Cabeças de seta indicam grânulos de hemozoína e setas indicam núcleo do parasito. Barras = 5 μm .

5.3.2 Prevalência e intensidade de infecção

Dentre as 19 aves analisadas, *P. nucleophilum* foi encontrada em cinco aves (prevalência total de 26,31%), sendo quatro da espécie *Ramphastos toco*, (três amostradas em Minas Gerais e uma no Rio de Janeiro), apresentando prevalência de 21,05% e uma da espécie *Ramphastos vitellinus* (amostrada no Rio de Janeiro), com prevalência de 5,26%. A parasitemia média foi de 0,04% ($\pm 0,02$).

5.3.3 Distribuição geográfica e espécies de hospedeiros

A espécie *P. nucleophilum* foi registrada em aves de 16 diferentes países dos continentes americano, asiático, africano e europeu (Figura 2), entretanto, nenhum registro foi feito na Austrália e na Antártida. A maioria dos registros foram feitos em países americanos,

sendo o Brasil e o Panamá, os de maior destaque, respondendo, respectivamente por 26 e 21 registros, dentre os 75 existentes na América (Figura 2, Tabela 1). Quanto aos hospedeiros, *P. nucleophilum* foi encontrado parasitando cerca de 114 espécies de aves das ordens Accipitriformes (n=1), Anseriformes (n=5), Caprimulgiformes (n=1), Charadriiformes (n=1), Columbiformes (n=3), Galliformes (n=1), Pelecaniformes (n=1), Phoenicopteriformes (n=1), Psittaciformes (n=4), Piciformes (n=5, sendo duas para *P. nucleophilum toucani*), Sphenisciformes (n=1), e em sua maioria Passeriformes (n=90) (Tabela 1).



Figura 2. Distribuição da espécie *Plasmodium nucleophilum* no mundo, de acordo com a revisão realizada no presente estudo. Legenda: bola preta representa pontos de amostragem de *Plasmodium nucleophilum*; estrela vermelha: representa pontos de amostragem da subespécie *Plasmodium nucleophilum toucani*.

Tabela 1. Revisão sobre registros de hospedeiros e regiões de ocorrência de *Plasmodium nucleophilum*.

Ordens das aves	Famílias das aves	Espécies das aves	País ou região de registro	Referências Bibliográficas
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Milvus migrans</i>	Espanha	PÉREZ-RODRÍGUES et al., 2013
Anseriformes	Anatidae	2 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Alopochen aegyptiacus</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2013
		<i>Cygnus atratus</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
		<i>Netta erythrophthalma</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Nyctidromus albicollis</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Charadriiformes	Laridae	<i>Rynchops niger</i>	Brasil	ROOS et al., 2015
Columbiformes	Columbidae	2 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Columba livia</i>	–	BENNETT et al., 1992
Galliformes	Cracidae	<i>Aburria jacutinga</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
Passeriformes	Cardinalidae	<i>Habia fuscicauda</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982

Continuação

	Certhiidae	<i>Thryothorus longirostris</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
	Cotingidae	1 espécie	–	BENNETT et al., 1993b
	Dendrocolaptidae	1 espécie	–	BENNETT et al., 1993b
	Emberizidae	4 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
	Emberizidae	<i>Arremonops conirostris</i>	Colômbia	BASTO et al., 2006
	Estrildidae	1 espécie	–	BENNETT et al., 1993b
	Fringillidae	2 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Coereba flaveola</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
		<i>Volatinia jacarina</i>	Guiana	DURRANT et al., 2006; MURIEL et al., 2013 (dados não publicados)
	Furnariidae	<i>Cranioleuca pyrrhophia</i>	Uruguai	DURRANT et al., 2006
	Hirundinidae	2 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Neophedina cincta</i>	Uganda	BENNETT et al., 1974
		<i>Petrochelidon pyrrhonota</i>	Estados Unidos	TROUT-FRYXELL et al., 2014 (dados não publicados)
		<i>Riparia riparia</i>	Estados Unidos	OAKGROVE et al., 2014
	Icteridae	<i>Agelaius phoeniceus</i>	Estados Unidos	BARNARD & BAIR, 1986
		<i>Cacicus cela</i>	Guiana	DURRANT et al., 2006
		<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guiana	DURRANT et al., 2006
		<i>Dolichonyx oryzivorus</i>	Estados Unidos	LEVIN et al., 2013
		<i>Gnorimopsar chopi</i>	Uruguai	DURRANT et al., 2006
		<i>Icterus spurius</i>	Panamá	GALINDO & SOUSA, 1966
		<i>Molothrus</i> sp.	México	HEWITT, 1940
		<i>Psarocolius decumanus</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
		<i>Quiscalus quiscula</i>	Estados Unidos	BARNARD & BAIR, 1986
	Macrosphenidae	<i>Sylvietta brachyura</i>	Etiópi	ASHFORD et al., 1976
	Mimidae	<i>Dumetella carolinensis</i>	Estados Unidos	MANWELL, 1935; HERMAN, 1938
	Monarchidae	<i>Terpsiphone viridis</i>	Etiópi	ASHFORD et al., 1976
	Muscicapidae	1 espécie	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Trichothraupis melanops</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
	Paridae	<i>Parus major</i>	Alemanha	IEZHOVA et al., 2005
	Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	Uruguai	DURRANT et al., 2006
		<i>Basileuterus flaveolus</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
		<i>Basileuterus leucoblepharus</i>	Uruguai	DURRANT et al., 2006
		<i>Geothlypis trichas</i>	Estados Unidos	PAGENKNOPP et al., 2008
		<i>Parula pitiayumi</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
		<i>Setophaga petechia</i>	Estados Unidos	SZYMANSKI & LOVETTE, 2005
	Passerellidae	<i>Arremon taciturnus</i>	Colômbia	BASTO et al., 2006
		<i>Spizella passerina</i>	Estados Unidos	HERMAN, 1938 LUCENA, 1939;
		<i>Zonotrichia capensis</i>	Brasil; Uruguai	DURRANT et al., 2006; LACORTE et al., 2013

Continuação

Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	Brasil	LUCENA, 1938; MARZAL et al., 2011
Pipridae	<i>Ceratopipra erythrocephala</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Manacus vitellinus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Pipromorphidae	<i>Mionectes oleagineus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Ploceidae	–	Madagascar	SAVAGE, 2003
	<i>Ploceus cucullatus</i>	Etiópia	ASHFORD et al., 1976
	<i>Ploceus galbula</i>	Etiópia	ASHFORD et al., 1976
	<i>Ploceus intermedius</i>	Etiópia	ASHFORD et al., 1976
	<i>Ploceus nigricollis</i>	Uganda	BENNETT et al., 1974
	<i>Euplectes hordeaceus</i>	África	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Sporopipes squamifrons</i>	África	MANWELL & ROSSI, 1975
Rhodinocichlidae	<i>Rhodinocichla rosea</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Sturnidae	<i>Aplonis panayensis</i>	Malásia	SANDOSHAM et al., 1965
	<i>Lamprotornis chalybaeus</i>	África	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Lamprotornis regius</i>	África	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Lamprotornis superbus</i>	África	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Sturnus contra</i>	Tailândia	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Sturnus javanicus</i>	Tailândia; Laos; Camboja	MANWELL & ROSSI, 1975
	<i>Sturnus malabaricus</i>	Índia	NANDI et al., 1984
	<i>Sturnus pagadorum</i>	Índia; Ceilão	MANWELL & ROSSI, 1975
Sylviidae	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	Suécia	RICKLEFS & FALLON, 2002
Thamnophilidae	<i>Formicivora melanogaster</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
Thraupidae	<i>Ramphocelus dimidiatus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Ramphocelus icteronotus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Saltator maximus</i>	Colômbia	BASTO et al., 2006
	<i>Sporophila funerea</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Tangara episcopus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Tangara icterocephala</i>	–	ARCHER et al., (dados não publicados)
	<i>Tangara inornata</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	<i>Tangara palmarum</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Tityridae	<i>Pachyramphus polychopterus</i>	Panamá; Brasil	SOUSA & HERMAN, 1982; LACORTE et al., 2013
Troglodytidae	<i>Cantorchilus longirostris</i>	Brasil	PINHEIRO et al., 2016

Continuação

	Tityridae	<i>Pachyrampus polychopterus</i>	Brasil	SOUSA & HERMAN, 1982; LACORTE et al., 2013
	Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
		<i>Turdus migratorius</i>	Estados Unidos	BARNARD & BAIR, 1986
		<i>Turdus rufiventris</i>	Brasil	LACORTE et al., 2013
	Tyrannidae	<i>Elaenia chiriquensis</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Empidonax flaviventris</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Myiarchus tuberculifer</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Myiozetetes similis</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Zimmerius vilissimus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
	Vireonidae	<i>Hylophilus flavipes</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Vireo flavoviridis</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
		<i>Vireo griseus</i>	Estados Unidos	RICKLEFS & FALLON, 2002
		<i>Vireo olivaceus</i>	Panamá	SOUSA & HERMAN, 1982
Pelecaniformes	Threskiornithidae	1 espécie	–	BENNETT et al., 1993b
Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
Piciformes	Ramphastidae	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Brasil	FERREIRA JÚNIOR, 2012
		<i>Ramphastos toco</i>	Brasil	FERREIRA JÚNIOR, 2012; CHAGAS et al., 2017; Presente estudo
		<i>Ramphastos vitellinus</i>	Brasil	FERREIRA JÚNIOR, 2012; Presente estudo
Psittaciformes	Psittacidae	2 espécies	–	BENNETT et al., 1993b
		<i>Diopsittaca nobilis</i>	Guiana	DURRANT et al., 2006
		<i>Guaruba guarouba</i>	Brasil	CHAGAS et al., 2017
Sphenisciformes	Spheniscidae	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Brasil	VANSTREELS et al., 2015
Piciformes	Ramphastidae	<i>Andigena laminirostris</i> ^a	América do Sul	MANWELL & ROSSI, 1975
		<i>Ramphastos swainsonii</i> ^a	Brasil	MANWELL & SESSLER, 1971

^a Registros de *Plasmodium nucleophilum toucani*.

5.3.4 Reconstruções filogenéticas

No presente estudo foram obtidas três sequências idênticas do gene *cyt b* de *P. nucleophilum* isoladas de duas espécies de hospedeiros (*R. toco* e *R. vitellinus*). Essas sequências agruparam com linhagens de *Plasmodium* spp. e outras já caracterizadas de *P. nucleophilum* disponíveis em bancos de dados (Figura 3). Essas sequências emergiram juntamente com outro clado monofilético, onde estavam incluídas as sequências de *P.*

paranucleophilum obtidas no presente estudo e apresentadas no Capítulo II, com altos valores de suporte (95/1) (Figura 3), destacando assim sua proximidade filogenética, como apontado por nossos dados morfológicos, sugerindo que elas constituem duas espécies independentes, mas próximas. Linhagens desses dois clados contendo *P. nucleophilum* e *P. paranucleophilum* apresentaram divergência genética média de 2,48% (Tabela 3 do Capítulo II). A divergência genética encontrada entre as sequências de *P. nucleophilum* do presente estudo com as outras de *P. nucleophilum* e *Plasmodium* spp. agrupadas no mesmo clado, variou de 0 a 0,6% (Tabela 2), já em comparação às sequências de *P. paranucleophilum*, também do presente estudo (Capítulo II), a divergência variou de 2,3% a 2,5% (Tabela 2).



Figura 3. Árvore filogenética inferida pelas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) baseada em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) de espécies de hemosporídeos aviários. *Leucocytozoon* spp. foram usados como grupo externo. Somente probabilidades maiores que 50% estão indicadas próximo aos clados (ML / BI). As sequências obtidas no presente estudo são destacadas em negrito. Barra representa 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

Tabela 2. Divergências genéticas com base em fragmentos de 479bp do gene mitocondrial citocromo *b* entre *Plasmodium nucleophilum*, *plasmodium paranucleophilum* e linhagens de *Plasmodium* spp. próximas usadas nas análises filogenéticas. As linhagens do presente estudo estão destacadas em negrito. As divergências genéticas estão dadas em porcentagem.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
1 <i>Plasmodium</i> sp. (DQ241530)	0																																		
2 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (JX467689)	0	0																																	
3 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KM365040)	0	0	0																																
4 <i>Plasmodium</i> sp. (JN819335)	0	0	0	0																															
5 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KJ577723)	0	0	0	0	0																														
6 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867670)	0	0	0	0	0	0																													
7 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867671)	0	0	0	0	0	0	0																												
8 <i>Plasmodium</i> sp. (HF543647)	0	0	0	0	0	0	0	0																											
9 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (DENPET03)	0	0	0	0	0	0	0	0	0																										
10 <i>Plasmodium</i> sp. (JX021474)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																									
11 <i>Plasmodium</i> sp. (JX029888)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0																								
12 <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KJ577725)	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	0																							
13 <i>Plasmodium</i> sp. (KC867669)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0																						
14 <i>Plasmodium</i> sp. (JX021476)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	0																					
15 <i>Plasmodium</i> sp. (KF771988)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	0	0																				
16 <i>P. nucleophilum</i> (KX159496)	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0																			
17 <i>P. nucleophilum</i> (KX159489)	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0	0																		
18 <i>P. nucleophilum</i> (KX159488)	0,2	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0	0	0																	
19 <i>Plasmodium</i> sp. (KJ620787)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0															
20 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159492)	2,5	2,7	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0														
21 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159490)	2,5	2,7	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0													
22 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159491)	2,5	2,7	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0	0												
23 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159495)	2,5	2,7	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0	0	0											
24 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159493)	2,3	2,5	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0	0	0	0										
25 <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159494)	2,4	2,5	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0	0	0	0	0									
26 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546135)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0							
27 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546136)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0							
28 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546134)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0					
29 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546137)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0					
30 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546138)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0				
31 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546139)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0			
32 <i>Plasmodium</i> sp. (JX546140)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,7	2,7	2,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	
33 <i>Plasmodium ashfordi</i> (GRW02)	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,2	5,2	5,6	5,6	5,6	5,7	5,6	5,6	5,4	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	5	5	5	5	5	5	5	0

5.3.5 Sumário taxonômico

Plasmodium (Novyella) nucleophilum MANWELL, 1935

Sequências de DNA: linhagens do gene mitocondrial citocromo *b*: RTCT23, RVCT27, e RTCT285 (479bp, números de acesso no GenBank: KX159488, KX159489 e KX159496).

Local de infecção: Todas as formas foram observadas em eritrócitos maduros.

Prevalência: das 19 aves examinadas, cinco estavam infectadas por *P. nucleophilum*, com prevalência total de 26,31%. As aves infectadas incluíram 4 *Ramphastos toco* (prevalência de 21,05%) e 1 *Ramphastos vitellinus* (prevalência de 5,26%).

Distribuição geográfica: Distribuída no mundo todo, com exceção da Austrália e Antártida, com número maior de registros no continente americano.

Esfregaços sanguíneos representativos: Esfregaços sanguíneos representativos da espécie foram depositados na coleção do Laboratório de Protozoologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (números de acesso: lâminas 23, 27 e 285).

5.4 DISCUSSÃO

A espécie *P. nucleophilum* foi identificada por apresentar características morfológicas semelhantes às descritas em VALKIŪNAS (2005) e em CHAGAS et al. (2013), tais como (1) trofozoítos, esquizontes e gametócitos muito nucleofílicos; (2) esquizontes maduros que podem deslocar o núcleo do eritrócito infectado; (3) gametócitos maduros pequenos, apresentando na maioria das vezes comprimento médio menor que 10 µm e (4) ausência de fanerozoítos em linfócitos no sangue periférico (Figura 1). As três últimas características diferenciam essa espécie de *P. paranucleophilum* (MANWELL & SESSLER, 1971b; VALKIŪNAS, 2005). Devido à baixa parasitemia de infecção, não foi possível uma análise morfométrica e uma descrição morfológica completa da espécie *P. nucleophilum*, e nem separação e caracterização das subespécies *P. nucleophilum toucani* e *P. nucleophilum nucleophilum*.

De acordo com a revisão realizada no presente estudo, *P. nucleophilum* já foi registrado em 114 espécies de hospedeiros de várias ordens e famílias, sendo a maioria dos registros, cerca de 82%, em Passeriformes (Figura 2 e Tabela 1), o que pode evidenciar a baixa especificidade desse hemosporídeo. *Plasmodium nucleophilum* foi primeiramente encontrado e descrito nos Estados Unidos no ano de 1935, por MANWELL na espécie *Dumetella carolinensis* e depois reportado nas espécies *Spizella passerina*, *Passer domesticus*, *Zonotrichia capensis* e *Molothrus* sp. em outras partes do continente americano (HERMAN, 1938; LUCENA, 1938; 1939; HEWITT, 1940) (Tabela 1). Acreditava-se então que essa espécie de parasito era restrita a aves americanas, até o momento que foi também observada em aves da Malásia, países da África como Uganda e Etiópia, Tailândia e Índia (SANDOSHAM et al., 1965; BENNETT et al., 1974; MANWELL & ROSSI, 1975; ASHFORD et al., 1976; NANDI et al., 1984). O primeiro registro dessa espécie na Europa se deu apenas no ano de 2002, onde foi encontrada em *Acrocephalus arundinaceus* na Suécia por RICKLEFS & FALLON, registrada depois na Alemanha por IEZHOVA et al. (2005) em *Parus major* e na Espanha em *Milvus migrans* por PÉREZ-RODRÍGUES et al. (2013). A maioria dos registros dessa espécie de parasito foram feitos no continente americano (MANWELL, 1935; HERMAN, 1938; HEWITT, 1940; GALINDO & SOUSA, 1966; SOUSA & HERMAN, 1982; BARNARD & BAIR, 1986; SZYMANSKI & LOVETTE, 2005; BASTO et al., 2006; DURRANT et al., 2006; PAGENKNOPP et al., 2008; LEVIN et al., 2013; OAKGROVE et al., 2014), sendo encontrada desde a América do Norte até a América do Sul, com destaque para o Brasil, onde foram registradas 26 espécies infectadas por esse hemosporídeo (Tabela 1; Figura 2) (LUCENA, 1938; 1939; MANWELL & SESSLER, 1971a; MARZAL et al. 2011; FERREIRA-JÚNIOR, 2012; CHAGAS et al., 2013; LACORTE et al., 2013; PINHEIRO et al., 2016; ROOS et al., 2015; VANSTREELS et al., 2015).

No Brasil, *P. nucleophilum* foi registrado pela primeira vez por LUCENA (1938) na espécie *Passer domesticus* examinada in São Paulo e depois em 1939, pelo mesmo autor e região, em *Zonotrichia capensis*. MANWELL & SESSLER (1971a) encontraram a espécie em *Ramphastos toco* (Piciformes) e perceberam algumas diferenças na morfologia de formas exoeritrocíticas, como o desenvolvimento de muitos fanerozoítos em canários e em formas eritrocíticas, como merontes jovens menos nucleofílicos, e propuseram a subespécie *P. nucleophilum toucani*. Essa subespécie foi observada também em *Andigena laminirostris* na América do Sul por MANWELL & ROSSI (1975) e desde então informações mais detalhadas de sua morfologia, filogenia, especificidade e distribuição tem sido pouco investigadas. *Plasmodium nucleophilum* foi encontrado ainda em outros estudos realizados no Brasil, onde foi observado em *Passer domesticus* (MARZAL et al., 2011); em três espécies da família Ramphastidae (FERREIRA-JÚNIOR, 2012); em várias espécies de Passeriformes da Mata

Atlântica (LACORTE et al., 2013); em *Alopochen aegyptiacus* (CHAGAS et al., 2013), em *Cantorchilus longirostris* (PINHEIRO et al., 2016); em pinguins migrantes da espécie *Spheniscus magellanicus* (VANSTREELS et al., 2015); em *Rynchops niger* (ROOS et al., 2015) e em espécies mantidas em cativeiro no zoológico de São Paulo (CHAGAS et al., 2017).

Quanto às análises filogenéticas, as três sequências de *P. nucleophilum* do presente estudo (RTCT285, RVCT27 e RTCT23) formaram um clado monofilético com as sequências de *P. nucleophilum* e *Plasmodium* sp. já depositadas nos bancos de dados (Figura 3). A divergência genética encontrada entre as sequências de *P. nucleophilum* do presente estudo com as outras usadas nas análises filogenéticas variou de 0 a 0,6% (Tabela 2), estando abaixo de 1%, conforme proposto por alguns autores, como OUTLAW & RICKLEFS (2014).

A subespécie *P. nucleophilum toucani* só foi encontrada, em infecção natural, em aves da família Ramphastidae (Tabela 1) e no presente estudo foi encontrado *P. nucleophilum* em duas espécies dessa família, *R. vitellinus*, reportada como novo hospedeiro e *R. toco*, hospedeiro onde foi descrita a subespécie *P. nucleophilum toucani*. Apesar da realização do estudo, onde foram observadas formas eritrocíticas e sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo *b* realização da filogenia, não foi possível uma separação e identificação da subespécie em *P. nucleophilum toucani* ou *P. nucleophilum nucleophilum* (Figura 1; Figura 3), pois não foram visualizadas diferenças na morfologia das formas eritrocíticas e as sequências de DNA obtidas formaram um clado juntamente com outras sequências de *P. nucleophilum* já depositadas. Para maior esclarecimento dessas questões e para obtenção de mais informações acerca dessas subespécies são necessários mais estudos com observação de formas exoeritrocíticas, infecção experimental em diferentes hospedeiros e análises filogenéticas usando múltiplos marcadores.

5.5 CONCLUSÕES

1. A separação e identificação das subespécies *P. nucleophilum toucani* e *P. nucleophilum nucleophilum* usando apenas fragmentos de DNA de 478bp do gene *cyt b* não é possível;
2. *Plasmodium nucleophilum* tem maioria dos registros realizados em países americanos, sendo o Brasil, o país de maior destaque;
3. Foram constatadas cerca de 114 espécies de aves hospedeiras para a espécie *P. nucleophilum*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; LANE, C.E.; LUKEŠ, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; LEGALL, L.; LYNN, D.H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E.A.D.; MOZLEY-STANRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, p. 429-493, 2012.

ALLEY, M.R.; FAIRLEY, R.A.; MARTIN, D.G.; HOWE, L.; ATKINSON, T. An outbreak of avian malaria in captive yellowheads/mohua (*Mohoua ochrocephala*). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 56(5), p. 247-251, 2008.

ANDERY, D.A.; FERREIRA JUNIOR, F.C.; ARAÚJO, A.V.; VILELA, D.A.R.; MARQUES, M.V.R.; MARIN, S.Y.; HORTA, R.S.; ORTIZ, M.C.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R.S. Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 169-286, 2013.

ASHFORD, R.W.; PALMER, T.T.; ASH, J.S.; BRAY, R.S. Blood parasites of ethiopian birds 1. General survey. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 12(3), p. 409-426, 1976.

ATKINSON, C.T.; WOODS, K.L.; DUSEK, R.J.; SILEO, L.S.; IKO, W.M. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology**, v. 111, p. 59-69, 1995.

ATKINSON, C.T.; DUSEK, R.J.; WOODS, K.L.; IKO, W.M.J. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, p. 197-204, 2000.

ATKINSON, C.T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. **Parasitic diseases of wild birds**. Wiley-Blackwell Publishing. Ames, IA, EUA, 2008, 595 p.

BARNARD, W.H. & BAIR, R.D. Prevalence of avian hematozoa in Central Vermont. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22(3), p. 365-374, 1986.

BASTO, N.; RODRÍGUEZ, O.A.; MARINKELLE, C.J.; GUTIÉRREZ, R.; MATTA, N.E. Haematozoa in birds from la macarena national natural park (Colombia). **Caldasia**, v. 28, p. 371-377, 2006.

BEADELL, J.S.; GERING, E.; AUSTIN, J.; DUMBACHER, J.P.; PEIRCE, M.A.; PRATT, T.K.; ATKINSON, C.T.; FLEISCHER, R.C. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3829-3844, 2004.

BEADELL, J.S.; ISHTIAQ, F.; COVAS, R.; MELO, M.; WARREN, B.H.; ATKINSON, C.T.; BENSCH, S.; GRAVES, G.R.; JHALA, Y.V.; PEIRCE, M.A.; RAHMANI, A.R.; FONSECA, D.M.; FLEISCHER, R.C. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, p. 2935-2944, 2006.

- BEADELL, J.S.; COVAS, R.; GEBHARD, C.; ISHTIAQ, F.; MELO, M.; SCHMIDT, B.K.; PERKINS, S.L.; GRAVES, G.R.; FLEISCHER, R.C. Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 257-266, 2009.
- BEIER, J.C.; STRANDBERG, J.; STOSKOPF, M.K.; CRAFT, C. Mortality in robins (*Turdus migratorius*) due to avian malaria. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17(2), p. 247-250, 1981.
- BELO, N.O.; PASSOS, L.F.; JÚNIOR, L.M.C.; GOULART, C.E.; SHERLOCK, T.M.; BRAGA, E.M. Avian malaria in captive psittacine birds: detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p. 220-224, 2009.
- BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T.; REIS, S.E.; RICKLEFS, R.O.; BRAGA, E.M. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct Cerrado habitats in Brazil. **PLoS ONE**, v. 6(4), p. 10, 2011.
- BENNETT, G.F. & CAMPBELL, A.G. Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. **Canadian Journal of Zoology**, v. 50, p. 1269-1275, 1972.
- BENNETT, G.F.; OKIA, N.O.; CAMERON, M.F. Avian hematozoa of some ugandan birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 10(4), p. 458-465, 1974.
- BENNETT, G. & LOPES, O.S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 117-134, 1980.
- BENNETT, G.F.; EARLÉ, R.A.; DU TOIT, H.; HUCHZERMAYER, F.W. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-Saharan birds. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 59(1), p. 1-73, 1992.
- BENNETT, G.F.; PEIRCE, M.A.; ASHFORD, R.W. Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. **Journal of Natural History**, p. 993-1001, 1993a.
- BENNETT, G.F.; BISHOP, M.A.; PEIRCE, M.A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. **Systematic Parasitology**, v. 26, p. 171-179, 1993b.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R.T. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, p. 1583-1589, 2000.
- BENSCH, S.; PÉREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, v. 58, p. 1617-1621, 2004.
- BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1353-1358, 2009.

BERNOTIENĖ, R.; PALINAUSKAS, V.; IEZHOVA, T.; MURAUSKAITĖ, D.; VALKIŪNAS, G. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. **Experimental Parasitology**, v. 163, p. 31-37, 2016.

BERNOTIENĖ, R. & VALKIŪNAS, G. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects. **Malaria Journal**, v. 15, p. 283, 2016

BOEHME, U.; OTTO, T.D.; COTTON, J.; STEINBISS, S.; SANDERS, M.; OYOLA, S.O.; NICOT, A.; GANDON, S.; PATRA, K.P.; HERD, C.; BUSHHELL, E.; MODRZYNSKA, K.K.; BILLKER, O.; VINETZ, J.M.; RIVERO, A.; NEWBOLD, C.I.; BERRIMAN, M. Complete avian malaria parasite genomes reveal host-specific parasite evolution in birds and mammals. **bioRxiv**, 2016.

BRAGA, M.B.; SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; VALKIŪNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 (I), p. 3-11, 2011.

BUENO, M.G.; LOPEZ, R.P.G.; DE MENEZES, R.M.T.; COSTA-NASCIMENTO, M.J.; LIMA, G.F.M.C.; ARAÚJO, R.A.S.; GUIDA, F.J.V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 123-127, 2010.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83(4), p. 575-583, 1997.

CAMPBELL, T.W. **Avian Hematology and Cytology**. 2^a ed., Iowa State University Press, 1995, p. 30-34.

CANNELL, B.L.; KRASNEC, K.V.; CAMPBELL, K.; JONES, H.I.; MILLER, R.D.; STEPHENS, N. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). **Veterinary Parasitology**, v. 197(1-2), p. 74-84, 2013.

CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; NERY, C.V.C.; HENRIQUE, P.C.; GONZALEZ, I.H.L.; MONTEIRO, E.F.; GUIMARÃES, L.O.; ROMANO, C.M.; KIRCHGATTER, K. *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 286-291, 2013.

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

CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; DE OLIVEIRA GUIMARÃES, L.; MONTEIRO, E.F.; GUIDA, F.J.V.; SIMÕES, R.F.; RODRIGUES, P.T.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E.J.;

KIRCHGATTER, K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria Journal**, v. 16, p. 83, 2017.

CHAVATTE, J.M.; UZBEKOV, R.; PAPERNA, I.; RICHARD-LENOBLE, D.; LANDAU, I. Ultrastructure of erythrocytic stages of avian *Plasmodium* spp. of the sub-genus *Novyella* and its “globule”. **Parasite**, v. 17, p. 123-127, 2010.

CLARK, N.J.; CLEGG, S.M.; LIMA, M.R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 329-338, 2014.

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

CLEMENT, P. & HATHWAY, R. **Thrushes**. A & C Black, London, 2000, 463 p.

COLLAR, N.J. Family Turdidae (Thrushes). In: Del Hoyo J, Elliot A, Christie DA (eds) **Handbook of the birds of the world**, vol 10. Lynx Edicions, Barcelona, p. 514-807, 2005.

CORRADETTI, A.; NERI, I.; SCANGA, M. Segnalazione in Italia di *Plasmodium praecox* var. *matutinum* in *Turdus iliacus*, e separazione di questo plasmodio da *Plasmodium praecox* come specie distinta: *Plasmodium matutinum* Huff, 1937. **Ibidem**, v. 2, p. 333-343, 1960.

CORRADETTI, A.; NERI, I.; PALMIERI, C.; VEROLINI, F.; GIULIANI, V.; SCANGA, M. Note su *Plasmodium vaughani* e su un plasmodio con ciclo schizogonico endoemoblastico di tipo *elongatum* rinvenuti in *Turdus merula*. **Ibidem**, v. 3, p. 97-100, 1961.

CORRADETTI, A.; VEROLINI, F.; NERI, I. *Plasmodium (Haemamoeba) giovannolai* n. sp. parassita di *Turdus merula*. **Parassitologia**, v. 5, p. 11-18, 1963.

CORRADETTI, A. & SCANGA, M. *Plasmodium (Novyella) vaughani* subsp. *merulae*, n. subsp., parassita di *Turdus merula*, con descrizione del ciclo pre-eritrocitico. **Ibidem**, v. 14, p. 85-93, 1972.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DIMITROV, D.; ZEHTINDJIEV, P.; BENSCH, S. Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: cytochrome *b* lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. **Acta Parasitologica**, v. 55, p. 201-209, 2010.

DIMITROV, D.; VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; ILIEVA, M.; BENSCH, S. Molecular characterization of haemosporidian parasites (Haemosporida) in yellow wagtail (*Motacilla flava*), with description of in vitro ookinetes of *Haemoproteus motacillae*. **Zootaxa**, v. 3666, p. 369-381, 2013.

DIMITROV, D.; ZEHTINDJIEV, P.; BENSCH, S.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T.; VALKIŪNAS, G. Two new species *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporida,

Haemoproteidae) from European birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. **Systematic Parasitology**, v. 87, p. 135-151, 2014.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H. Application of *in-situ* hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. **Avian Pathology**, v. 40(3), p. 315-320, 2011.

DINHOPL, N.; NEDOROST, N.; MOSTEGL, M.M.; WEISSENBACHER-LANG, C.; WEISSENBOCK, H. *In situ* hybridization and sequence analysis reveal an association of *Plasmodium* spp. with mortalities in wild passerine birds in Austria. **Parasitology Research**, v. 114(4), p. 1455-1462, 2015;

DONOVAN, T.A.; SCHRENZEL, M.; TUCKER, T.A.; PESSIER, A.P.; STALIS, I.H. Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20(3), p. 304-313, 2008.

DROVETSKI, S.V.; AGHAYAN, S.A.; MATA, V.A.; LOPES, R.J.; MODE, N.A.; HARVEY, J.A.; VOELKER, G. Does the niche breadth or trade-off hypothesis explain the abundance-occupancy relationship in avian Haemosporidia? **Molecular Ecology**, v. 23(13), p. 3322-3329, 2014.

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

EWEN, J.G.; BENSCH, S.; BLACKBURN, T.M.; BONNEAUD, C.; BROWN, R.; CASSEY, P.; CLARKE, R.H.; PÉREZ-TRIS, J. Establishment of exotic parasites: the origins and characteristics of an avian malaria community in an isolated island avifauna. **Ecology Letters**, v. 15(10), p. 1112-1119, 2012.

FECCHIO, A.; MARINI, M.A.; BRAGA, E.M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no cerrado brasileiro. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, p. 127-135, 2007.

FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E.M.; MARINI, M.A. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. **Emu – Austral Ornithology**, v. 111, p. 132-138, 2011.

FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SVENSSON-COELHO, M.; MARINI, M.A.; RICKLEFS, R.E. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 181-192, 2013.

FERREIRA JÚNIOR, F.C. **Avaliação sanitária de tucanos e araçaris (Aves: Piciformes) em cativeiro no estado de Minas Gerais**. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012, 80 p.

FERRELL, S.T.; SNOWDEN, K.; MARLAR, A.B.; GARNER, M.; LUNG, N.P. Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 38(2), p. 309-316, 2007.

GALINDO, P. & SOUSA, O. Blood parasites of birds from Almirante, Panama, with ecological notes on the hosts. **Revista de Biología Tropical**, v. 14(1), p. 27-46, 1966.

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

GARDINER, C.H.; JENKINS, H.J.; MAHONEY, K.S. Myositis and death in bobwhites, *Colinus virginianus* (L.), due to hemorrhagic cysts of a haemosporozoan of undetermined taxonomic status. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20(4), p. 308-318, 1984.

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

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

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

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

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

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27(2), p. 221-224, 2010.

GUINDON, S. & GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**, v. 52, p. 96-704, 2003.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, p. 307-321, 2010.

GUTIÉRREZ-LÓPEZ, R.; GANGOSO, L.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; FRIC, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, P.; MAILLEUX, M.; MUÑOZ, J.; TOUATI, L.; SAMRAOUI, B.; FIGUEROLA, J. Low prevalence of blood parasites in a long-distance migratory raptor: the importance of host habitat. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 189, 2015.

- HAMILTON, W.D. & ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds. A role for parasites? **Science**, v. 218, p. 384-387, 1982.
- HATCHWELL, B.J.; WOOD, M.J.; ANWAR, M.; PERRINS, C.M. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds *Turdus merula*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 78(4), p. 684-687, 2000.
- HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 797-802, 2004.
- HELLGREN, O.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **The Journal of Parasitology**, v. 93, p. 889-896, 2007.
- HELLGREN, O.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; HASSELQUIST, D.; BENSCH, S. Low haemosporidian diversity and one key-host species in a bird malaria community on a mid-Atlantic island (São Miguel, Azores). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47(4), p. 849-859, 2011.
- HERMAN, C.M. The relative incidence of blood protozoa in some birds from Cape Cod. **American Microscopical Society**, v. 57(2), p. 132-141, 1938.
- HEWITT, R. Studies on blood protozoa obtained from mexican wild birds. **The Journal of Parasitology**, v. 26(4), p. 287-295, 1940.
- HUTCHINS, M.; JACKSON, J.A.; BOCK, W.J.; OLENDORF, D. (eds). **Animal Life Encyclopedia. Volumes 8–11, Birds I–IV**. Gale Group, Farmington Hills, Michigan, 2002, 551 p.
- IEZHOVA, T.A.; VALKIŪNAS, G.; BAIRLEIN, F. Vertebrate host specificity of two avian malaria parasites of the subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. **The Journal of Parasitology**, v. 91(2), p. 472-474, 2005.
- ILGŪNAS, M.; PALINAUSKAS, V.; IEZHOVA, T.A.; VALKIŪNAS, G. Molecular and morphological characterization of two avian malaria parasites (Haemosporida: Plasmodiidae), with description of *Plasmodium homonucleophilum* n. sp. **Zootaxa**, v. 3666, p. 49-61, 2013.
- ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; PALINAUSKAS, V.; IEZHOVA, T.A.; DINHOPL, N.; NEDOROST, N.; WEISSENBACHER-LANG, C.; WEISSENBÖCK, H.; VALKIŪNAS, G. Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium (Giovannolaia) homocircumflexum* infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 15, p. 256, 2016
- IVANOVA, K.; ZEHTINDJIEV, P.; MARIAUX, J.; GEORGIEV, B.B. Genetic diversity of avian haemosporidians in Malaysia: cytochrome *b* lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Selangor. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 33-39, 2015.

KABOEV, O.K.; LUCHKINA, L.A.; TRETIAKOV, A.N.; BAHRMAND, A.R. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. e94, 2000.

KATOH, K. & STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772-780, 2013.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28(12), p. 1647-1649, 2012.

KIM, K.S.; TSUDA, Y.; YAMADA, A. Bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 46(5), p. 1230-1234, 2009.

KNOWLES, S.C.L.; PALINAUSKAS, V.; SHELDON, B.C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, p. 557-569, 2010.

LACORTE, G.A.; FÉLIX, G.M.F.; PINHEIRO, R.R.B.; CHAVES, A.V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F.S.; LEITE, L.O.; SANTOS, F.R.; BRAGA, E.M. Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites— a molecular survey from southeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 8(3), p. 57770, 2013.

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

LEE, K.A.; MARTIN, L.B.; HASSELQUIST, D.; RICKLEFS, R.E.; WIKELSKI, M. Contrasting adaptive immune defenses and blood parasite prevalence in closely related *Passer* sparrows. **Oecologia**, v. 150, p. 383-392, 2006.

LEFÈVRE, T.; ROCHE, B.; POULIN, R.; HURD, H.; RENAUD, F.; THOMAS, F. Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? **Trends of Parasitology**, v. 24, p. 435-439, 2008.

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

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

LOBATO, D.N.C.; BRAGA, E.M.; BELO, N.O.; ANTONINI, Y. Hematological and parasitological health conditions of the Pale-breasted Thrush (*Turdus leucomelas*) (Passeriformes: Turdidae) in southeastern Brazil. **Zoologia**, v. 28(6), p. 771-776, 2011.

LOISEAU, C.; IEZHOVA, T.; VALKIŪNAS, G.; CHASAR, A.; HUTCHINSON, A.; BUERMANN, W.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. **The Journal of Parasitology**, v. 96(1), p. 21-9, 2010.

LOISEAU, C.; HARRIGAN, R.J.; ROBERT, A.; BOWIE, R.C.; THOMASSEN, H.A.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N. Host and habitat specialization of avian malaria in Africa. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 431-441, 2012.

LUCENA, D.T. Malaria aviaria. III — Da presença dos *Plasmodium praecox*, *nucleophilum* e *vaughani* em pássaros de São Paulo. **Folha Médica**, v. 19(34), p. 404-406, 1938.

LUCENA, D.T. **Malária aviária: subsídios para sua sistemática e transmissão**. Oficinas graphicos do Jornal do Commercio, Recife, 1939, p. 126.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜSSMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K.H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32(4), p. 1363-1371, 2004.

LUTZ, H.L.; HOCHACHKA, W.M.; ENGEL, J.I.; BELL, J.A.; TKACH, V.V.; BATES, J.M.; HACKETT, S.J.; WECKSTEIN, J.D. Parasite prevalence corresponds to host life history in a diverse assemblage of afrotropical birds and haemosporidian parasites. **PLoSOne**, v. 10(4), p. e0121254, 2015.

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

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

MANWELL, R.D. How many species of avian malaria parasites are there? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-15(3), p. 265-283, 1935.

MANWELL, R.D. & SESSLER, G.J. Malaria parasites of toucans. **The Journal of Protozoology**, v. 18(4), p. 570-574, 1971a.

MANWELL, R.D. & SESSLER G.J. *Plasmodium paranucleophilum* n. sp. from a south american tanager. **The Journal of Protozoology**, v. 18(4), p. 629-632, 1971b.

- MANWELL, R.D. & ROSSI, G.S. Blood protozoa of imported birds. **The Journal of Protozoology**, v. 22(1), p. 124-127, 1975.
- MARINI, M.A.; REINERT, B.L.; BORNSCHEIN, M.; PINTO, J.C.; PICHORIM, M. Ecological correlates of ectoparasitism in birds from the Atlantic Forest, Brazil. **Ararajuba**, v. 4(5), p. 93-102, 1996.
- MARINOV, M.P.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; ILIEVA, M.; BOBEVA, A.; MARCHETTI, C. Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). **Ethology Ecology and Evolution**, p. -12, 2015.
- MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; MUÑOZ, J.; CAPELLI, G.; MONTARSI, F.; SORIGUER, R.; ARNOLDI, D.; RIZZOLI, A.; FIGUEROLA, J. Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy. **Malaria Journal**, v. 14, p. 32, 2015.
- MARTINSEN, E.S.; PERKINS, S.L.; SCHALL, J.J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 261-273, 2008.
- MARZAL, A.; RICKLEFS, R.E.; VALKIŪNAS, G.; ALBAYRAK, T.; ARRIERO, E.; BONNEAUD, C.; CZIRJÁK, G.A.; EWEN, J.; HELLGREN, O.; HOŘÁKOVÁ, D.; IEZHOVA, T.A.; JENSEN, H.; KRÍŽANAUSKIENĖ, A.; LIMA, M.R.; DE LOPE, F.; MAGNUSSEN, E.; MARTIN, L.B.; MØLLER, A.P.; PALINAUSKAS, V.; PAP, P.L.; PÉREZ-TRIS, J.; SEHGAL, R.N.M.; SOLER, M.; SZÖLLÖSI, E.; WESTERDAHL, H.; ZETINDJIEV, P.; BENSCH, S. Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21905, 2011.
- MARZAL, A. Recent advances in studies on avian malaria parasites. In: Okwa, O.O. (ed.) **Malaria parasites**. InTech, 2012 p. 135-158.
- MASSEY, J.G.; GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum* capistranoae infections in native Hawaiian crows in Hawaii. **The Journal of Parasitology**, v. 82, p. 182-185, 1996.
- MATTA, N.E.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; VALKIŪNAS, G.; AYERBE-QUIÑONES, F.; ACEVEDO-CENDALES, L.D. Description and molecular characterization of *Haemoproteus macrovacuolatus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae), a morphologically unique blood parasite of black-bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnalis*) from South America. **Parasitology Research**, v. 113(8), p. 2991-3000, 2014.
- MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R.A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C.F.; IPPI, S.; SABAT, P.; ROZZI, R.; MCGEHEE, S. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**, v. 33, p. 329-340, 2008.

- MUKHIN, A.; PALINAUSKAS, V.; PLATONOVA, E.; KOBYLKOV, D.; VAKOLIUK, I.; VALKIŪNAS, G. The Strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioural changes in parasitized birds. **PLoS ONE**, v. 11(7), e0159216, 2016.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA G.A.B.; KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NANDI, N.C.; MANDAL, A.K.; CHOUDHURY, A. Blood parasites of some birds from West Bengal, India. **Bulletin of the Zoological Survey of India**, v. 5(2 and 3), p. 45-51, 1984.
- NYLANDER, J.A.A.; OLSSON, U.; ALSTROM, P.; SANMARTÍN, I. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: A bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: *Turdus*). **Systematic Biology**, v. 57(2), p. 257-268, 2008.
- OAKGROVE, K.S.; HARRIGAN, R.J.; LOISEAU, C.; GUERS, S.; SEPPI, B.; SEHGAL, R.N. Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. **International Journal for Parasitology**, v. 44(10), p. 717-727, 2014.
- OLIAS, P.; WEGELIN, M.; ZENKER, W.; FRETER, S.; GRUBER, A.D.; KLOPFLEISCH, R. Avian malaria deaths in parrots, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17(5), p. 950-952, 2011.
- OPPLIGER, A.; CÉLÉRIER, M.L.; CLOBERT, J. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by Haemogregarines. **Parasitology**, v. 113, p. 433-438, 1996.
- OUTLAW, D.C. & RICKLEFS, R.E. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. **Parasitology**, v. 141, p. 1223-1232, 2014.
- PAGENKOPP, K.M.; KLICKA, J.; DURRANT, K.L.; GARVIN, J.C.; FLEISCHER, R.C. Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). **Conservation Genetics**, v. 9(6), p. 1577-1588, 2008.
- PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). **Zootaxa**, v. 1626, p. 39-50, 2007.
- PALINAUSKAS, V.; VALKIŪNAS, G.; BOLSHAKOV, C.V.; BENSCH, S. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): the effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 527-533, 2011.
- PALINAUSKAS, V.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T.A.; BOLSHAKOV, C.V.; JÖNSSON, J.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. A new method for isolation of purified genomic DNA from haemosporidian parasites inhabiting nucleated red blood cells. **Experimental Parasitology**, v. 133(3), p. 275-280, 2013.

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

PAPERNA, I.; YOSEF, R.; CHAVATTE, J.; LANDAU, I. Malarial infections in sedentary and migratory passerine birds in Israel: description of new species. **Parassitologia**, v. 52, p. 411-422, 2010.

PEIRCE, M.A. Infectious disease – Hemoparasites. In: SAMOUR, J. **Avian Medicine**. Elsevier, 2^a ed., 2008 p. 337-342.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, A.; DE LA PUENTE, J.; ONRUBIA, A.; PÉREZ-TRIS, J. Molecular characterization of haemosporidian parasites from kites of the genus *Milvus* (Aves: Accipitridae). **International Journal for Parasitology**, v. 43(5), p. 381-387, 2013.

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

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

PIGEAULT, R.; NICOT, A.; GANDON, S.; RIVERO, A. Mosquito age and avian malaria infection. **Malaria Journal**, v. 14, p. 383, 2015.

PINHEIRO, R.B.P.; FÉLIX, G.M.F.; CHAVES, A.V.; LACORTE, G.A.; SANTOS, F.R.; BRAGA, É.M.; MELLO, M.A.R. Trade-offs and resource breadth processes as drivers of performance and specificity in a host–parasite system: a new integrative hypothesis. **International Journal for Parasitology**, v. 46(2), p. 115-121, 2016.

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

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

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RICKLEFS, R.E. & FALLON, S.M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, p. 885-892, 2002.

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

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61(3), p. 539-542, 2012.

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

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. *Plasmodium* (*Novyella*) *juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 59, p. 14-20, 2004

SAVAGE, A.F. **Identity and prevalence of blood parasites in wild-caught birds from Madagascar**. Tese, University of Florida, 2003, p. 89.

SANDOSHAM, A.A.; BENNETT, G.F.; FONG, Y.L.; OMAR, E.I. A *Plasmodium* sp. from a glossy tree-starling (*Aplonis panayensis strigatus*). **Singapore Medical Journal**, v. 5, p. 7-48, 1965.

SCAGLIONE, F.E.; CANNIZZO, F.T.; CHIAPPINO, L.; SERENO, A.; RIPEPI, M.; SALAMIDA, S.; MANUALI, E.; BOLLO, E. *Plasmodium* spp. in a captive raptor collection of a safaripark in northwest Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 123-125, 2016.

SCHRENZEL, M.D.; MAALOUF, G.A.; KEENER, L.L.; GAFFNEY, P.M. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. **The Journal of Parasitology**, v. 89(5), p. 1025-1033, 2003.

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

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

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

SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; LACORTE, G.A.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; VANSTREELS, R.E.T.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J.L.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, É.M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins. **Parasitology International**, v. 62(2), p. 165-171, 2013.

SOUSA, O.K. & HERMAN, C.M. Blood parasites of birds from Chiriqui and Panama provinces in the Republic of Panama. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 18(2), p. 205-221, 1982.

STOTZ, D.F.; FITZPATRICK, J.W.; PARKER, T.A.; MOSKOVITS, D.K. (eds.) **Neotropical birds: ecology and conservation**. University of Chicago Press, Chicago. EUA, 1996, p. 478.

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

SZYMANSKI, M.M. & LOVETTE, I.J. High lineage diversity and host sharing of malarial parasites in a local avian assemblage. **The Journal of Parasitology**, v. 91(4), p. 768-774, 2005.

TELFORD, S.R. & FORRESTER, D.J. Morphometric comparisons of the *Plasmodium* (*Novyella*) species reported from North American birds, with comments on a species from the barred owl (*Strix varia* Barton). **Systematic Parasitology**, v. 22, p. 17-24, 1992.

TOMPKINS, D.M. & GLEESON, D.M. Relationship between avian malaria distribution and an exotic invasive mosquito in New Zealand. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, v. 36(2), p. 51-62, 2006.

TOSTES, R.; VASHIST, U.; SCOPEL, K.K.G.; MASSARD, C.L.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 67-74, 2015a.

TOSTES, R.; MARTINELE, I.; VASHIST, U.; CASTAÑÓN, M.C.M.N.; DE FARIA PINTO, P.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Molecular characterization and biochemical and histopathological aspects of the parasitism of *Haemoproteus* spp. in southern caracaras (*Caracara plancus*). **The Journal of Parasitology**, v. 101(6), p. 687-693, 2015b.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA T.A.; SHAPOVAL, A.P. High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. **Journal Of Natural History**, v. 37(22) p. 2647-2652, 2003.

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

VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T.A.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C.V. Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. **The Journal of Parasitology**, v. 92(2), p. 418-22, 2006.

VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; HELLGREN, O.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T.A.; BENSCH, S. Linkage between mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium* (*Novyella*) *ashfordi* sp. nov. **Parasitology Research**, v. 100(6), p. 1311-1322, 2007.

VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T.A.; BENSCH, S. Polymerase chain reaction-based identification of

Plasmodium (Huffia) elongatum, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1185-1193, 2008a.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R.N.M.; BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. **The Journal of Parasitology**, v. 94(6), p. 1395-1401, 2008b.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; LOISEAU, C.; CHASAR, A.; SMITH, T.B.; SEHGAL, R.N.M. New species of haemosporidian parasites (Haemosporida) from African rainforest birds, with remarks on their classification. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1213-1228, 2008c.

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

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A.; EVANS, E.; CARLSON, J.S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, J.E.; SEHGAL, R.N.M. Two new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from Columbiform birds. **The Journal of Parasitology**, v. 99(3), p. 513-521, 2013.

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

VALKIŪNAS, G.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; ŽIEGYTĖ, R.; BERNOTIENĖ, R.; JUSYS, V.; EIGIRDAS, V.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H.; IEZHOVA, T.A. *Plasmodium delichoni* n. sp.: description, molecular characterisation and remarks on the exoerythrocytic merogony, persistence, vectors and transmission. **Parasitology Research**, p. 1-12, 2016.

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

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

VANSTREELS, R.E.T.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; JUNIOR, F.C.F.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, E.M.; CATÃO-DIAS, J.L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic Penguins undergoing rehabilitation in southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, p. 94994, 2014.

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

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

WALTHER, E.L.; VALKIŪNAS, G.; GONZÁLEZ, A.D.; MATTA, N.E.; RICKLEFS, R.E.; CORNEL, A.; SEHGAL, R.N. Description, molecular characterization, and patterns of distribution of a widespread New World avian malaria parasite (Haemosporida: Plasmodiidae), *Plasmodium (Novyella) homopolare* sp. nov. **Parasitology Research**, v. 113(9), p. 3319-3332, 2014.

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

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

ZEHTINDJIEV, P.; IVANOVA, K.; MARIAUX, J.; GEORGIEV, B.B. First data on the genetic diversity of avian haemosporidians in China: cytochrome *b* lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Gansu Province. **Parasitology Research**, v. 112, p. 3509-3515, 2013.

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



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


CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.



Presidente/CEEA



p/ Secretário/CEEA

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 29266-3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29266-3	Data da Emissão: 10/09/2012 13:53	Data para Revalidação*: 10/10/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

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

Cronograma de atividades

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

Observações e ressalvas

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

Equipe

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

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

Código de autenticação: 74714921



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

Atividades X Táxons

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

Material e métodos

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 74714921



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 74714921



**ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA) DO INSTITUTO DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
RURAL DO RIO DE JANEIRO**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 398/2013

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Malária em aves silvestres mantidas em cativeiro*" sob a responsabilidade do Prof. Carlos Luiz Massard, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, processo 23083.09848/2013-50, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 04/11/2013.

A handwritten signature in blue ink that reads 'Jairo Pinheiro da Silva'.

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa e Pós-graduação

Jairo Pinheiro da Silva
Pró-reitor Adjunto de
Pesquisa e Pós-Graduação
SIAPE nº 1109655

ANEXO D – AUTORIZAÇÃO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO) PROTOCOLO 39534-2



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39534-2	Data da Emissão: 27/06/2014 09:58	Data para Revalidação*: 27/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Raquel Cristina Tostes	CPF: 062.338.396-96
Título do Projeto: Malaria em aves silvestres mantidas em cativeiro	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de sangue de aves silvestres mantidas pelo CETAS/RJ	07/2013	07/2015

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Luiz Massard	Coordenador / orientador	257.781.297-34	1400400 IPF-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SEROPEDICA	RJ	CETAS	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittaciformes, Strigiformes, Falconiformes, Piciformes, Passeriformes, Columbiformes

Material e métodos

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

Código de autenticação: 11185492



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39534-2	Data da Emissão: 27/06/2014 09:58	Data para Revalidação*: 27/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Raquel Cristina Tostes	CPF: 062.338.396-96
Título do Projeto: Malaria em aves silvestres mantidas em cativeiro	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Aves)	Puça

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 11185492



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39534-2	Data da Emissão: 27/06/2014 09:58	Data para Revalidação*: 27/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Raquel Cristina Tostes	CPF: 062.338.396-96
Título do Projeto: Malaria em aves silvestres mantidas em cativeiro	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 11185492



Página 3/3