

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

TESE

**Caracterização molecular de novas linhagens de
Trypanosoma em aves no Parque Nacional de Itatiaia
(RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG), Brasil**

Rodrigo Gredilha Duarte

2020



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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOVAS LINHAGENS DE
TRYPANOSOMA EM AVES NO PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA
(RJ/MG) E NA ZONA DA MATA MINEIRA (MG), BRASIL**

RODRIGO GREDILHA DUARTE

Sob a orientação do professor
Huarrisson Azevedo Santos

e Coorientação dos professores
Carlos Luiz Massard e Jairo Dias Barreira

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

Seropédica, RJ
Junho de 2020

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

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

D812c Duarte, Rodrigo Gredilha, 1979-
Caracterização molecular de novas linhagens de Trypanosoma em aves no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG), Brasil / Rodrigo Gredilha Duarte. - Seropédica, 2020.
62 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Jairo Dias Barreira.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2020.

1. Hemoparasitos. 2. Trypanosoma spp. 3. aves neotropicais. 4. Mata Atlântica. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II. Barreira, Jairo Dias, 1955-, coorient. III. Massard, Carlos Luiz, 1947-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1246 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.026828/2021-53

Seropédica-RJ, 22 de abril de 2021.

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

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

TESE APROVADA EM 24/06/2020

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

(Assinado digitalmente em 22/04/2021 16:34)
BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 1971595

(Assinado digitalmente em 22/04/2021 15:57)
CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3103528

(Assinado digitalmente em 22/04/2021 15:53)
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 3701492

(Assinado digitalmente em 22/04/2021 20:22)
ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 013.695.906-79

(Assinado digitalmente em 22/04/2021 18:55)
ALYNNE DA SILVA BARBOSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 095.101.537-02

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1246**, ano:
2021, tipo: **ATA**, data de emissão: **22/04/2021** e o código de verificação: **c49a1fd84e**

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e
ser feliz. Hoje me sinto mais forte, mais feliz
quem sabe!
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei.*

Renato Teixeira e Almir Sater

Dedico essa tese à minha esposa por todo carinho e apoio incondicional nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nelson Duarte Junior e Glória Maria Gredilha Duarte, pois me proporcionaram ensino de qualidade e não pouparam esforços para educar seus dois filhos. Estão sempre ao nosso lado, trazem paz e serenidade para as nossas vidas.

À minha esposa, Andreia De Luca Sacramento, minha melhor amiga e companheira de todas as horas. Agradeço por todo carinho, amor, incentivo e compreensão.

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

Ao professor Carlos Luiz Massard, pela convivência no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, por todos os ensinamentos, palavras sábias de apoio e carinho.

Ao Professor e amigo Jairo Dias Barreira pelo apoio nas análises das lâminas no Laboratório de Parasitologia da UNIRIO, pelos conselhos e indicações bibliográficas, sugestões, contos e histórias profissionais que agregam valor moral e ético.

Aos amigos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores e do Laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ, Cláudia Bezerra, Gabriela Vitari, Maristela Peckle, Ana Paula de Abreu, Renata Lins, pela receptividade, paciência, ajuda com as coletas e contribuições com o trabalho, pelo carinho, apoio e por todos os momentos de descontração. A todos os colegas do Laboratório de Protozoologia (UFJF) e do Laboratório de Artrópodes Parasitos (UFJF), pela ajuda com as coletas, pelos estudos e conversas.

Aos amigos Rafael Bessa Alves de Carvalho, Stanley Nobre Lima, Gabriel Santos e Carlos Nei Ortúzar Ferreira por toda ajuda, paciência e parceria necessária para a identificação taxonômica das aves e atividades nas campanhas de campo.

Às colegas veterinárias da UFRuralRJ, Andressa Kagohara, Larissa Marry Pchevuzinske e Luiza Carvalho Prado pela ajuda e empenho nos trabalhos de campo e todo o ensinamento de organização e disciplina que as campanhas *in loco* requerem.

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

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

BIOGRAFIA

Rodrigo Gredilha Duarte, filho de Nelson Duarte Junior e Glória Maria Gredilha Duarte. Nasceu em 13 de agosto de 1979, na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Coursou o ensino fundamental na Fundação Técnica Educacional Souza Marques, o qual foi concluído no ano de 1994. Na mesma escola, cursou o ensino médio técnico profissionalizante em patologia clínica, concluído em 1997.

Egresso do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, retomou a sua jornada de graduação em agosto de 2001 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Grande Rio, tornando-se Bacharel em julho de 2007. Em dezembro do ano seguinte, diplomou-se Licenciado em Ciências Agrícolas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Durante sua vida acadêmica, foi bolsista de iniciação científica pela FIOTEC, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, quando teve a oportunidade de estagiar na entomologia médica com o Professor Dr. Rubens Pinto de Mello durante o período de 2003 a 2008, aperfeiçoando-se na Especialização *Latu Sensu* do Curso de Entomologia e Acarologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz entre o período de agosto 2007 a março de 2008. Nesse mesmo ano, ingressou na Pós-Graduação Executiva (MBE) em Meio Ambiente pela COPPE/UFRRJ, concluindo-a em março do ano seguinte.

Em 2012, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, na cidade do Rio de Janeiro-RJ, sob a orientação do Pesquisador Doutor Jeronimo Augusto Fonseca Alencar, sendo bolsista pela CAPES. O título de Mestre foi obtido no ano de 2014.

Em março de 2016, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica-RJ, sendo bolsista pela CAPES sob orientação do Professor Doutor Huarrisson Azevedo Santos e coorientação dos Professores; Doutor Jairo Dias Barreira e Professor Doutor Carlos Luiz Massard.

RESUMO

DUARTE, Rodrigo Gredilha. **Caracterização molecular de novas linhagens de *Trypanosoma* em aves no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG), Brasil** 2020 62p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A Mata Atlântica é considerada um dos 34 *hotspots* de biodiversidade do planeta devido à alta riqueza de espécies e endemismo, porém as ações antrópicas que ocorrem nesse bioma vêm contribuindo com o declínio faunístico e particularmente, infecções por hemoparasitos podem ser mais uma ameaça para as aves desse ecossistema. Desta forma, compreender a diversidade, os padrões de distribuição e os aspectos evolutivos desses parasitos nos hospedeiros aviários é importante para projetar ações em programas de conservação. Neste estudo, amostras de sangue de 188 aves silvestres foram submetidas à análise genética com PCR convencional por meio dos genes 18S rDNA para identificação de *Trypanosoma* sp, resultando no total de 10 amostras positivas; dois espécimes provenientes do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG), *Turdus flavipes* (♀) e *T. albicollis*, assim como nas áreas de captura pertencentes à Zona da Mata Mineira para seis indivíduos da espécie *Tachyphonus coronatus*, uma espécie de *Thamnophilus caerulescens* e uma de *Synallaxis spixi*. Foram submetidos ao sequenciamento 5 clones de cada reação de PCR, totalizando 15 sequências de cada espécime de ave avaliada. Todas as 15 sequências obtidas de *T. albicollis* e de *T. flavipes* foram idênticas entre si. Nos seis espécimes de *T. coronatus*, foram observadas 5 sequências distintas. Todas as sequências de *T. caerulescens* e *S. spixi* foram idênticas entre si. Utilizando a estratégia de clonagem de reações de PCR diferentes foi possível observar em um dos espécimes de *T. coronatus* duas sequências de *Trypanosoma* distintas, o que evidencia uma provável coinfeção. A reconstrução filogenética mostrou o agrupamento das sete novas linhagens com parasitos do gênero *Trypanosoma*. As novas linhagens agruparam-se em dois clados. As linhagens JB03, JB04, JB05, ITA01 e ITA02 agruparam-se junto à espécie *Trypanosoma bennetti*. As linhagens JB01 e JB02 agruparam-se externamente aos clados das espécies *T. avium*, *T. cullicavium* e *T. corvi*. As novas linhagens de tripanosomas encontradas neste estudo agruparam-se com linhagens de ocorrência registrada na Europa, Ásia e África. De acordo com os dados de distância evolutiva obtidos no estudo proposto, podemos observar que uma mesma linhagem genética de *Trypanosoma* sp. é capaz de infectar diferentes espécies de aves, assim como uma mesma espécie de ave pode ser infectada por mais de uma linhagem de *Trypanosoma* sp. Este estudo, de modo inédito, é o primeiro a acessar a diversidade molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves no Brasil. Até então, todos os estudos relacionados com a tripanosomas aviários basearam-se principalmente em relatos de ocorrência em esfregaços sanguíneos de aves em estudos voltados aos hemoparasitos em geral. Para o Brasil, este estudo pioneiro fornece métodos possíveis para investigar a diversidade de tripanosomas aviários e mostra o grande potencial que existe para ser explorado neste grupo de parasitos. Pelos resultados deste estudo, acreditamos que o Brasil, por suas dimensões territoriais e a grande biodiversidade de aves hospedeiras e insetos vetores, possa ser um dos mais ricos em espécies de tripanosomas aviários no mundo.

Palavras-chave: *Trypanosoma* spp.; hemoparasitos, aves neotropicais e Mata Atlântica.

ABSTRACT

DUARTE, Rodrigo Gredilha. **Molecular characterization of new lineages of *Trypanosoma* in birds in the Itatiaia National Park (RJ/MG) and in the Zona da Mata Mineira (MG), Brazil** 2020 62p. Thesis (Doctorate in Veterinary Science, Veterinary Parasitology) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The Atlantic Forest is considered one of the 34 biodiversity hotspots on the planet due to the high richness of species and endemism, but the anthropic actions that occur in this biome have contributed to the fauna decline and particularly, infections by hemoparasites can be one more threat to birds of that ecosystem. Thus, understanding the diversity, distribution patterns and evolutionary aspects of these parasites in avian hosts is important for designing actions in conservation programs. In this study, blood samples from 188 wild birds were subjected to genetic analysis with conventional PCR using the 18S rDNA genes to identify *Trypanosoma* sp, resulting in a total of 10 positive samples; two specimens from the Itatiaia National Park (RJ/MG), *Turdus flavipes* (♀) and *T. albicollis*, as well as in the capture areas belonging to the Zona da Mata Mineira for six individuals of the species *Tachyphonus coronatus*, a species of *Thamnophilus caerulescens* and one from *Synallaxis spixi*. Five clones from each PCR reaction were submitted to sequencing, totaling 15 sequences from each bird specimen evaluated. All 15 sequences obtained from *T. albicollis* and *T. flavipes* were identical to each other. In the six specimens of *T. coronatus*, five distinct sequences were observed. All sequences of *T. caerulescens* and *S. spixi* were identical to each other. Using the strategy of cloning different PCR reactions, it was possible to observe in one of the specimens of *T. coronatus* two distinct *Trypanosoma* sequences, which evidences a probable co-infection. The phylogenetic reconstruction showed the grouping of the seven new lineages with parasites of the genus *Trypanosoma*. The new lineages were grouped into two clades. The lineages JB03, JB04, JB05, ITA01 and ITA02 were grouped together with the species *Trypanosoma bennetti*. The lines JB01 and JB02 were grouped externally to the clades of the species *T. avium*, *T. cullicavium* and *T. corvi*. The new lineages of trypanosomes found in this study were grouped with lineages recorded in Europe, Asia and Africa. According to the evolutionary distance data obtained in the proposed study, we can observe that the same genetic lineages of *Trypanosoma* sp. is capable of infecting different species of birds, just as the same species of bird can be infected by more than one lineage of *Trypanosoma* sp. This study, in an unprecedented way, is the first to access the molecular diversity of parasites of the genus *Trypanosoma* in birds in Brazil. Until then, all studies related to avian trypanosomes were based mainly on reports of occurrence in blood smears from birds in studies focused on hemoparasites in general. For Brazil, this pioneering study provides possible methods to investigate the diversity of avian trypanosomes and shows the great potential that exists to be explored in this group of parasites. Based on the results of this study, we believe that Brazil, due to its territorial dimensions and the great biodiversity of host birds and insect vectors, may be one of the richest species of avian trypanosomes in the world.

Palavras-chave: *Trypanosoma* spp.; hemoparasites, neotropical birds and Atlantic Forest.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Lista de espécies de aves com ocorrência na região do Parque Nacional do Itatiaia, incluídas em algum grau de ameaça de extinção. Os nomes científicos e comuns das espécies seguem o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO 2015). 10

Quadro 2 Descrições dos pontos de captura das aves silvestres dentro do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG). 17

Quadro 3 Localização geográfica, informações ambientais dos locais amostrados na Zona da Mata de Minas Gerais e quantidade de aves coletadas em cada local. 19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** *T. bennetti* n. sp., estirpe KT-2, em esfregaço de cultura a 26 ° C; o cinetoplasto é posterior. 6
- Figura 2** Localização do Parque Nacional de Itatiaia. 7
- Figura 3** Divisão ilustrativa da Parte Baixa e Parte Alta adotadas no diagnóstico da Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional de Itatiaia. 8
- Figura 4** Mapa de localização da Zona da Mata em relação às mesorregiões e às microrregiões do Estado de Minas Gerais. 13
- Figura 5** Mapa temático com os pontos de captura de aves silvestres e coleta de sangue no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG). Área 1, baixo Itatiaia, com pontos amostrais; PNI 1a e PNI 1b (800m altitude), Área 2 com pontos amostrais; PNI 2a e PNI 2b (1.200 a 1.400m altitude), Área 3, alto Itatiaia, com ponto amostral; PNI 3 (2.200m de altitude). 18
- Figura 6** Mapa de satélite com os pontos de captura de aves silvestres e coleta de sangue em áreas da Zona da Mata Mineira. Ponto JB (Jardim Botânico da UFJF), Ponto CAE (Sítio Vista Alegre), Ponto CHA (Sítio Paraíso da Barra) Ponto SBMV (Fazenda Volta Grande). 20
- Figura 7** Localização do Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, em destaque de amarelo a localização do lago artificial. 21
- Figura 8** A) Registro e avaliação no preparo da retirada de sangue B) Esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro C) Recolhimento de sangue em tubos de hemograma para análises moleculares D) Após os procedimentos de coleta o animal é solto novamente à natureza. 22
- Figura 9** Espécies de aves da família Turdidae. O somatório em cada espécie representa o total capturado no PNI. Indivíduos do sexo masculino são apresentados em *T. flavipes* e *T. subalaris* meramente ilustrativos (imagens adaptadas de DEL HOYO et al., 2018). 26

Figura 10 A presença de Trypanosoma na forma tripomastigota com os eritrócitos em lâmina de *Turdus albicollis*. Observa-se a seta indicando o núcleo do parasita. 27

Figura 11 Passeriformes da família Furnariidae, Thraupidae e Thamnophilidae O somatório em cada espécie representa o total capturado na ZMM. Indivíduos do sexo masculino são apresentados meramente ilustrativos (imagens adaptadas de DEL HOYO et al., 2018). 28

Figura 12 Fotomicrografias em aumento de 600x realizadas em microscópio Bx51 de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa 9% contendo formas tripomastigotas do gênero Trypanosoma em aves silvestres. A-J amostras de dois indivíduos de tiê-preto (*Tachyphonus coronatus*). 29

Figura 13 Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 780pb do gene 18S rDNA para o gênero *Trypanosoma* sp. **Poço 1-** Peso Molecular (100bp Plus DNA Ladder™); **Poço 2-** Controle positivo de *T. vivax*; **Poço 3** Controle negativo – amostras consideradas positivas para *Trypanosoma* sp; 18* 23* e 137*. 30

Figura 14 Árvore filogenética do gene 18S rDNA de Trypanosomas aviários inferida por Máxima Verossimilhança sob o modelo evolutivo GTR+G. Os valores próximos aos nós representam os valores posteriores de probabilidade. As linhagens obtidas neste estudo estão marcadas em vermelho. Barra representa 4 substituições para posições de 100 nucleotídeos. 33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Espécies do gênero *Turdus*, capturadas no PNI durante as 8 campanhas entre junho a dezembro de 2007 e março de 2008. 27
- Tabela 2** Distância evolutiva entre as sequências de *Trypanosoma* sp. observadas em aves das espécies *Turdus albicollis*, *T. flavipes*, *Tachyphonus coronatus*, *Thamnophilus caeruleus* e *Synallaxis spixi* capturadas no parque de Itatiaia-RJ e Jardim Botânico-MG. 31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANM	Acima do Nível do Mar
°C	Celsius
CBRO	Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-amino-tetracético
EUA	Estados Unidos da América
FJP	Fundação João Pinheiro
IBGE	IBGE -Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMbio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IN	Instrução Normativa
LHV / E.E.P.P.	Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de
W.O. Neitz	Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz
PCR	PCR - Reação em Cadeia da Polimerase pb: pares de base
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
PNI	Parque Nacional do Itatiaia
PPGBA	Programa de Pós-graduação em Biologia Animal
PPGCV	Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
ReBioPD	Reserva Biológica Municipal Poço D'Anta
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
ZMM	Zona da Mata Mineira

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Os Hemoparasitos em Aves no Mundo	3
2.2 A família Trypanosomatidae	3
2.3 <i>Trypanosoma</i> ssp. em aves	4
2.3.1 <i>Trypanosoma bennetti</i>	5
2.4 O Parque Nacional de Itatiaia	6
2.4.1 Contextualização sobre o Parque Nacional de Itatiaia	6
2.4.2 Localização e geografia do Parque Nacional de Itatiaia	6
2.4.3 O clima no Parque Nacional de Itatiaia	9
2.4.4 A vegetação do Parque Nacional de Itatiaia	9
2.4.5 A fauna de aves do Parque Nacional de Itatiaia	9
2.5 Zona da Mata Mineira	12
2.5.1 Contextualização sobre a Zona da Mata Mineira	12
2.5.2 Localização e geografia da Zona da Mata Mineira	13
2.5.3 O clima na Zona da Mata Mineira	14
2.5.3 A vegetação da Zona da Mata Mineira	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Áreas de estudo	16
3.1.1 Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG)	16
3.1.1.2 Geoprocessamento das áreas do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG)	16
3.1.2 Zona da Mata Mineira	19
3.1.1.2 Geoprocessamento das áreas na Zona da Mata Mineira	19
3.2 Captura e coleta de sangue	21
3.3 Armazenamento e transporte das amostras biológicas	23
3.4 Análises microscópicas	23
3.5 Extração do DNA total	23
3.6 Reação em Cadeia da Polímeras e Convencional	23
3.6.1 Clonagem e Sequenciamento dos Produtos da PCR	24
3.6.2 Análise do Sequenciamento	24

3.6.3 Análises filogenéticas	24
3.7 Autorizações de pesquisa	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Parque Nacional de Itatiaia	26
4.1.1 Espécies de aves examinadas	26
4.1.2 Análise microscópica	27
4.2 Zona da Mata Mineira	28
4.2.1 Espécies de aves examinadas	28
4.2.2 Análise microscópica	28
4.4 Análise Filogenética	32
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO A	54
ANEXO B	56
ANEXO C	57
ANEXO D	58
ANEXO E	59

1 INTRODUÇÃO

As aves se destacam como o grupo de vertebrados com o maior número de espécies da Mata Atlântica, característica que somada a sua alta sensibilidade às alterações ambientais faz com que elas também ocupem o lugar dos vertebrados com o maior número de espécies ameaçadas do bioma (MARINI; GARCIA 2005; OLMOS, 2005). Além disso, 75% das espécies de aves ameaçadas e endêmicas do Brasil encontram-se neste bioma (MARINI; GARCIA, 2005). A Mata Atlântica possui aproximadamente 850 espécies aviárias (CAMPANILI; SCHÄFFER, 2010). As expressivas contribuições históricas dos naturalistas viajantes e os constantes trabalhos de importantes ornitólogos, como o célebre Helmut Sick, bem como a atividade de um expressivo grupo de observadores de aves, fazem da região sudeste, mais especificamente o Rio de Janeiro, o estado que possui a avifauna mais bem conhecida em todo o país (ALVES *et al.*, 2000).

Uma das principais áreas que possuem alta concentração de espécies endêmicas, assim como uma grande biodiversidade (*hotspot*) é a Mata Atlântica brasileira. Entretanto, as ações antrópicas e a destruição ambiental ocorrem constantemente nesse bioma (BRASIL, 2002). O parasitismo é um dos fatores que contribui com a perda da diversidade faunística e particularmente, infecções por hemoparasitos podem ser mais uma ameaça para as aves desse ecossistema. Desta forma, compreender a diversidade, os padrões de distribuição e os aspectos evolutivos desses parasitos nos hospedeiros aviários é importante para projetar ações em programas de conservação.

Scott (1988) mencionou que o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações na abundância relativa, na estrutura de comunidade, na dispersão e na diversidade genética, como também na dinâmica populacional do hospedeiro. Do ponto de vista ecológico, os parasitos são considerados uma força seletiva que influencia todos os aspectos da vida de seu hospedeiro. A dinâmica espacial e temporal da comunidade é afetada pela presença de hemoparasitos (HOLMES; PRICE, 1986; HOLMES, 1996), uma vez que pode causar consequências severas à reprodução das espécies, compromete a imuno-competência e causa debilidade física da ave e, alguns casos, leva ao óbito (MARZAL *et al.*, 2004).

Os hemoparasitos atuam como reguladores do tamanho de populações de hospedeiros e podem até mesmo causar extinções de espécies de aves (VAN RIPER III *et al.*, 1986; FELDMAN *et al.*, 1995), além de afetar a coloração da plumagem, a seleção sexual e o sucesso reprodutivo (HAMILTON; ZUK, 1982; PRUETT-JONES *et al.*, 1990; KIRKPATRICK; RYAN, 1991; RICKLEFS, 1992). Indivíduos altamente parasitados podem se tornar mais susceptíveis aos predadores e menos hábeis para estabelecer territórios (ANDERSON; MAY, 1979).

Os protozoários parasitos do gênero *Trypanosoma* (Ordem: Kinetoplastida, Família: Trypanosomatidae) além de parasitarem outros diversos grupos de vertebrados (APANNIUS, 1991), já foram registrados infectando aves em diversos países (VOTYPKA, 2002; SEHGAL, 2006; SCHOENER, 2018; TASÇI, 2018; PORNANOM, 2019; ELIKWO, 2020). Além dos hospedeiros vertebrados, os parasitos do gênero *Trypanosoma*, que ocorrem em aves, possuem ampla gama de potenciais hospedeiros invertebrados, dípteros das famílias Culicidae, Simuliidae, Ceratopogonidae e Hippobocidae e ácaros da família Dermanyssidae (BENNETT, 1961) que, pela patogenicidade do parasito, tornam-se vetores das tripanossomíases. A primeira descrição de *Trypanosoma* em aves foi realizada em corujas europeias por Basil Danilewsky em 1885. Desde então, os tripanossomatídeos aviários foram descritos em uma grande diversidade de espécies de aves (BENNETT, 1961). A maior concentração das investigações sobre diversidade e registro de tripanossomatídeos aviários

ocorre na Europa e América do Norte, sendo escassos os estudos voltados às aves na América do Sul. No Brasil, os dados sobre a diversidade de espécies de tripanossomatídeos aviários são ausentes e os relatos sobre a ocorrência resumem-se aos estudos com hemoparasitos em geral, principalmente por meio de técnicas de esfregaço sanguíneo (CERQUEIRA, 1906; LUTZ; MEYER, 1908; SPLENDORE, 1910; CARINI; BOTELHO, 1914; CARINI; MACIEL, 1916; PILMMER, 1914; PESSOA, 1935; LUCENA, 1938; LAINSON, 1970; BENNETT; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS *et al.*, 1989; RIBEIRO *et al.*, 2005; SEBAIO, 2010, 2012), quando os tripanossomatídeos se tornam secundários.

Historicamente, os tripanossomatídeos aviários têm sido detectados por meio de esfregaços sanguíneos de aves, pois ocorrem em baixa parasitemia (DEMAREE; MARQUARDT, 1971). Além da baixa parasitemia, a alta variação nas formas do parasito encontradas torna a caracterização específica de *Trypanosoma* nos estudos da área um fato raro (VALKIUNAS, 2011). A complexa taxonomia do grupo também é uma das causas da falta de informações sobre a diversidade das espécies de *Trypanosoma* em aves no Brasil, visto que, mesmo com os estudos ocorrendo ao longo dos últimos 100 anos (CERQUEIRA 1906; LUTZ; MEYER, 1908; SPLENDORE, 1910; CARINI; BOTELHO, 1914; CARINI; MACIEL, 1916; PILMMER, 1912; PESSOA, 1935; LUCENA, 1938; LAINSON, 1970; BENNETT; LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS *et al.*, 1989; RIBEIRO *et al.* 2005; SEBAIO, 2010, 2012), não houve grandes avanços na sistemática do grupo. Ao longo da história taxonômica, foram descritas mais de 100 espécies de tripanossomatídeos aviários no mundo, baseadas em características morfológicas de tripomastigotas no sangue periférico das aves, localização geográfica do registro e, principalmente, o hospedeiro em que ocorria o parasito, assumindo-se a especificidade parasito-hospedeiro (MOLYNEAUX, 1973; BAKER, 1976). Atualmente, com a inserção das análises de biologia molecular no grupo a diversidade de *Trypanosoma* foi acessada de forma mais completa e alguns estudos sugerem que o número de espécies possa ser diferente do que estimado anteriormente (VOTÝPKA; SVOBODOVA, 2004; VALKIUNAS *et al.*, 2011).

Os tripanossomatídeos possuem uma estrutura caracteristicamente complexa no que diz respeito aos genes nucleares de DNA ribossomal (rDNA) com um dos mais complexos padrões de moléculas de RNA. Os genes de rDNA (18S e 24S) sempre foram considerados adequados para se realizar testes de inferências de relacionamentos filogenéticos, isso ocorre principalmente porque esses genes se apresentam em todos os organismos, além de possuírem uma equivalência funcional. A subunidade menor (SSU) e a região geralmente escolhida para as análises, devido à sua facilidade de amplificação por PCR, seu tamanho e o fato de possuir regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas. Estudos utilizando sequências de SSU rDNA têm contribuído com o esclarecimento de questões filogenéticas e evolutivas de *Trypanosoma* spp. (HERNÁNDEZ *et al.*, 1990).

A compreensão da origem do parasitismo e dos ciclos de vida heteroxênicos são eventos importantes a serem realizados pelas análises filogenéticas tornando-se fundamentais para esse entendimento, assim como sugerir possíveis trocas e restrições aos hospedeiros, estruturas ecogeográficas, os possíveis insetos vetores, como também a transmissão por hospedeiro que compartilha o mesmo ambiente, o que desempenha o importante papel na evolução dos tripanossomatídeos. Logo, este estudo tem por objetivo, por meio de um ensaio de PCR eficiente, a detecção de tripanosomas aviários e, de modo inédito, busca investigar a diversidade molecular e as relações filogenéticas de *Trypanosoma* em aves da Mata Atlântica Brasileira analisando novas inferências sobre especificidade e distribuição geográfica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os Hemoparasitos em Aves no Mundo

Os hemoparasitos mais frequentes no sangue periférico de aves é tipicamente compreendido por três gêneros de protozoários do filo Apicomplexa: *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* (DONOVAN *et al.*, 2008). Determinados autores agrupam estes três gêneros em uma única família, a Plasmodiidae (MARTINSEN *et al.*, 2008), enquanto Valkiūnas (2005) separa o gênero *Leucocytozoon*, que existe desde 1905, em uma família própria, a Leucocytozoidae. Além destes três gêneros, existem outros descritos em aves mais raros e menos estudados, entre os quais: *Trypanosoma*, *Hepatozoon*, *Babesia* e *Isoospora* (FROMONT, 1993). Há também uma diversidade significativa de vírus e bactérias que causam patologias nas aves, sendo alguns considerados zoonoses emergentes e re-emergentes em várias regiões zoogeográficas do mundo (CALISHER, 1998; NOVELI, 1997; EIDSON *et al.*, 2001; CHADWICK, 2005).

Segundo Valkiūnas (2005), os hemoparasitos podem ser transmitidos com relativa facilidade entre os hospedeiros a partir do repasto sanguíneo de vetores, com consequente inoculação das formas infectantes nas aves. Uma linhagem de parasito pode infectar múltiplas espécies de hospedeiros (WALDENSTRÖM *et al.*, 2002). Descobriu-se recentemente que a infecção crônica causada pelos hemosporídeos, representados pelos agentes *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., promove o encurtamento dos telômeros e, então, as células morrem, acumulando danos nos tecidos e provocando disfunções nos órgãos. Esses fatores reduzem o tempo de vida das aves, interferindo no sucesso reprodutivo e na propagação da espécie (ASGHAR *et al.*, 2015).

Há inúmeros estudos em várias regiões do mundo sobre a ocorrência e incidência de parasitos sanguíneos de aves, porém ainda relativamente pouco se sabe sobre os fatores ambientais que afetam a evolução e disseminação dos patógenos endêmicos. Os fatores ecológicos que podem contribuir com a disseminação e a distribuição de parasitos no sangue aviário, ainda permanecem pouco compreendidos (GREINER *et al.*, 1975; BENNETT *et al.*, 1982; YOUNG *et al.*, 1993; VALKIUNAS *et al.*, 2005; REULLIER *et al.*, 2006).

2.2 A família Trypanosomatidae

Essa família é formada por uniflagelados e eucariotos unicelulares pertencentes à classe Kinetoplastea que, com os euglenídeos e os diplomonídeos, formam o filo Euglenozoa (Eukaryota: Excavata). A classe Kinetoplastea, formada originalmente pelas subordens Bodonina e Trypanosomatina, ambas definidas segundo parâmetros morfológicos, caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma região da mitocôndria composta por moléculas circulares de DNA (kDNA) concatenadas em uma rede única (STEVENS, 2001; SIMPSON *et al.*, 2006). Há duas características únicas existentes nos Kinetoplastida: a compartimentalização da glicólise dentro de um microcorpo chamado “glicosoma” (MICHELS; HANNAERT, 1994), e o “trans-splicing” de uma sequência curta e conservada de RNA chamada “spliced leader” ou “mini-exon”. Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares levaram a uma revisão taxonômica do grupo, propondo a separação da classe Kinetoplastea em duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A subclasse Prokinetoplastina possui uma única ordem (Prokinetoplastida). A subclasse Metakinetoplastina inclui quatro ordens, sendo três de bodonídeos (Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida), que incluem espécies de vida livre e parasitárias, e a ordem

Trypanosomatida que alberga uma única família (Trypanosomatidae) de espécies de parasitos obrigatórios (MOREIRA *et al.*, 2004).

A taxonomia da família Trypanosomatidae se baseia em parâmetros morfológicos, ciclo de vida e hospedeiros de origem. Quanto ao ciclo de vida, os tripanossomatídeos podem ser monoxênicos, quando completam seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro, geralmente insetos de diversas ordens ou heteroxênicos, quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros, sendo um invertebrado e um vertebrado (SIMPSON *et al.*, 2006; STEVENS, 2001, VICKERMAN, 1976, WALLACE, 1966; WALLACE *et al.*, 1983).

Os tripanossomatídeos diferem quanto à forma, comprimento e largura do corpo, comprimento do flagelo livre, tamanho e posição do núcleo e do cinetoplasto entre outras caracterizações. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a presença ou não de membrana ondulante e flagelo livre determinam as diferentes formas apresentadas por estes flagelados durante seus ciclos de vida: amastigota, coanomastigota, promastigota, opistomastigota, epimastigota, tripomastigota e opistomastigota. Formas consideradas estágios de transição ou raramente encontradas, como paramastigotas e endomastigotas, também foram descritas (WALLACE *et al.*, 1983; WALLACE, 1966).

Várias espécies do gênero *Trypanosoma* causam doenças parasitárias de relevante importância médica e veterinária em todas as partes da África, Ásia e as Américas. São parasitas que exibem considerável diversidade genética intraespecífica, variação que tem complicado sua classificação taxonômica. A diversidade e variação podem ser definidas em ambos os níveis: do genoma e genes individuais. O genoma nuclear mostra plasticidade inter e intraespécies em termos de número de cromossomas e tamanho (cariótipo molecular). O genoma mitocondrial (kDNA) também varia entre espécies, especialmente em termos de tamanho de minicírculos e organização (EMBRAPA, 1997).

Descritos em todas as classes de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), o gênero *Trypanosoma* alberga numerosas espécies em que parasitam uma ampla diversidade de hospedeiros. Esses parasitos são transmitidos por uma diversidade de vetores, incluindo organismos das ordens Diptera (moscas, mosquitos), Hemiptera (triatomíneos), Siphonaptera (pulgas), Acarina (carrapatos) e anelídeos (sanguessuga) (HAMILTON *et al.*, 2007).

As recombinações genéticas (reprodução sexuada) são eventos raros entre os tripanossomatídeos que, em geral, se propagam na natureza como populações clonais, apesar da formação de híbridos já ter sido sugerida em *T. cruzi* (GAUNT; MILES, 2000). Entretanto, os estudos de diversidade genética demonstram que a estrutura populacional dos tripanossomatídeos é basicamente clonal e que, se existentes na natureza, as recombinações são muitas esporádicas (TIBAYRENC, 1995).

2.3 *Trypanosoma* ssp. em aves

Com exceção das regiões polares, os tripanossomatídeos aviários ocorrem em todos os continentes, sendo que a primeira descrição de *Trypanosoma* em aves foi feita pelo professor Basil Danilewsky, em 1885, a partir da coruja *Strix aluco*, que diagnosticou *Trypanosoma avium* (BENNETT *et al.*, 1994). Muitas espécies de aves são parasitadas por *Trypanosoma* spp., aves canoras e raptos com mais frequência (APANUS, 1991), enquanto Kucera (1983) sugere que patos, gansos e pardais raramente são infectados. Aproximadamente 20% de todas as espécies conhecidas de *Trypanosoma* são descritas para aves, na maioria dos casos os hemoprotozoários aviários são inofensivos para seus hospedeiros (MACFIE; THOMSON, 1929; BAKER, 1976); assim, eles permanecem pouco estudados, embora não sejam menos interessantes. Na África, pesquisas evidenciaram a forma tripomastigota de *Trypanosoma*

naviformis em passarinhos e beija-flores, e há também relatos de inúmeras aves positivas para *Trypanosoma* spp. nesse continente (SEHGAL *et al.*, 2011).

Votýpka *et al.*, (2002) demonstraram que os simulídeos são os vetores com maior potencial ornitofílico de tripanosomatídeo isolado de gavião-da-europa (*Accipiter nisus*), águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*), falcão-de-dorso-malhado (*Falco tinnunculus*) e a águia-pomerana (*Aquila pomarina*) das diversas localidades na Boêmia Central, Sul da Morávia e Boêmia Oriental (República Tcheca), e Nordeste da Eslováquia, respectivamente. Entretanto, a situação não é tão clara para outros potenciais vetores. Os hipoboscídeos (Diptera:Hippoboscidae) são mencionados como vetores de *Trypanosoma corvi*, um ectoparasita de Passeriformes da família Corvidae na Grã-Bretanha (BAKER, 1956 a, b; MUNGOMBA *et al.*, 1989).

Evidências experimentais mostraram que uma espécie de *Trypanosoma* pode ser transmitida a uma variedade de espécies potenciais de aves hospedeiras (BENNETT 1961; WOO; BARTLETT 1982), refutando a hipótese de especificidade das espécies hospedeiras. Bennett *et al.* (1994) descobriram que muitas espécies de aves estão infectadas com tripanosomas e são morfologicamente indistinguíveis com base em critérios morfológicos. Já Apanius (1991), Atkinson e Van Riper (1991) e Svobodová e Votýpka (1998) descrevem que o tripanosomatídeo aviário aparece, geralmente, em baixas intensidades em seus hospedeiros e os exames de esfregaços de sangue são insatisfatórios para a detecção de infecções. Zídková *et al.* (2012) comentaram que apenas algumas descrições confiáveis de espécies de tripanosomas estão atualmente disponíveis. Existe uma grande discrepância entre o número de espécies descritas e o número de espécies bem caracterizadas. Quase 100 espécies foram descritas desde então, de acordo com Sehgal *et al.* (2006).

2.3.1 *Trypanosoma bennetti*

Essa espécie foi descrita por Kirkpatrick *et al.* (1986) resultando no reconhecimento de *Trypanosoma bennetti* n. sp. como um novo táxon de *Trypanosoma* do hospedeiro vertebrado *Falco sparverius*, localizado no Condado de Cape May, Nova Jersey, EUA. Amostras do tipo: organismos vivos e cultivados da cepa KT-2 foram depositadas e estão disponíveis na American Type Culture Collection e no número de catálogo atribuído ATCCB50 102. A homenagem da espécie *T. bennetti* foi feita para reconhecer as muitas das contribuições do Dr. Gordon F. Bennett na ciência parasitológica em hematozoários aviários.

Kirkpatrick *et al.* (1986) descrevem a morfologia desta espécie de formas cultivadas em 26°C: muito pequena e delgado com núcleo oval anterior a centralmente localizado e cinetoplasto pequeno e redondo. Cresce *in vitro* (26 ° C) geralmente com o cinetoplasto posterior ao núcleo (mais próximo do núcleo do que da extremidade posterior) (Figura 1). De 34 a 36°C, o cinetoplasto (com raiz flagelar) é visto migrando próximo a extremidade posterior. Os organismos de *T. bennetti* n. sp não parecem dividir quando mantidos em temperaturas mais altas.

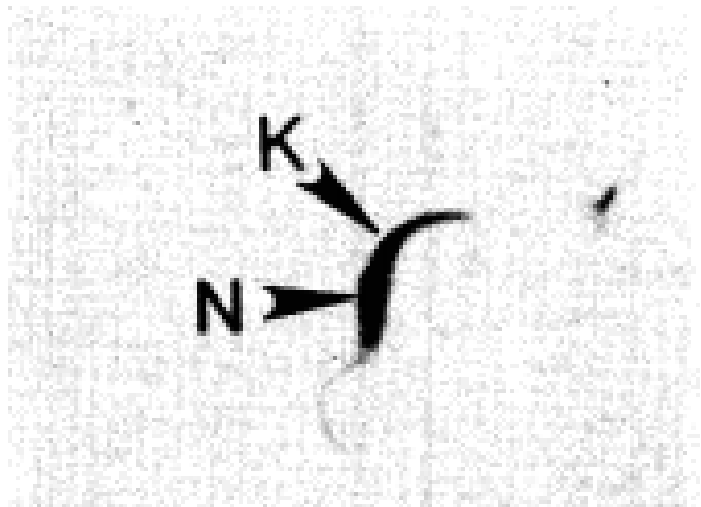


Figura 1 - *T. bennetti n. sp.*, estirpe KT-2, em esfregaço de cultura a 26 ° C; o cinetoplasto é posterior.

Fonte: Kirkpatrick *et al.* (1986).

2.4 O Parque Nacional de Itatiaia

2.4.1 Contextualização sobre o Parque Nacional de Itatiaia

O Parque Nacional de Itatiaia (PNI) foi o primeiro parque nacional do Brasil, criado em junho de 1937, por meio da criação da Estação Biológica do Itatiaia efetivada pelo Decreto nº 1.713, assinado pelo ex-presidente Getúlio Vargas com uma área original de 11.943 hectares. Em 1982, o Decreto nº 87.586 ampliou a área do Parque para aproximadamente 30.000 ha que é a sua extensão atual.

O PNI tem como objetivos básicos a preservação de ecossistemas naturais, em geral de grande beleza cênica, a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação e interpretação ambiental, de recreação em contato com a natureza e de turismo ecológico. Os incêndios florestais são os principais problemas do PNI, foco de grande preocupação, e principal tema de diversas decisões administrativas. Tais eventos são provenientes de ações antrópicas no interior e entorno do parque, e já causaram a eliminação de espécies de fauna e flora modificando os ecossistemas e sua biodiversidade (SOUSA *et al.*, 2015).

2.4.2 Localização e geografia do Parque Nacional de Itatiaia

Situa-se geograficamente entre os paralelos 22°16' e 22°28' latitude sul e os meridianos 44°34' e 44°42' de longitude oeste. Localizado no maciço do Itatiaia, na serra da Mantiqueira entre os municípios de Itatiaia e Resende, no Rio de Janeiro, e Itamonte e Bocaina, em Minas Gerais como apresentado na Figura 2. O relevo é um dos principais fatores determinantes do clima do PNI, pois compreende as superfícies mais elevadas da serra da Mantiqueira (IBDF, 1982)

O PNI é dividido em: parte baixa, parte alta e Visconde de Mauá. Esta delimitação é utilizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade no Plano de manejo do Parque Nacional de Itatiaia (Figura 3).

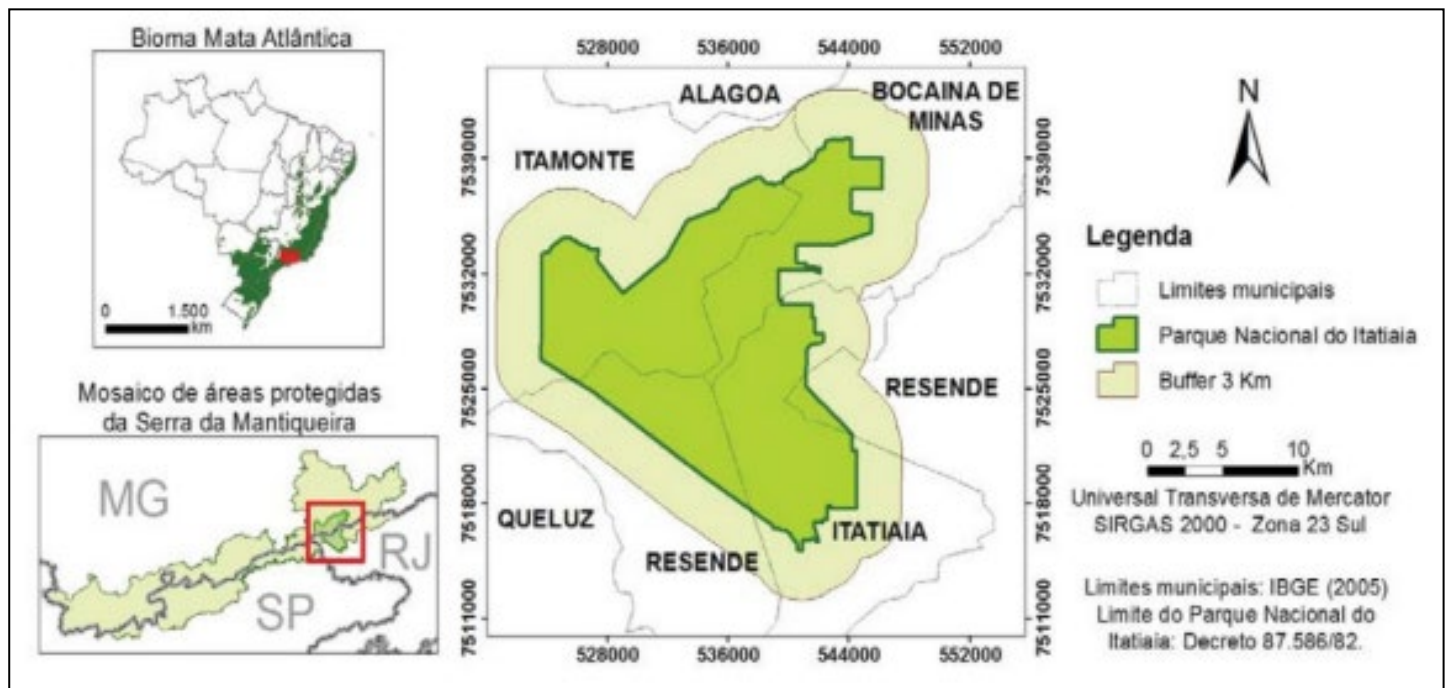


Figura 2 - Localização do Parque Nacional de Itatiaia.
Fonte: Adaptado de Tomzhinski (2012).

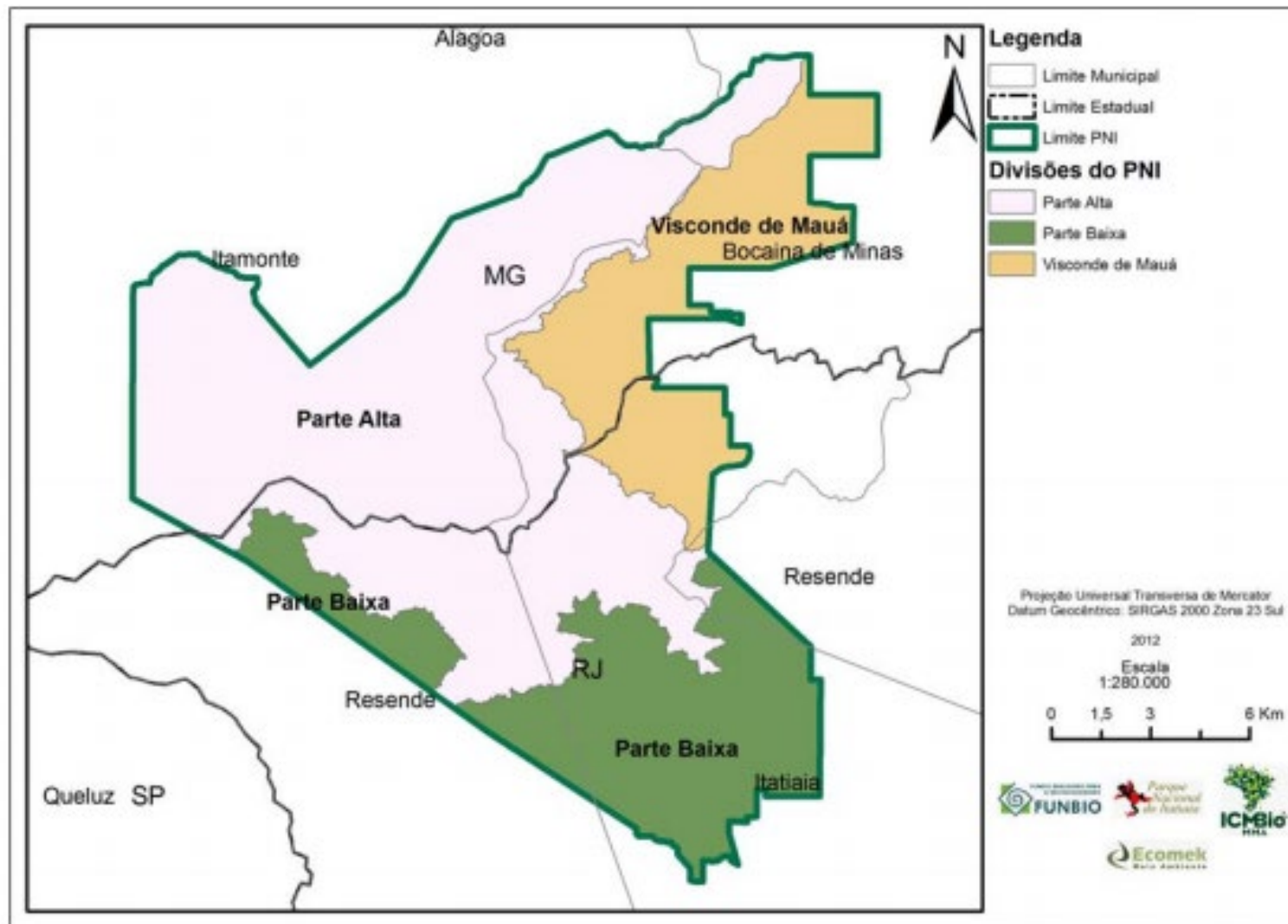


Figura 3 - Divisão ilustrativa da Parte Baixa e Parte Alta adotadas no diagnóstico da Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional de Itatiaia.
Fonte: ICMBio (2013).

2.4.3 O clima no Parque Nacional de Itatiaia

As condições climáticas, pelos padrões de Köppen-Geiger, são de dois tipos: Cwb (mesotérmico com verão brando e estação chuvosa no verão) nas partes elevadas da montanha, acima dos 1.600 m de altitude, e Cpb (mesotérmico com verão brando sem estação seca) nas partes baixas das encostas da montanha. No planalto, as séries históricas registram a temperatura média anual de 11,4° C, sendo janeiro o mês mais quente com 13,6° C; julho é o mês mais frio com 8,2° C. A máxima absoluta apurada foi de 21,4° C, em fevereiro, e a mínima foi de -15,4° C, em julho. As geadas intensas são comuns nos meses de inverno, verificando-se com frequência granizo e, raras vezes, breves nevascas (IBDF, 1982).

As chuvas registradas no PNI são intensas, principalmente no verão. A precipitação anual está em torno de 2.400 mm³, tendo janeiro a maior intensidade, com média de 27 dias e 388 mm³ de pluviosidade. A umidade máxima absoluta ocorre em dezembro, com 83%, e a mínima em junho, com 62%; a média é de 75,2%.

2.4.4 A vegetação do Parque Nacional de Itatiaia

Seguindo o sistema de classificação fitoecológico descrito por Veloso (1992), a vegetação do PNI se distribui em: Floresta Ombrófila Densa Montana, nas áreas em que a altitude varia de 650 a 1.500 m; Floresta Ombrófila Densa Alto Montana, acima de 1.500 m de altitude; Floresta Ombrófila Mista Montana em altitudes de cerca de 1.200 m com a presença de *Araucaria angustifolia* e Floresta Estacional Semidecidual Montana na vertente continental do parque, acima dos 500 m de altitude. Na parte mais acidentada e elevada do planalto, acima de 1.600 m de altitude, começam a surgir os Campos de Altitude (IBDF, 1982; IBAMA, 1994). A Floresta Ombrófila Alto Montana representa 50,17% do total de vegetação do PNI, com formação mais predominante, sua classe ocupa quase a metade de toda vegetação. Sua composição se espalha em toda área abrangida pelo parque.

2.4.5 A fauna de aves do Parque Nacional de Itatiaia

Com relação à fauna de aves, o Plano de Manejo do PNI (ICMBIO, 2013) registrou 319 espécies de aves. Contudo, tendo em vista que a metodologia dos planos de manejo busca amostragens rápidas, não contemplando em pouco tempo a riqueza total de espécies da unidade de conservação em questão, foram utilizados dados secundários para complementação do conhecimento obtido em campo, alcançando uma listagem de espécies mais próxima da realidade na região do Itatiaia que chegou a 384 espécies de aves, pertencentes a 21 Ordens em 56 Famílias dentre as Ordens mais representativas estão, Passeriformes (228 spp.), Apodiformes (29 spp.), Accipitriformes (19 spp.), Piciformes (16 spp.) e Psittaciformes (15 spp.). Famílias com maior número de representantes são, Tyrannidae (43 spp.), Thraupidae (30 spp.), Trochilidae (26 spp.), Thamnophilidae (22 spp.), Furnariidae e Accipitridae (19 spp. cada) (ICMbio, 2013). Há também uma lista atualizada de 336 espécies registradas disponível no portal de Enciclopédia das Aves do Brasil - WikiAves (www.wikiaves.com.br), contando com o depósito de 332 fotos e 223 registros de som (WikiAves, 2019). Dentre as aves com ocorrência para a região do Itatiaia, 60 espécies estão incluídas em alguma categoria de ameaçada de extinção, seja em nível mundial, nacional ou estadual (Quadro 1) (ICMbio, 2013).

Quadro 1 - Lista de espécies de aves com ocorrência na região do Parque Nacional do Itatiaia, incluídas em algum grau de ameaça de extinção. Os nomes científicos e comuns das espécies seguem o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO 2015). (Continua)

Nome do táxon	Nome popular	Global		Nacional	Estadual	
		1	2		RJ	MG
<i>Tinamus solitarius</i> (Vieillot, 1819)	Macuco	QA	QA	-	AM	CR
<i>Penelope obscura</i> Temminck, 1815	Jacuaçu	-	-	-	-	VU
<i>Aburria jacutinga</i> (Spix, 1825)	jacutinga	EN	EM	AM	AM	CR
<i>Odontophorus capueira</i> (Spix, 1825)	uru	-	-	-	-	VU
<i>Sarcoramphus papa</i> (Linnaeus, 1758)	urubu-rei	-	-	-	AM	-
<i>Urubitinga coronata</i> (Vieillot, 1817)	águia-cinzenta	EN	EM	AM	-	EN
<i>Pseudastur polionotus</i> (Kaup, 1847)	gavião-pombo-grande	QA	QA			EN
<i>Harpia harpyja</i> (Linnaeus, 1758)	gavião-real	QA	QA	-	AM	PEX
<i>Spizaetus melanoleucus</i> (Vieillot, 1816)	gavião-pato	-	-	-	AM	EN
<i>Claravis geoffroyi</i> (Temminck, 1811)	pararu-espelho	CR	CR	AM	AM	CR
<i>Primolius maracana</i> (Vieillot, 1816)	maracanã-verdadeira	QA	QA	-	-	-
<i>Aratinga auricapillus</i> (Kuhl, 1820)	jandaia-de-testa-vermelha	QA	QA	-	AM	-
<i>Touit melanonotus</i> (Wied, 1820)	apuim-de-costas-pretas	EN	EM	AM	AM	VU
<i>Pionopsitta pileata</i> (Scopoli, 1769)	cuiú-cuiú	-	-	-	-	EN
<i>Trichilaria malachitacea</i> (Spix, 1824)	sabiá-cica	QA	QA	-	AM	EN
<i>Strix hylophila</i> Temminck, 1825	coruja-listrada	QA	QA	-	-	-
<i>Hydropsalis forcipata</i> (Nitzsch, 1840)	bacurau-tesoura-gigante	-	-	-	-	VU
<i>Ramphodon naevius</i> (Dumont, 1818)	beija-flor-rajado	-	QA	-	-	-
<i>Pteroglossus bailloni</i> (Vieillot, 1819)	araçari-banana	QA	QA	-	-	VU
<i>Pteroglossus aracari</i> (Linnaeus, 1758)	araçari-de-bico-branco	-	-	-	AM	-
<i>Piculus aurulentus</i> (Temminck, 1821)	pica-pau-dourado	QA	QA	-	-	-
<i>Campephilus robustus</i> (Lichtenstein, 1818)	pica-pau-rei	-	-	-	-	EN
<i>Dysithamnus stictothorax</i> (Temminck, 1823)	choquinha-de-peito-pintado	QA	QA	-	-	-
<i>Biatas nigropectus</i> (Lafresnaye, 1850)	papo-branco	VU	-	AM	-	EN
<i>Drymophila genei</i> (Filippi, 1847)	choquinha-da-serra	QA	QA	-	-	VU

Legenda: Registro – Espécie registrada na região do Itatiaia por meio de dados bibliográficos.

Fonte: referência bibliográfica que caracteriza o grau de ameaçado de extinção: Global1 (IUCN, 2011); Global2 (BENCKE *et al.*, 2006); Nacional (MACHADO *et al.*, 2008); Estadual, Rio de Janeiro (ALVES *et al.*, 2000); e Minas Gérias (Machado *et al.*, 1998). Categoria de ameaça – Provavelmente extinto (PEX); Criticamente ameaçado (CR); Vulnerável (VU); Em perigo de extinção (EN); Quase ameaçado (QA). O símbolo [AM] indica que a espécie está ameaçada, mas não se refere qual categoria.

Quadro 2 – Continuação.

Nome do táxon	Nome popular	Global		Nacional	Estadual	
		1	2		RJ	MG
<i>Drymophila ochropyga</i> (Hellmayr, 1906)	choquinha-de-dorso-vermelho	QA	QA	-	-	-
<i>Grallaria varia</i> (Boddaert, 1783)	tovacuçu	-	-	-	-	VU
<i>Merulaxis ater</i> Lesson, 1830	entufado	QA	QA	-	-	-
<i>Eleoscytalopus indigoticus</i> (Wied, 1831)	macuquinho	QA	QA	-	-	-
<i>Anabacerthia amaurotis</i> (Temminck, 1823)	limpa-folha-miúdo	QA	QA	-	-	-
<i>Leptasthenura setaria</i> (Temminck, 1824)	garimpeiro	QA	QA	-	-	-
<i>Ilicura militaris</i> (Shaw & Nodder, 1809)	tangarazinho	-	EM	-	-	-
<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1723)	tangará	-	EM	-	-	-
<i>Onychorhynchus swainsoni</i> (Pelzeln, 1858)	maria-leque-do-sudeste	VU	VU	-	-	-
<i>Laniisoma elegans</i> (Thunberg, 1823)	chibante	-	QA	-	-	VU
<i>Iodopleura pipra</i> (Lesson, 1831)	anambezinho	QA	QA	-	-	-
<i>Lipaugus lanioides</i> (Lesson, 1844)	tropeiro-da-serra	QA	QA	-	AM	VU
<i>Tijuca atra</i> Ferrusac, 1829	saudade	QA	QA	-	-	-
<i>Carpornis cucullata</i> (Swainson, 1821)	corocoxó	QA	QA	-	-	VU
<i>Phibalura flavirostris</i> (Vieillot, 1816)	tesourinha-da-mata	QA	QA	-	-	VU
<i>Piprites pileata</i> (Temminck, 1822)	caneleirinho-de-chapéu-preto	VU	VU	AM	AM	VU
<i>Phylloscartes eximius</i> (Temminck, 1822)	barbudinho	QA	QA	-	-	-
<i>Phylloscartes difficilis</i> (Ihering & Ihering, 1907)	estalinho	QA	QA	-	-	-
<i>Rhynchocyclus olivaceus</i> (Temminck, 1820)	bico-chato-grande	-	-	-	AM	-

Legenda: Registro – Espécie registrada na região do Itatiaia por meio de dados bibliográficos.

Fonte: referência bibliográfica que caracteriza o grau de ameaçado de extinção: Global1 (IUCN, 2011); Global2 (BENCKE *et al.*, 2006); Nacional (MACHADO *et al.*, 2008); Estadual, Rio de Janeiro (ALVES *et al.*, 2000); e Minas Gérias (MACHADO *et al.*, 1998). Categoria de ameaça – Provavelmente extinto (PEx); Criticamente ameaçado (CR); Vulnerável (VU); Em perigo de extinção (EN); Quase ameaçado (QA). O símbolo [AM] indica que a espécie está ameaçada, mas não se refere qual categoria.

Quadro 3 – Continuação.

Nome do táxon	Nome popular	Global		Nacional	Estadual	
		1	2		RJ	MG
<i>Hemitriccus furcatus</i> (Lafresnaye, 1846)	papa-moscas-estrela	VU	VU	-	-	-
<i>Phyllomyias griseocapilla</i> Sclater, 1862	piolhinho-serrano	QA	QA	-	-	-
<i>Polystictus superciliaris</i> (Wied, 1831) papa-	moscas-de-costas cinzentas	-	QA	-	-	-
<i>Contopus cooperi</i> (Nuttall, 1831)	piui-boreal	QA	QA	-	-	-
<i>Orchesticus abeillei</i> (Lesson, 1839)	sanhaçu-pardo	QA	QA	-	-	-
<i>Tangara cyanoptera</i> (Vieillot, 1817)	sanhaçu-de-encontro-azul	QA	QA	-	-	-
<i>Dacnis nigripes</i> Pelzeln, 1856	saí-de-pernas-pretas	QA	QA	-	-	-
<i>Chlorophanes spiza</i> (Linnaeus, 1758)	saí-verde	-	-	-	AM	-
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	canário-da-terra-verdadeiro	-	-	-	-	VU
<i>Sporophila frontalis</i> (Verreaux, 1869)	pioxó	VU	VU	AM	AM	EN
<i>Sporophila falcirostris</i> (Temminck, 1820)	cigarra-verdadeira	VU	VU	AM	AM	EN
<i>Sporophila angolensis</i> (Linnaeus, 1766) curió	curió	-	-	-	AM	EN
<i>Cyanoloxia moesta</i> (Hartlaub, 1853)	negrinho-do-mato	QA	QA	-	AM	VU
<i>Cyanoloxia brissonii</i> (Lichtenstein, 1823)	azulão	-		-	AM	-

Legenda: Registro – Espécie registrada na região do Itatiaia por meio de dados bibliográficos.

Fonte: referência bibliográfica que caracteriza o grau de ameaçado de extinção: Global1 (IUCN, 2011); Global2 (BENCKE et al, 2006); Nacional (Machado et al, 2008); Estadual, Rio de Janeiro (Alves et al, 2000); e Minas Geras (Machado et al, 1998). Categoria de ameaça – Provavelmente extinto (PEX); Criticamente ameaçado (CR); Vulnerável (VU); Em perigo de extinção (EN); Quase ameaçado (QA). O símbolo [AM] indica que a espécies está ameaçada, mas não se refere qual categoria.

2.5 Zona da Mata Mineira

2.5.1 Contextualização sobre a Zona da Mata Mineira

A referida mesorregião recebeu esse nome em referência à fisionomia de sua vegetação natural, Mata Atlântica, que a distinguia das regiões adjacentes. No cenário histórico e socioeconômico do Estado de Minas Gerais, a Zona da Mata é uma região que exerceu função de destaque, foi berço da extração do ouro no século XVIII e que, com o declínio do ciclo do ouro, especializou-se ao longo do século XIX na agricultura e na pecuária (CARRARA, 1999).

A Zona da Mata, polarizada pelo município de Juiz de Fora, tem localização privilegiada no Estado de Minas Gerais e no Brasil, apresenta infraestrutura relativamente em boas condições, que favorece acesso aos mercados. A região, cortada por importantes rodovias federais e estaduais, encontra-se próxima a importantes metrópoles como Belo Horizonte, Rio de Janeiro e São Paulo (FJP, 1995).

2.5.2 Localização e geografia da Zona da Mata Mineira

Localiza-se a sudeste do Estado e é dividida em 7 microrregiões: Manhuaçu e Ponte Nova em sua porção setentrional; Muriaé, Ubá e Viçosa e na região central; e Juiz de Fora e Cataguases ao sul, constituída por 142 municípios. A mesorregião Zona da Mata abrange uma área de 35.726 km², cerca de 6% do Estado de Minas Gerais (IBGE, 1990)

A região se encontra inserida em duas importantes bacias hidrográficas: Rio Paraíba do Sul e o Rio Doce. A primeira localiza-se à leste e ao sul, formada pelos rios Murié, Paraíba do Sul, Paraibuna, Pomba e Rio Preto. A segunda compreende uma maior área, ao norte da região, formada pelos rios Gualaxo do Sul e do Norte, Carmo, Casca, Manhuaçu, Matipó e Piranga.

As altitudes da região variam de 2.889 metros no Pico da Bandeira em Alto Caparaó na região nordeste na divisa de MG-ES, até altitudes que giram em torno de 100 metros nos vales do rio Pomba. O relevo é de ondulado a forte ondulado nas partes mais baixas, em altitudes que variam entre 300 e 500 metros. Próximo a região de Ervália, as altitudes que variam de 800 a 900 metros apresentam um relevo fortemente ondulado e montanhoso. Altitudes superiores a 1.500 metros são encontradas ao norte com o destaque para o Maciço do Caparaó (CARNEIRO; FONTES, 2005).

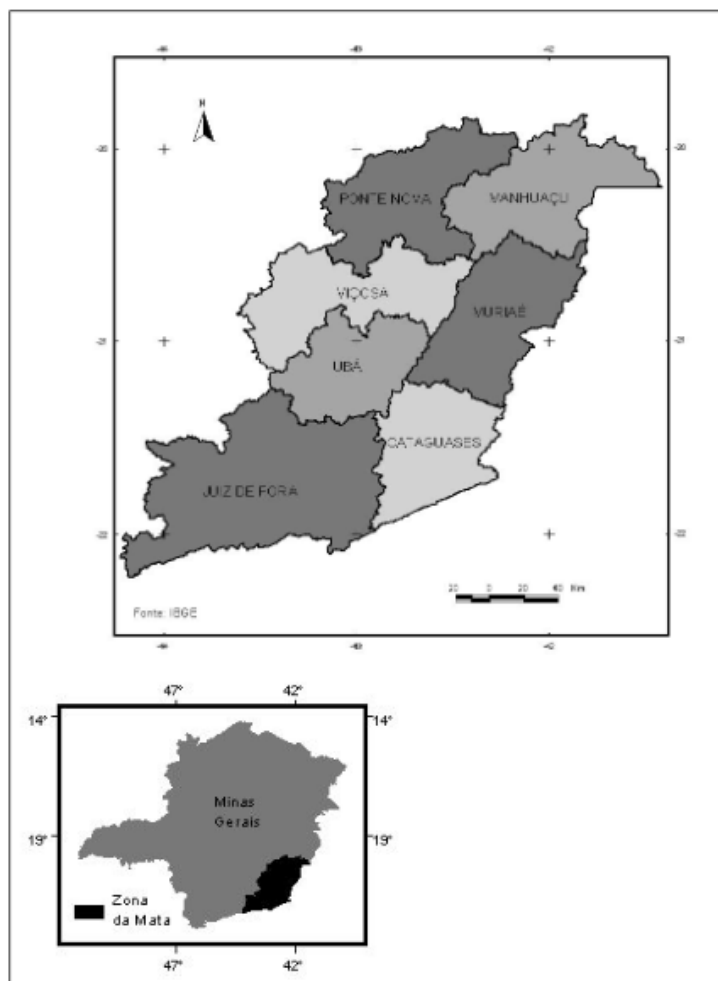


Figura 4 - Mapa de localização da Zona da Mata em relação às mesorregiões e às microrregiões do Estado de Minas Gerais.

Fonte: (CARNEIRO; FONTES, 2005).

2.5.3 O clima na Zona da Mata Mineira

De acordo com o IBGE (2002), o clima da região é bastante variado, recebendo forte influência da variação altimétrica. O clima pode ser Quente (Semiúmido com 4 a 5 meses secos, com média acima de 18°C durante todo ano), Subquente (Semiúmido com 4 a 5 meses secos e Úmidos com 1 a 3 meses secos e pelo menos 1 mês com temperatura média entre 15 e 18°C) e Mesotérmico brando (clima Úmido de 1 a 3 meses secos e Semiúmido de 4 a 5 meses secos, com temperaturas médias entre 10 a 15°C).

2.5.3 A vegetação da Zona da Mata Mineira

A vegetação predominante caracteriza-se por Floresta Estacional Semidecidual, ocorrendo em 17,73 % da área, na forma de fragmentos, distribuídos de modo mais homogêneos (RADAMBRASIL, 1983) A concentração desta se dá nos municípios de Caparaó, Alto Caparaó, Espera Feliz e Manhuaçu. A conservação de remanescente destas espécies ocorre em função de fatores físicos como o relevo e altitudes mais elevadas que dificultaram a sua remoção para uso da madeira e ou mudança do uso das terras. Segundo Veloso e Góes-Filho (1982), esse conceito ecológico da Região de Floresta Estacional remete ao clima de duas estações, uma chuvosa e outra seca. O conjunto arbóreo dominante possui uma adaptação fisiológica à deficiência hídrica ou temperaturas baixas durante longo período.

A Floresta ombrófila ocorre em 1,25 % da área, concentrando-se no Sudoeste da região, especificamente nos seguintes municípios: Rio Preto, Santa Rita do Jacutinga, Santa Bárbara do Monte Verde, Olaria e Lima Duarte. Os Campos Rupestres aparecem associados às áreas de altitudes mais elevadas e com maior umidade, como observado por Valverde (1958), em sua excursão ao maciço do Caparaó e em trabalhos realizados nos Parque Estadual da Serra do Brigadeiro e Parque Estadual do Ibitipoca, por Schaefer *et al.* (2006). Essas fisionomias têm ocorrência restrita, somando 0,13 % de abrangência.

A ação antrópica substituiu quase toda vegetação original da região por vegetação secundária, pastagens e agricultura. Em algumas poucas áreas, ainda são encontrados remanescentes, protegidos por lei, da vegetação original, como é o caso da Serra do Caparaó. Trata-se do Refúgio Ecológico, que apresenta número de agrupamento remanescente da Floresta Montana considerável.

2.5.4 A fauna de aves da Zona da Mata Mineira

As referências indicam que Hermann Burmeister foi o primeiro a pesquisar aves na região da Zona da Mata Mineira entre Juíz de Fora e Viçosa, em abril de 1852 (PINTO, 1952). José Pinto da Fonseca e João Moojen de Oliveira foram os que mais investigaram e documentaram a avifauna da região até meados do século XX, sendo deles a maior parte dos exemplares taxidermizados que documentam a rica avifauna da Zona da Mata até aquela época (PINTO, 1945, 1952; RIBON *et al.*, 2003).

Merece destaque o trabalho de Erickson e Mumford (1976), nas décadas de 1950 e 1960 que permite a verificação das informações publicadas, uma vez que o registro de várias espécies foi embasado em coletas. Surgiram algumas listagens de espécies nas décadas de 1980 e 1990 (MONTEIRO *et al.*, 1983; MONTEIRO; MATTOS, 1984; BORGES; RAPÔSO-FILHO, 1989; SIMON *et al.*, 1999), descrições sobre biologia básica de algumas aves, sobretudo de nidificação (SIMON; PACHECO, 1996) e algumas análises mais detalhadas sobre distribuição de aves em fragmentos florestais remanescentes (RIBON, 1998; MALDONADO-COELHO, 2000).

A avifauna da Zona da Mata mineira apresenta-se como uma mistura de espécies florestais que resistiram ao desmatamento da região ao longo dos últimos dois séculos e de espécies originalmente do cerrado e áreas de borda de floresta (RIBON *et al.*, 2004). Muitas espécies de aves florestais estão hoje confinadas aos parques estaduais do Ibitipoca, do Itacolomi e da Serra do Brigadeiro (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 1998; RIBON *et al.*, 2003). Estas unidades de conservação correspondem aos maiores blocos de vegetação nativa contínua que ainda existem na Zona da Mata. A paisagem dominante é, no entanto, um mosaico de fragmentos florestais de vários tamanhos e estados de conservação, em meio a uma matriz heterogênea de pastagens e culturas. Dependendo da localidade, encontra-se entre 2 e 33% de vegetação nativa (FONSECA, 1985; RIBON, 1998; PEREIRA, 1999).

Com todos os registros anteriores e atuais, é sabido que no Estado de Minas Gerais ocorrem cerca de 764 espécies de aves, sendo 121 ameaçadas e 70 deficientes em dados (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2007). Para a região de Rio Novo e Goianá, Ribon *et al.*, (2004) registraram 185 espécies aves a incluindo aquelas identificadas nos municípios limítrofes de Coronel Pacheco e Juiz de Fora. Considerando apenas as espécies de Rio Novo e Goianá, tem-se um total de 172 espécies. Na Reserva Biológica Municipal Poço D'Anta (ReBioPD), uma floresta estacional semidecidual urbana com 277 hectares, criada pelo decreto municipal no 2794/82 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, 2008), Manhães e Loures-Ribeiro (2011) registraram 156 espécies distribuídas em 38 famílias e 17 ordens. Os Passeriformes foram a Ordem dominante, representando 52,6% das famílias (n = 20) e 65,0% das espécies (n = 102). As famílias mais representativas foram Tyrannidae, com 28 espécies (17,9% do total), Thraupidae, com 14 (9,0%), Picidae e Thamnophilidae, com 8 espécies cada (5,1%). *Sporophila frontalis* e *Sporophila falcirostris* (Emberizidae) foram as únicas espécies incluídas na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MACHADO *et al.*, 2008) e são consideradas pela A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2016) também como vulneráveis. Contudo, torna-se importante destacar que, *Primolius maracana* (Psittacidae), *Dysithamnus stictothorax*, *Drymophila ochropyga* (Thamnophilidae), e *Cyanoloxia moesta* (Cardinalidae) constam na lista da IUCN na categoria Quase Ameaçada.

No Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Barbosa *et al.* (2019) registraram 160 espécies, distribuídas em 47 famílias de 20 ordens. Passeriformes foi a ordem mais expressiva com 23 famílias registradas, representando 57,5% (n = 92) do total de espécies encontradas. A família Tyrannidae foi a mais numerosa, com 26 espécies, seguida por Thraupidae com 18 espécies. Foi registrada a presença de *Primolius maracanã*, assim como sete espécies foram identificadas pela primeira vez no município de Juiz de Fora: *Cairina moschata*, *Molothrus oryzivorus*, *Nomonyx dominic*, *Porphyrio martinicus*, *Pteroglossus aracari*, *Pteroglossus bailloni*, *Tachybaptus dominicus*. Esse número total de espécies ficou bem próximo ao encontrado por Manhães e Loures-Ribeiro (2011), somando-se aos esforços de Ribon *et al.* (2003, 2004), Manhães e Loures-Ribeiro (2005) e Pacheco *et al.* (2008). Tal levantamento contribuiu com a documentação da avifauna regional e para o registro de novas espécies no município.

Barbosa *et al.* (2019) ressalta que a riqueza de espécies deste levantamento encontrada no Jardim Botânico representou cerca de 17.5% da riqueza do domínio Floresta Atlântica, 20% da do estado de Minas Gerais e cerca de 8.5% da riqueza total do Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de sangue de 188 espécimes de passeriformes para pesquisa molecular e parasitológica de *Trypanosoma* spp., sendo as aves encontradas em 5 pontos de coleta no Parque Nacional de Itatiaia e em quatro pontos de coleta na zona da Mata Mineira. As capturas de aves no Parque Nacional de Itatiaia ocorreram ao longo dos sete primeiros meses consecutivos (junho a dezembro de 2017) e, posteriormente, durante o mês de março de 2018 foram realizadas 8 campanhas mensais com duração média de 3 dias consecutivos cada. Na Zona da Mata Mineira, as capturas ocorreram entre março de 2013 e dezembro de 2015, durante cinco dias consecutivos, uma vez a cada mês.

3.1 Áreas de estudo

3.1.1 Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG)

As coletas foram realizadas em áreas com diferentes gradientes altitudinais, locais abertos em meio à floresta ombrófila densa presente no Parque Nacional de Itatiaia para facilitar a abertura das redes de neblinas ou “mist nets” (Descrição no Quadro 2.) Foram enumeradas três áreas;

Área 1: denominada Baixo Itatiaia com 1.100 metros de altitude até a entrada do parque, que fica na base da montanha e perto da cidade de Itatiaia. Pontos 1a e 1b, áreas onde estão situadas as casas de pesquisas, a sede dos brigadistas e o lago azul com pontos de coleta próximos aos 800m de altitude.

Área 2: Médio Itatiaia, região de 1.100 a 1.800 metros de altitude, 2a é área de acesso pela sede do PNI em direção a cachoeira véu da noiva, trilha Ruy Braga a aproximadamente 1.200m. 2b vertente do PNI com acesso por Maromba-RJ, rio acima, pós cachoeira do escorrega em aproximadamente 1.400m.

Área 3: Alto Itatiaia, com acesso pela garganta do registro (divisa dos estados do RJ e MG), quando as capturas ocorreram próximas a casa de pedra em aproximadamente 2.200 metros acima do nível do mar (Quadro 2).

3.1.1.2 Geoprocessamento das áreas do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG)

Nas áreas escolhidas para captura das aves, foram utilizadas análises espaciais provenientes de sensoriamento remoto. A partir dos dados de georreferenciamento, tornou-se possível analisar e criar mapa temático com apoio do software ArcGIS®.

Esses locais mapeados foram divididos em sítios amostrais e georreferenciados *in loco* com auxílio de GPS da marca Garmin® modelo Etrex 30. Foram registrados inicialmente com o sistema de coordenadas Latitude/Longitude, composto por leitura de medianos e paralelos, para facilitar as análises de processamento junto ao programa de software Google Earth®. Posteriormente, para intensificar a precisão do estudo na elaboração dos modelos de mapas temáticos utilizou-se o sistema Universal Transverso Mercator (UTM), que projeta as coordenadas geográficas em um cilindro transversal à Polar Primária. O sistema escolhido foi o WGS 84 (World Geodetic System) cujo Datum é o geocentro, o mesmo utilizado na elaboração dos mapas do IBGE com o Sistema de Referência Geocêntrico da América do Sul (SIRGAS) implementado partir de 2005 (Figura 5).

Quadro 4 - Descrições dos pontos de captura das aves silvestres dentro do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG).

Áreas de amostragens	Gradiente atitudinal (metros)	Localização e coordenadas de captura.	Referência das áreas.	Descrição dos pontos amostrais.
PNI 1a	800	Sede do PNI -22° 26' 58.1" -44° 36' 55.9" -22° 22' 11.2" -44° 36' 39.2"	Próximo ao lago azul, próximo as casas de pesquisas.	Floresta Ombrófila Densa com poucas construções ao redor e reduzida área de Antropização.
PNI 1b	800	-22° 27' 06.4" -44° 36' 42.5" -22° 27' 07.1" -44° 37' 12.4" -22° 27' 01.8" -44° 36' 56.1" -22° 27' 20.9" -44° 36' 28.1"	Próximo a sede dos brigadistas respectivamente.	Floresta Ombrófila Densa com poucas construções.
PNI 2 (2a)	1.200	Sede PNI -22° 26' 17.00" -44° 37' 33.00"	Próximo a cachoeira Véu da Noiva na direção da travessia Ruy Braga.	Floresta Ombrófila densa com área consideravelmente preservada, caminho de difícil acesso para veículos. Área fechada para visitação pública, somente pesquisa.
PNI 2 (2b)	1.350	Vertente Maromba-RJ -22° 20' 19.07" -44° 36' 51.55"	Vertente Maromba, pós cachoeira do Escorrega, 3,5 km acima.	Floresta Ombrófila Densa, entretanto, área em recuperação, com intensa antropização. Área fechada para visitação pública, somente pesquisa.
PNI 3	2.200	Planalto do PNI -22° 22' 8.36" -44° 44' 39.27"	Próximo à casa de pedra.	Área com Floresta Ombrófila Densa, ao redor da casa de pedra áreas de capoeiras e matas ciliares, entretanto predominante a floresta nativa.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

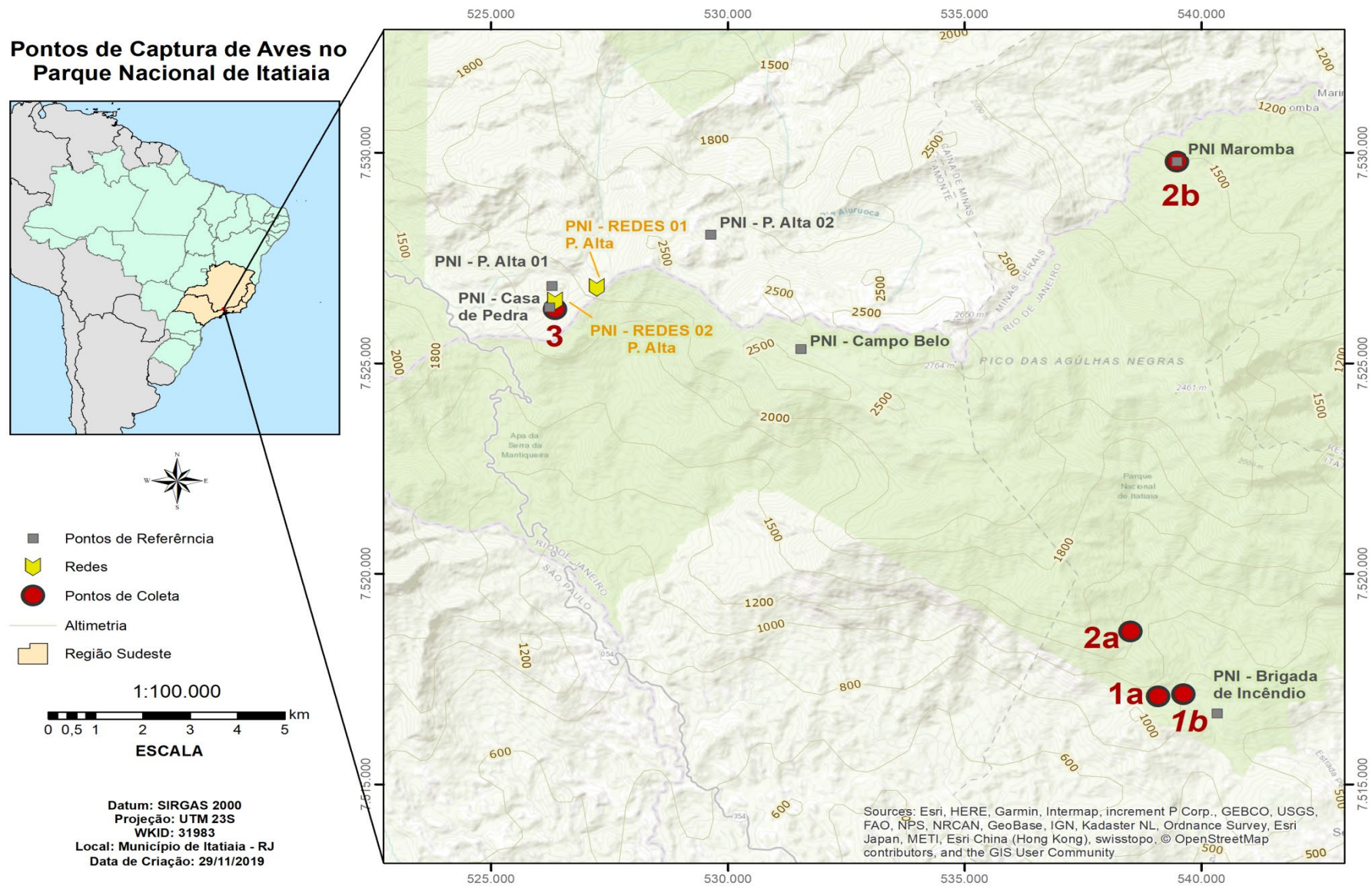


Figura 5 - Mapa temático com os pontos de captura de aves silvestres e coleta de sangue no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG). Área 1, baixo Itatiaia, com pontos amostrais; PNI 1a e PNI 1b (800m altitude), Área 2 com pontos amostrais; PNI 2a e PNI 2b (1.200 a 1.400m altitude), Área 3, alto Itatiaia, com ponto amostral; PNI 3 (2.200m de altitude).

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

3.1.2 Zona da Mata Mineira

A coleta das aves ocorreu em quatro diferentes locais na região da Zona da Mata mineira, Minas Gerais, Brasil. Situada no sudeste do estado de Minas Gerais, área pertencente ao bioma Mata Atlântica, os locais de amostragem encontram-se em diferentes estágios de sucessão ecológica. Enquanto o Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF), é uma área de floresta regenerada com áreas abertas de aproximadamente 845.000m², os demais locais são áreas com pequenas manchas florestais esparsas circundadas de pastagens (Quadro 3).

O Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora é parte de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Montana (VELOSO *et al.*, 1991) localizado no perímetro urbano de Juiz de Fora, sudeste do estado de Minas Gerais inserida no complexo da Mata do Krambeck de 374,1 ha. O complexo é constituído pela Área de Proteção Ambiental “Mata do Krambeck”, pelas fazendas Retiro Novo, Retiro Velho e o atual Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.1.1.2 Geoprocessamento das áreas na Zona da Mata Mineira

Nas áreas escolhidas para captura das aves, foram utilizadas análises espaciais provenientes de sensoriamento remoto. A partir dos dados de georreferenciamento, tornou-se possível analisar e gerar um mapa por satélite do programa Google Earth Pro® 2020. Esses locais mapeados foram divididos em sítios amostrais e georreferenciados *in loco* com auxílio de GPS da marca Garmin® modelo Etrex 30. Foram registrados com o sistema de coordenadas Latitude/Longitude (Figura 6).



Quadro 5 - Localização geográfica, informações ambientais dos locais amostrados na Zona da Mata de Minas Gerais e quantidade de aves coletadas em cada local.

Local	Localização geográfica	Altitude (m)
Juiz de Fora, MG		
Jardim Botânico UFJF	-21° 43' 50.0" -43° 22' 15.4"	724
Sítio Vista Alegre, Caeté	-21° 48' 23.0" -43° 15' 45.7"	494
Chácara, MG		
Sítio Paraíso da Barra	-21° 40' 18.2" -43° 13' 14.2"	799
Sta. Bárbara do Monte Verde, MG		
Fazenda Volta Grande	-21° 58' 50.8" -43° 41' 44.4"	821

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Pontos de Captura de Aves na Zona da Mata Mineira



-  Pontos de Coleta
-  Região Sudeste

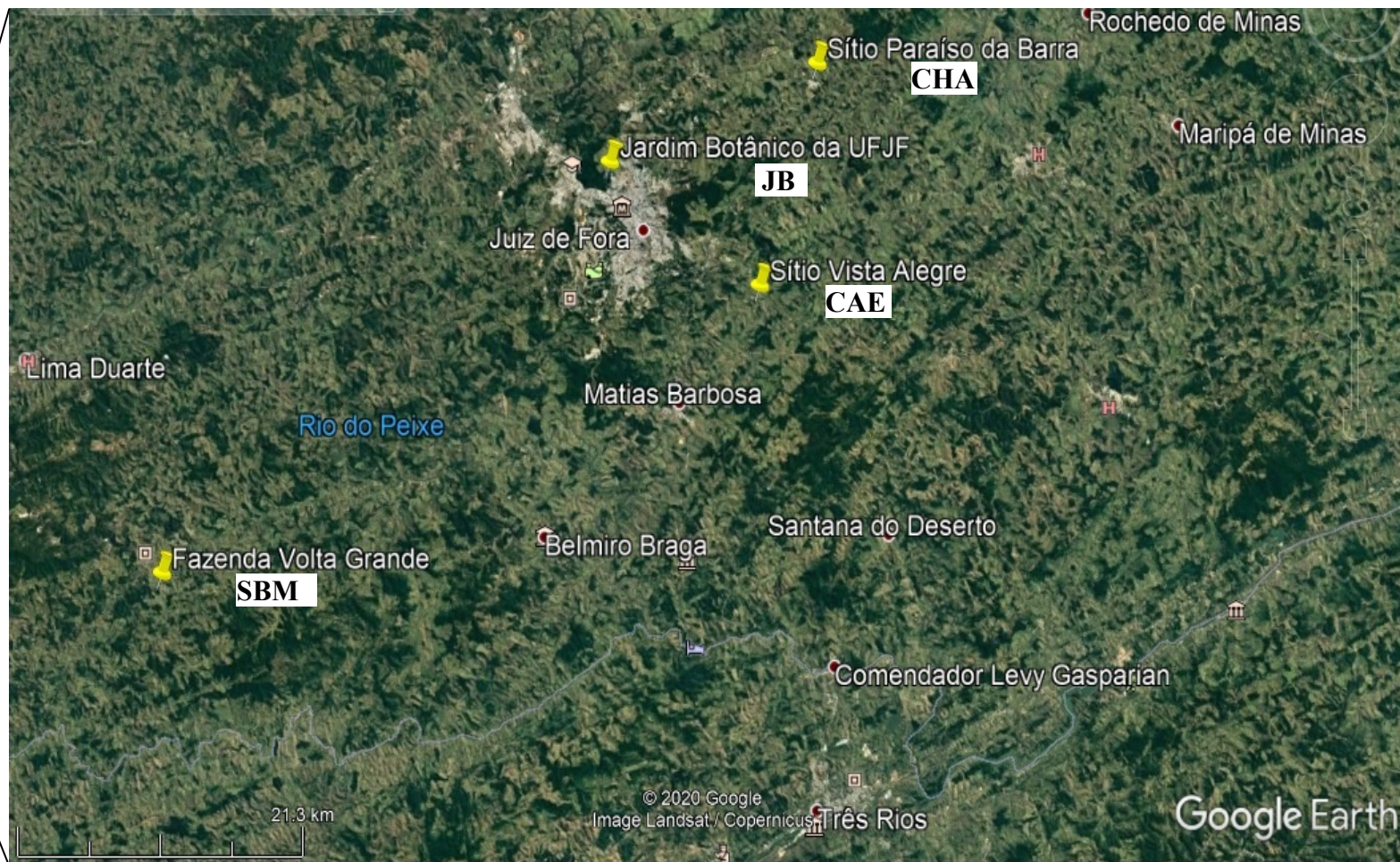


Figura 6 - Mapa de satélite com os pontos de captura de aves silvestres e coleta de sangue em áreas da Zona da Mata Mineira. Ponto JB (Jardim Botânico da UFJF), Ponto CAE (Sítio Vista Alegre), Ponto CHA (Sítio Paraíso da Barra) Ponto SBMV (Fazenda Volta Grande).

Fonte: Google Earth (2020).



Figura 7- Localização do Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, em destaque de amarelo a localização do lago artificial.

Fonte: Google Earth (2020).

3.2 Captura e coleta de sangue

Para a captura de aves no Parque Nacional de Itatiaia, foram usadas 10 redes ornitológicas de nylon modelo Ecotone Mist Net 716/12 (12 x 2,5m, malha de 16 mm) da marca fabricante Polonesa Ecotone® expostas durante seis horas a partir do amanhecer no sub-bosque florestal. As redes foram dispostas entre 10 e 20 cm do solo, com o suporte de hastes de alumínio em altura total de três metros, divididas em dois transectos lineares. Estas redes eram revisadas a cada 15 minutos para a retirada das aves capturadas.

Na Zona da Mata Mineira, as capturas foram realizadas por meio de redes de neblina (12 metros de comprimento por 3 metros de altura com 36 milímetros de malha), dispostas em conjuntos lineares de cinco redes totalizando um transecto de 60 metros. As coletas ocorreram durante cinco dias consecutivos, uma vez a cada mês, sendo estendidas desde antes do nascer do sol até aproximadamente a metade do dia, com as redes sendo verificadas a cada 15 minutos.

Para medição do esforço amostral preconizado tanto no Parque Nacional do Itatiaia quanto nas áreas de captura da Zona da Mata Mineira, seguiu-se o recomendado por Rodrigues (2002) e a padronização do esforço amostral de rede foi adaptado de Straube e Bianconi (2002).

O método de contenção para as aves, principalmente as de pequeno porte (na maioria das vezes passeriformes), foi realizado com cautela devido à saúde do animal. Como as aves não possuem respiração diafragmática, estas dependem da expansão do tórax para tal atividade e, portanto, os cuidados para a contenção estão diretamente relacionados a esse aspecto de sua biologia. A contenção de aves de pequeno porte consiste em segurá-las com o dorso virado para a palma da mão, com o pescoço da ave entre os dedos indicador e médio, cuidando sempre para não ocorrer estrangulamento, e os dedos polegar e anular sobre o corpo da ave ou segurando o tarso (MATTER, 2010). O uso de sacos de pano foi necessário para a manutenção temporária e um curto transporte das redes de neblina até a mesa de manejo e de materiais e equipamentos de realização das amostras.

A identificação de todas as aves capturadas foi efetivada por meio dos guias específicos de campo de Narosky e Yzurieta (1993), pranchas de Ridgely *et al.* (2009) e Sigrist (2009; 2014). As aves foram fotografadas para confirmação da identificação. Nas capturas da Zona da Mata Mineira, todas as aves foram, pesadas, medidas e marcadas com anilhas metálicas fornecidas pelo Centro de Pesquisas para Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE /IBAMA). Já no Parque Nacional de Itatiaia, não ocorreram tais marcações, pesagens e medições.

A coleta de sangue das aves ocorreu após assepsia do local com algodão embebido em álcool 70° GL, posteriormente sendo feito o extravasamento do sangue da veia tíbio-tarsal ou braquial (aproximadamente 60µl) utilizando agulhas descartáveis (13 x 4,5 milímetros), respeitando o limite de 1% do peso vivo das aves, segundo recomendado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Amostras de sangue foram utilizadas imediatamente a preparação de esfregaços em lâminas de vidro para a análise em microscópio, assim como o recolhimento de sangue em microtubos para análises moleculares, sendo este armazenado a seguir em local refrigerado (Figura 8).

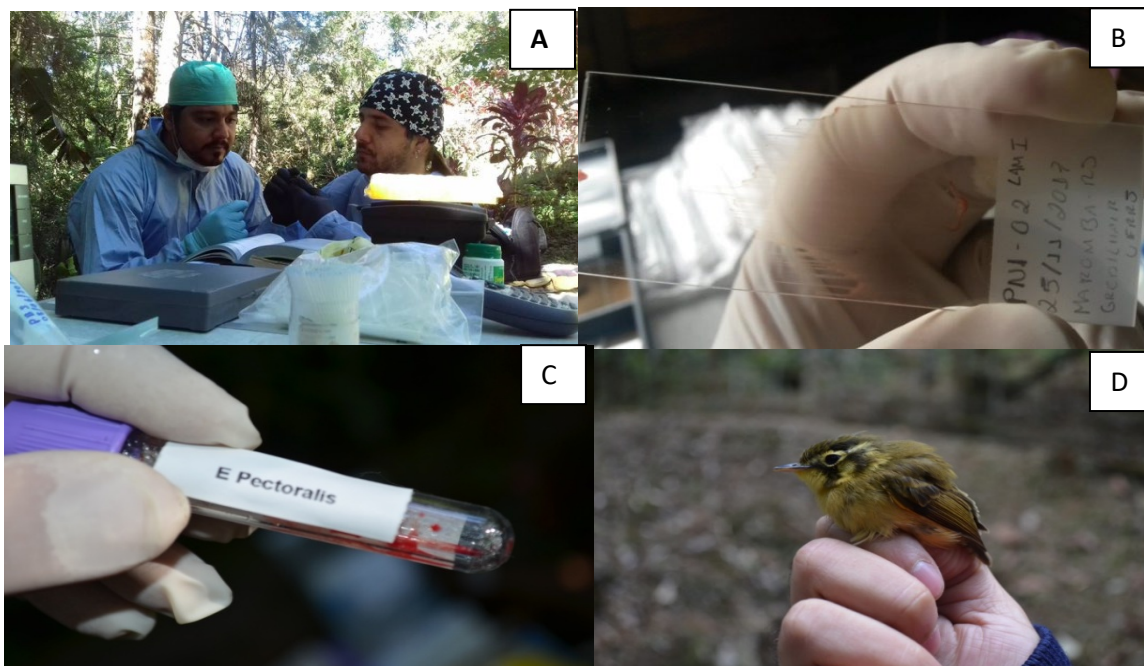


Figura 8 - A) Registro e avaliação no preparo da retirada de sangue B) Esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro C) Recolhimento de sangue em tubos de hemograma para análises moleculares D) Após os procedimentos de coleta o animal é solto novamente à natureza.

Fonte: Arquivo pessoal (2020).

3.3 Armazenamento e transporte das amostras biológicas

As amostras biológicas pertencentes às capturas ocorridas no Parque Nacional de Itatiaia foram devidamente identificadas com um número contido na ficha de identificação da ave, acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e a cada dia finalizado a campo eram temporariamente colocados em freezer a -20°C , utilizados com fins de pesquisa científica dentro do Parque, e as lâminas fixadas por três minutos em metanol colocadas em caixas próprias de transporte, sendo todo o material biológico posteriormente transportado para o Laboratório de Sanidade Avícola do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As amostras biológicas pertencentes às capturas ocorridas na Zona da Mata Mineira foram levadas ao Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal (PPGBA), na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde foi realizada a fixação dos esfregaços em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos.

Os esfregaços sanguíneos obtidos das aves do Parque Nacional de Itatiaia e da Zona da Mata Mineira foram corados em Giemsa (Eosina Azul de Metileno) na diluição de 1:9, durante aproximadamente 40 minutos e os microtubos contendo amostras de sangue foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.4 Análises microscópicas

Os esfregaços obtidos de ambas as áreas de captura foram examinados em sua totalidade sob objetiva de imersão, em microscópio fotônico Olympus BX-51, em aumento de 600. Para as análises morfológicas dos parasitos, foram capturadas imagens dos esfregaços usando uma câmera (Olympus Evolt E-330). Os caracteres foram tomados conforme descrito em Valkiunas, 2011 utilizando o software ImageProPlus 6.0.

3.5 Extração do DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de $20\mu\text{L}$ de cada amostra sanguínea de aves, usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído em $100\mu\text{L}$ da solução de reidratação que acompanha o kit, sendo acondicionada em microtubos de $0,6\text{mL}$ em três alíquotas e mantida a -20°C . Posteriormente, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000). As concentrações das amostras de DNA variaram e foram padronizadas em 20 ng / ul nas alíquotas. O DNA total foi armazenado em microtubos de $1,5\text{ ml}$ a -80°C até a análise molecular.

Tanto a extração de DNA, quanto o preparo das reações e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados, evitando a ocorrência de contaminação. Além disso, ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo.

3.6 Reação em Cadeia da Polímeras e Convencional

As amostras de DNA de sangue dessas aves silvestres foram submetidas à amplificação do fragmento 18S do DNA ribossomal de *Trypanosoma* spp. por PCR convencional com o objetivo de realizar uma triagem das amostras. As reações com alvo no 18S rDNA foram realizadas utilizando os iniciadores 18STnF2 (5'-CAA CGA TGA CAC

CCA TGA ATT GGG GA -3') e o iniciador reverso 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATAT TGCATATAC3'), que amplificam aproximadamente 780 pb a 800 pb (GEYSEN *et al.*, 2003). O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 13,5 µL de água ultrapura, 1X de tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,8 mM de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 94 ° C por 4 min seguido por 40 ciclos de 94 ° C por 1 min, 58 ° por 1 min 30 s e 72 ° C por 2 min, e extensão final a 72 ° C por 4 min.

Trypanosoma vivax foi utilizado como controle positivo. O DNA de *T. vivax* foi obtido de bovinos com alta carga parasitária em esfregaços de sangue e confirmado por sequenciamento de DNA. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo de amplificação.

3.6.1 Clonagem e Sequenciamento dos Produtos da PCR

Três reações de PCR independentes foram realizadas para cada amostra positiva com *Trypanosoma* sp. As reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Platinum SuperFi II DNA Polymerase–High-Fidelity, seguindo as condições de amplificação e termociclagem descritas no item 3.8. Os amplicons resultantes foram submetidos ao processo de purificação com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos produtos purificados pode ser estimada em gel de agarose a 2%, sendo que um volume de 5µL dos produtos purificados foi homogeneizado em 1,5µL de tampão de amostra. Como escala de massa molecular foi utilizado 4 µL de Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen®). A clonagem foi realizada em vetor pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial de cinco clones positivos de cada reação de PCR foi isolado pelo kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Invitrogen, Carlsband, CA, USA.) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR clonados foram sequenciados com os primers 18STnF2 e 18STnR3. O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (ABI 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA) no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP).

3.6.2 Análise do Sequenciamento

As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências previamente publicadas em banco de dados Genbank (ANEXO E). O alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW implementado no Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 7.0), Kumar *et al.* (2016).

3.6.3 Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando um conjunto de dados contendo sete sequências do gene 18s de trypanosomas obtidas no trabalho proposto e um conjunto de sequências do Genbank, utilizando as mesmas linhagens que Pornpanon (2019). Como grupo externo, foram escolhidas sequências de trypanosomas de anuros (*T. mega* e *T. rotatorium*) obtidas por meio do banco de dados Genbank. As sequências foram alinhadas no software MAFFT (KATOHI *et al.*, 2017) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas com o Gblocks (TALAVERA; CASTRESANA, 2007), obteve-se uma matriz com 2335 pb. A inferência da filogenia de *Trypanosoma* foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança (ML)

implementada no programa RaxML (STAMATAKIS, 2014), utilizando o modelo GTR + GAMMA (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição no JmodelTest implementado no MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016). Os valores-suporte dos cladogramas foram avaliados com o critério de autoconvergência de bootstrap do RaxML (STAMATAKIS, 2014) com 500 pseudoreplicatas.

3.7 Autorizações de pesquisa

As autorizações de capturas de aves para pesquisas no Parque Nacional de Itatiaia seguiram a previsão legal dos órgãos ambientais competentes e instruções sob Lei Complementar nº 140/11; Portaria nº 12/2011, inscrição e regularidade dos participantes no Cadastro Técnico Federal do Ibama (CTF) e no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 55195-1, conforme a Instrução Normativa número 3 de 2014 (IN 03/2014, ICMBio). Além disso, o parecer aprovando o projeto junto a Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o número 6121130617.

Da mesma forma, todos os procedimentos de capturas para pesquisas na Zona da Mata Mineira foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o protocolo nº 042/2012, e também pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268-3, conforme a Instrução Normativa número 3 de 2014 (IN 03/2014, ICMBio).

4 RESULTADOS

Foram examinadas no presente estudo 181 aves passeriformes, pertencentes a sete espécies. No Parque Nacional de Itatiaia, foram examinadas 37 aves distribuídas em 4 espécies (*Turdus flavipes*, *Turdus albicollis*, *Turdus subalaris* e *Turdus flavipes*), enquanto na Zona da Mata Mineira foram avaliadas 151 aves pertencentes a três espécies (*Thamnophilus caerulescens*, *Tachyphonus coronatus* e *Synallaxis spixi*).

4.1 Parque Nacional de Itatiaia

4.1.1 Espécies de aves examinadas

Foram analisadas 37 aves pertencentes ao gênero *Turdus* dentro do PNI.

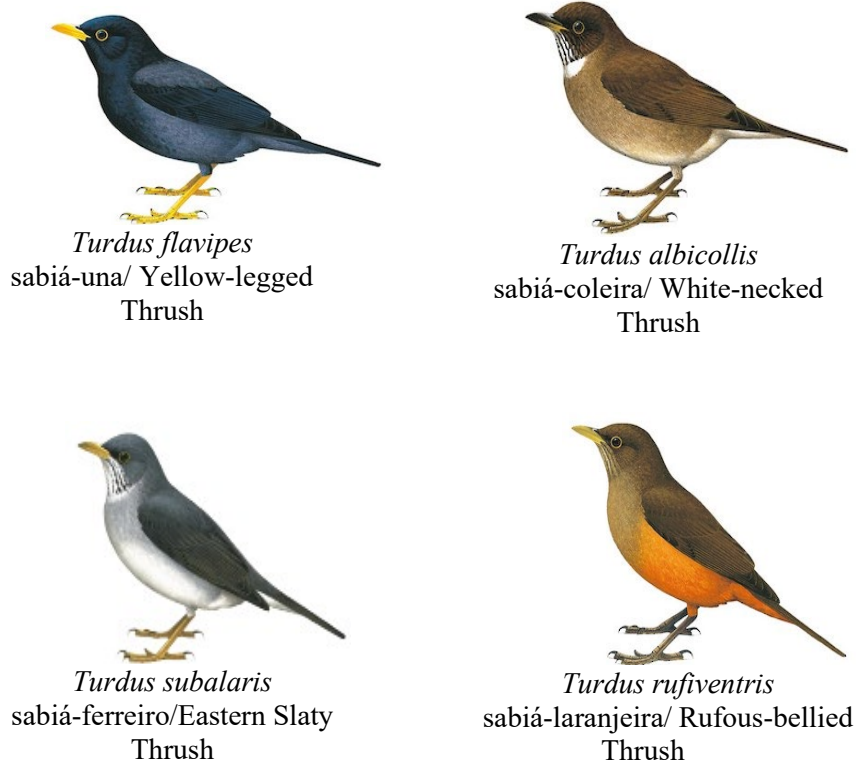


Figura 9 - Espécies de aves da família Turdidae. O somatório em cada espécie representa o total capturado no PNI. Indivíduos do sexo masculino são apresentados em *T. flavipes* e *T. subalaris* meramente ilustrativos (imagens adaptadas de DEL HOYO *et al.*, 2018).

Fonte: (DEL HOYO *et al.*, 2018).

Foram capturados dez indivíduos na área 1a, próximo dos 800 m de altitude: 7 *Turdus albicollis*, 2 *Turdus flavipes* (1 fêmea e 1 macho) e 1 *Turdus rufiventris*. 12 indivíduos na área 1b, próximo dos 850m de altitude: 4 *Turdus albicollis*, 4 *Turdus flavipes* (3 fêmeas e 1 macho), 3 *Turdus rufiventris* e 1 *Turdus subalaris*. 7 indivíduos na área 2a, próximo dos 1.195m de altitude: 1 *Turdus albicollis*, 1 *Turdus flavipes* (1 fêmea) e 5 *Turdus rufiventris*. 4 indivíduos na área 2b, próximo dos 1.400m de altitude: 4 *Turdus rufiventris* e 4 indivíduos na área 3, próximo dos 2.200m de altitude: 1 *Turdus flavipes* e 3 *Turdus rufiventris* (Tabela 1).

As espécies de pássaros do gênero *Turdus* positivos para o gênero *Trypanosoma* sp. nas análises moleculares foram *T. flavipes* (fêmea), *T. albicollis* capturados na área 1a e 1b, respectivamente. Esses pássaros foram capturados nas campanhas referentes aos meses de junho (*T. flavipes*) e (*T. albicollis*) agosto de 2017, ambas campanhas na estação seca do ano.

Tabela 1 - Espécies do gênero *Turdus*, capturadas no PNI durante as 8 campanhas entre junho a dezembro de 2007 e março de 2008

Espécies capturadas	Nome popular	Pontos de coletas				
		1a (800m)	1b (850m)	2a (1.195m)	2b (1.400m)	3(2.200m)
<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	sabiá-coleira	7	4	1	0	0
<i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	sabiá-una	2	4	1	0	1
<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	sabiá-laranjeira	1	3	5	4	3
<i>Turdus subalaris</i> (Seebohm, 1887)	sabiá-ferreiro	0	1	0	0	0
Total		10	12	7	4	4

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.1.2 Análise microscópica

A frequência encontrada pelo esfregaço de sangue de *Trypanosoma* foi de 2,7% de aves positivas (n = 1/37). Apenas uma lâmina encontrava-se positiva para o hemoparasita acima referido.

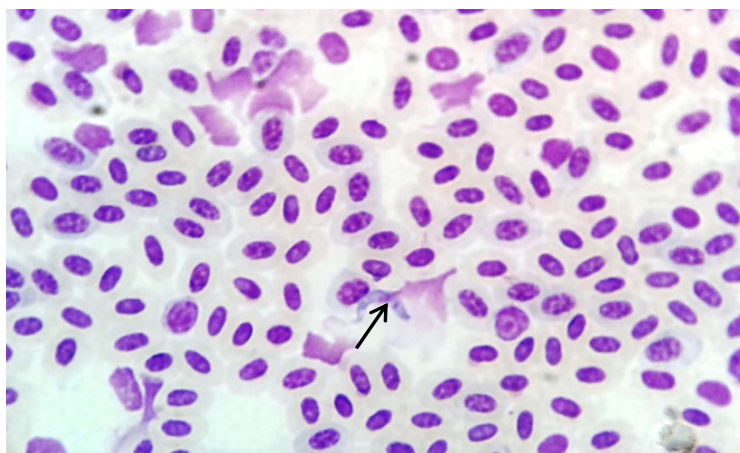


Figura 10 - A presença de *Trypanosoma* na forma tripomastigota com os eritrócitos em lâmina de *Turdus albicollis*. Observa-se a seta indicando o núcleo do parasita.

Fonte: Arquivo pessoal (2020).

4.2 Zona da Mata Mineira

4.2.1 Espécies de aves examinadas

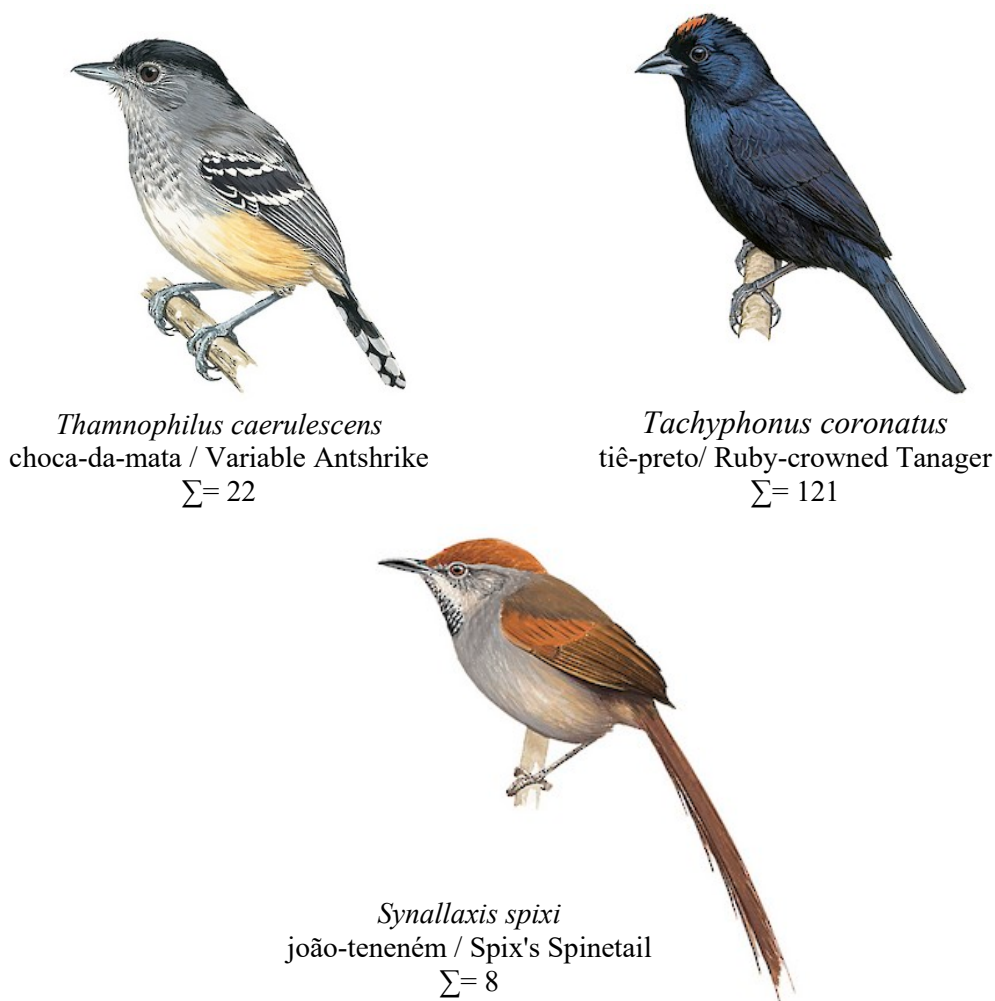


Figura 11 - Passeriformes da família Furnariidae, Thraupidae e Thamnophilidae O somatório em cada espécie representa o total capturado na ZMM. Indivíduos do sexo masculino são apresentados meramente ilustrativos (imagens adaptadas de DEL HOYO *et al.*, 2018).

Fonte: (DEL HOYO *et al.*, 2018)

Foram analisadas 151 passeriformes em áreas da ZMM. 121 espécimes de *Tachyphonus coronatus*, 22 de *Thamnophilus caerulescens* e oito *Synallaxis spixi*. A frequência de amostras positivas para *Trypanosoma* sp. em *T. coronatus* foi de 7,44%, enquanto nas espécies *T. caerulescens* e *S. spixi* foi de 4,5% e 12,5%, respectivamente.

4.2.2 Análise microscópica

Não foi possível realizar análise morfométrica das formas sanguíneas encontradas nessas espécies de aves devido à baixa parasitemia. A figura 12 ilustra as formas tripomastigotas observadas em *T. coronatus*.

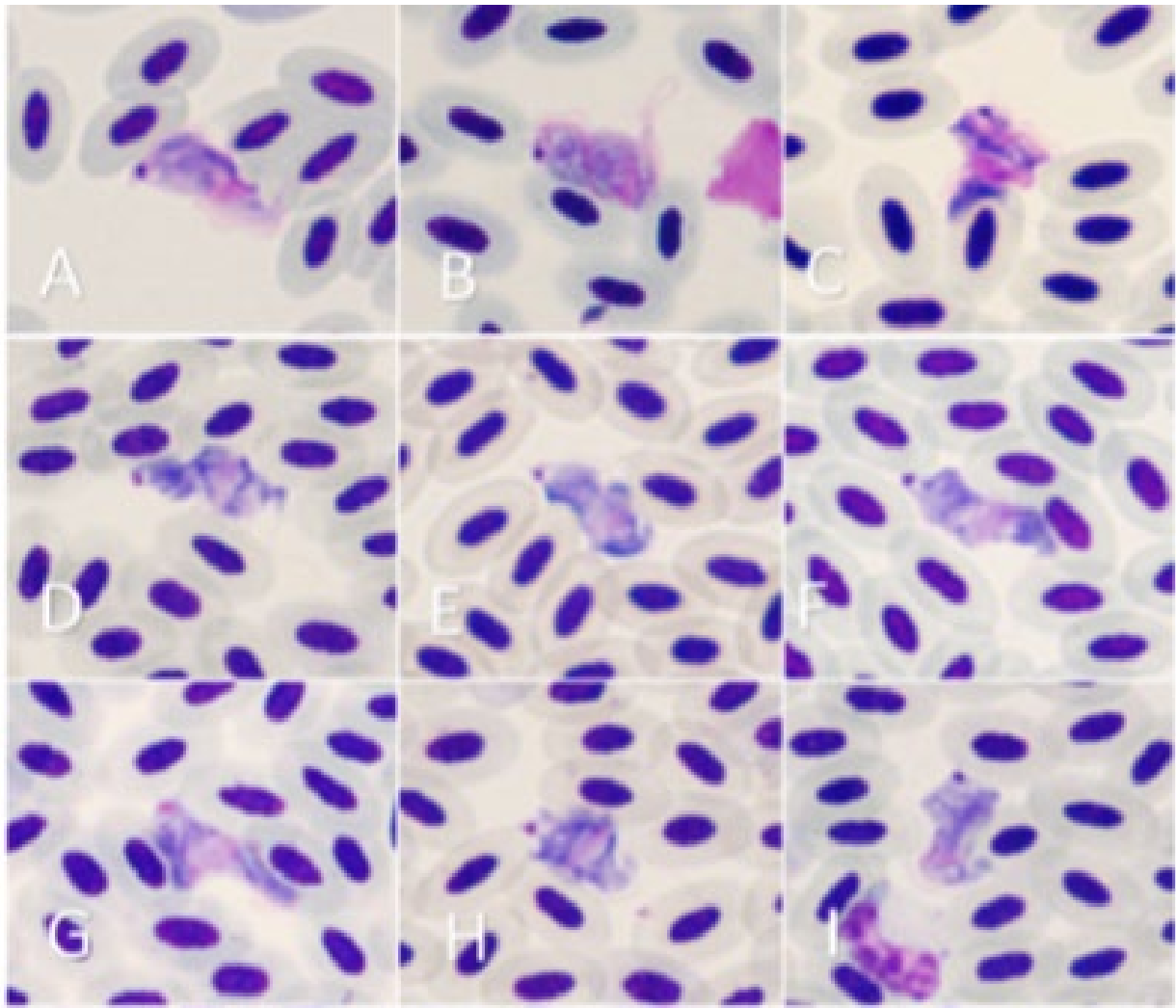


Figura 12 - Fotomicrografias em aumento de 600x realizadas em microscópio Bx51 de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa 9% contendo formas tripomastigotas do gênero *Trypanosoma* em aves silvestres. A-J amostras de dois indivíduos de tiê-preto (*Tachyphonus coronatus*).

Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Trypanosoma sp, sete pássaros do gênero *Turdus*, com a frequência de 18,9% (n=7/37) capturados no parque de Itatiaia. As amostras que amplificaram a sequência 18S rDNA na PCR convencional e apresentaram bandas no gel com maior intensidade foram selecionadas para nova amplificação, purificação das amostras e posterior sequenciamento, conforme evidencia a figura 13 com as amostras de número 18 e 137 (*T. albicollis*) e amostra 23 (*T. flavipes*). Apenas 2 amostras apresentaram qualidade de sequenciamento, as amostras 23 e 137.

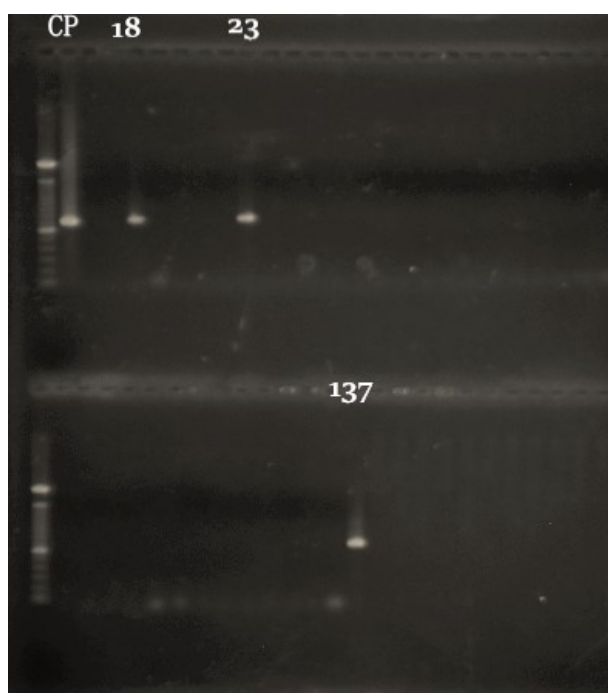


Figura 13 - Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 780pb do gene 18S rDNA para o gênero *Trypanosoma* sp. **Poço 1**- Peso Molecular (100bp Plus DNA Ladder™); **Poço 2**- Controle positivo de *T. vivax*; **Poço 3** Controle negativo – amostras consideradas positivas para *Trypanosoma* sp; 18* 23* e 137*¹.

Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Nas aves capturadas no Jardim Botânico-MG, observou-se uma frequência de 4,96% (n=6/121) em *Tachyphonus coronatus*, 4,54% (n=1/22) em *Thamnophilus caerulescens* e 12,5% (n=1/8) em *Synallaxis spixi* utilizando a técnica de PCR.

Um total de 10 amostras positivas (1 de *Turdus albicollis*, 1 de *Turdus flavipes*, 6 de *Tachyphonus coronatus*, 1 de *Thamnophilus caerulescens* e uma de *Synallaxis spixi*) foram submetidas a 3 reações de PCR independentes e os produtos de cada uma das reações de PCR foram clonados em vetor pGEM-T. Foram submetidos ao sequenciamento 5 clones de cada reação de PCR, totalizando 15 sequências de cada espécime de ave avaliada. Todas as 15 sequências obtidas de *Turdus albicollis* e de *Turdus flavipes* foram idênticas entre si. Nos seis espécimes de *Tachyphonus coronatus*, foram observadas 5 sequências distintas. Todas as sequências de *Thamnophilus caerulescens* e *Synallaxis spixi* foram idênticas entre si. Utilizando a estratégia de clonagem de reações de PCR diferentes foi possível observar em um dos espécimes de *Tachyphonus coronatus* duas sequências de *Trypanosoma* distintas, o que evidencia uma provável coinfeção. Na tabela 2, está descrita a distância evolutiva entre as sequências observadas em cada espécie de ave estudada. De acordo com os dados de distância, podemos observar que uma mesma linhagem genética de *Trypanosoma* sp. é capaz de infectar diferentes espécies de aves, assim como uma mesma espécie de ave pode ser infectada por mais de uma linhagem de *Trypanosoma* sp.

¹ * Números das amostras aleatórias, não correspondentes a ordem no poço do gel.

Tabela 2 - Distância evolutiva entre as sequências de *Trypanosoma* sp. observadas em aves das espécies *Turdus albicollis*, *T. flavipes*, *Tachyphonus coronatus*, *Thamnophilus caerulescens* e *Synallaxis spixi* capturadas no parque de Itatiaia-RJ e Jardim Botânico-MG.

Linhagens de <i>Trypanosoma</i> sp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Turdus albicollis</i>) - Amostra_127										
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Turdus flavipes</i>) - Amostra_23	0,0000									
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_1	0,0133	0,0133								
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_2	0,0133	0,0133	0,0000							
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_5	0,0166	0,0166	0,0066	0,0066						
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_1685	0,0166	0,0166	0,0066	0,0066	0,0000					
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_1021-1	0,0341	0,0341	0,0394	0,0394	0,0431	0,0431				
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_1021-2	0,0099	0,0099	0,0082	0,0082	0,0099	0,0099	0,0394			
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Tachyphonus coronatus</i>) - Amostra_1880	0,0413	0,0413	0,0377	0,0377	0,0413	0,0413	0,0082	0,0395		
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Thamnophilus caerulescens</i>) - Amostra_3	0,0166	0,0166	0,0066	0,0066	0,0000	0,0000	0,0431	0,0099	0,0413	
<i>Trypanosoma</i> sp. (<i>Synallaxis spixi</i>) - Amostra_1922	0,0166	0,0166	0,0066	0,0066	0,0000	0,0000	0,0431	0,0099	0,0413	0,0000

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.4 Análise Filogenética

As amostras positivas em microscopia óptica foram analisadas em biologia molecular, das 10 amostras positivas foram recuperadas seis novas sequências do gene 18S rDNA de *Trypanosoma*, dos hospedeiros *Tachyphonus coronatus*, *Thamnophilus caerulescens*, *Synallaxis spixi*, *T. flavipes* e *T. albicollis*. A reconstrução filogenética mostrou o agrupamento das sete novas linhagens obtidas nesse estudo com parasitos do gênero *Trypanosoma* que ocorrem em aves (Figura 14). As novas linhagens agruparam-se em dois clados. As linhagens JB03, JB04, JB05, ITA01 e ITA02 agruparam-se junto à espécie *T. benneti*. As linhagens JB01 e JB02 agruparam-se externamente aos clados das espécies *T. avium*, *T. cullicavium* e *T. corvi*. As novas linhagens de trypanosoma encontradas neste estudo agruparam-se com linhagens com ocorrência registrada na Europa, Ásia e África (Figura 14). Não houve agrupamento de acordo com o local de origem das novas linhagens de *Trypanosoma*, as linhagens oriundas do Jardim Botânico UFJF, JB01 e JB02, não se agruparam com as demais, JB03, JB04, JB05; estas agruparam-se com as linhagens oriundas de Itatiaia, ITA01 e ITA02 (Figura 14). As linhagens JB01, JB02, JB03, JB04 e JB05 ocorreram nos hospedeiros da espécie *Tachyphonus coronatus*, a linhagem JB03 ocorreu nas espécies *Thamnophilus caerulescens* e *Synallaxis spixi* e as linhagens ITA01 e ITA02 ocorreram nas espécies *T. flavipes* e *T. albicollis*, respectivamente (Figura 14).

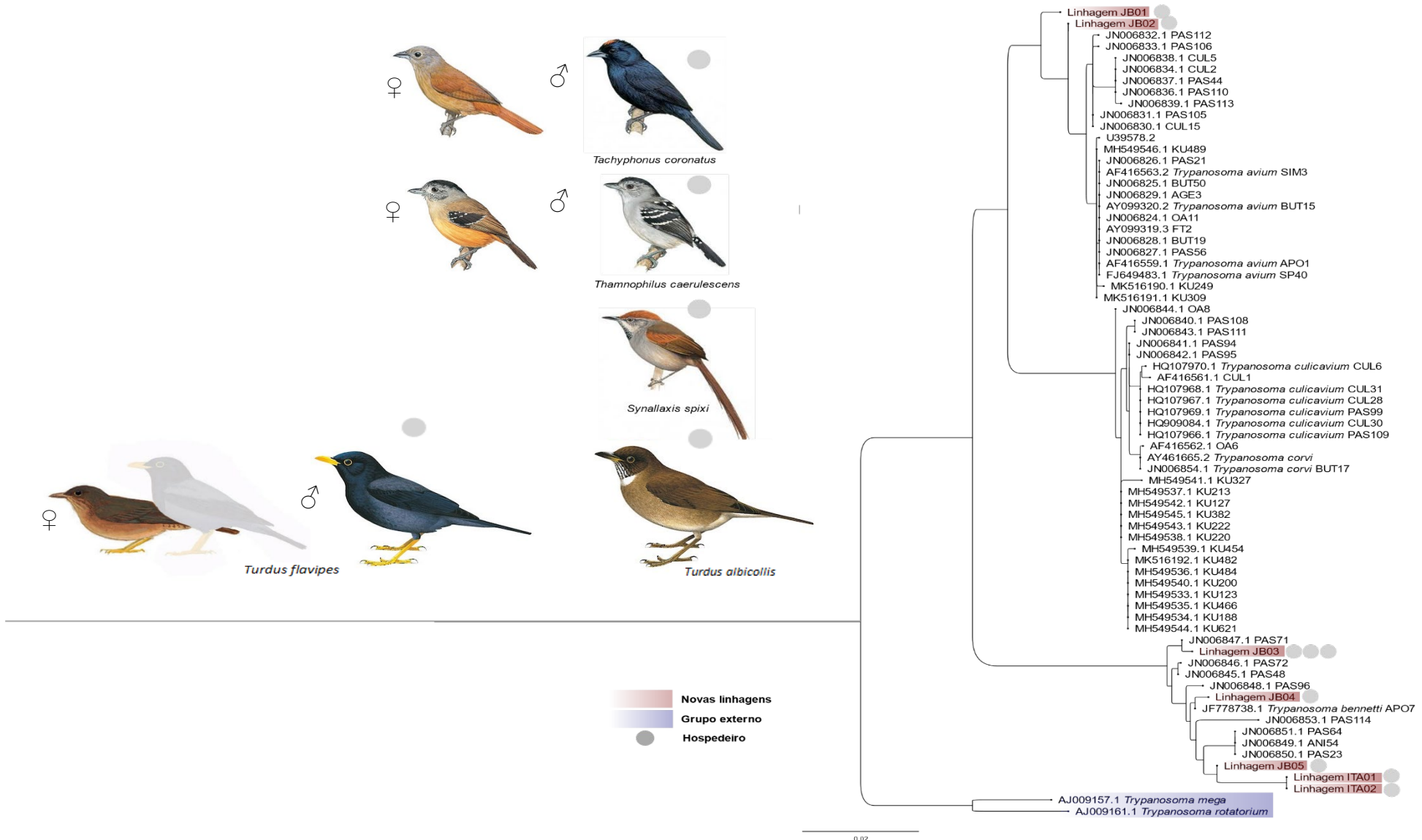


Figura 14 - Árvore filogenética do gene 18S rDNA de Trypanosomas aviários inferida por Máxima Verossimilhança sob o modelo evolutivo GTR+G. Os valores próximos aos nós representam os valores posteriores de probabilidade. As linhagens obtidas neste estudo estão marcadas em vermelho. Barra representa 4 substituições para posições de 100 nucleotídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5 DISCUSSÃO

O estudo proposto, de modo inédito, é o primeiro a acessar a diversidade molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves no Brasil. Até então, todos os estudos relacionados a tripanossomatídeos aviários basearam-se principalmente em relatos de ocorrência em esfregaços sanguíneos de aves em estudos voltados para hemoparasitos em geral. (CERQUEIRA 1906; LUTZ; MEYER, 1908; SPLENDORE, 1910; CARINI; BOTELHO, 1914; CARINI; MACIEL, 1916; PILMMER, 1914; PESSOA, 1935; LUCENA, 1938; LAINSON, 1970; BENNETT; LOPES 1980; WOODWORTH-LYNAS *et al.* 1989; RIBEIRO *et al.* 2005; SEBAIO, 2010, 2012).

Aqui, por meio de novas abordagens metodológicas na biologia molecular do grupo, revelamos sete sequências inéditas do gene 18s de tripanossomatídeos aviários. Cabe destacar que as linhagens inéditas recuperadas neste estudo contribuem largamente para revelar a diversidade de *Trypanosoma* em aves, que ainda está subestimada (ZIDKOVÁ, 2012). No Brasil, em virtude da grande dimensão territorial, diversidade de aves hospedeiras e insetos vetores, é provável que exista uma variedade importante de espécies de *Trypanosoma* em aves no País, ainda são necessários mais estudos para compreender a diversidade de tripanossomatídeos aviários no Brasil, uma vez que a grande maioria dos estudos são limitados as técnicas de esfregaço sanguíneo, com pouco ou nenhuma informação molecular sobre o protozoário.

A caracterização molecular é uma ferramenta primordial para a detecção de *Trypanosoma* spp., apresenta alta sensibilidade e especificidade, mesmo em casos de baixa parasitemia. Diversos autores têm utilizado PCR como método diagnóstico para esses hemoparasitas (ZÍDKOVÁ *et al.*, 2012; SEHGAL *et al.*, 2006; VALKIUNAS, 2006), uma vez que tripanossomatídeos são indistinguíveis com base em critérios morfológicos. Kirkpatrick, (1986), Apanius (1991), Atkinson e Van Riper (1991) e Svobodová e Votýpka (1998) relatam que tripanosomas aviários aparecem, via de regra, em baixas intensidades em seus hospedeiros ao exame de esfregaço de sangue, o número de organismos é frequentemente tão baixo que deixa de fornecer um tamanho de amostra útil, e isso corrobora com o estudo desenvolvido, haja vista o fato de não se ter positividade significativa nas amostras de esfregaço sanguíneo em lâminas dos pássaros silvestres capturados no PNI. Bennett *et al.* (1994) descobriram que muitas espécies de aves infectadas com tripanossomatídeos são morfológicamente indistinguíveis com base em critérios apenas taxonômicos, o que ressalta a importância das análises moleculares ao diagnóstico específico desses hemoprotozoários.

Neste estudo, a reconstrução filogenética mostrou o agrupamento de algumas linhagens com espécies de *Trypanosoma* com caracterização morfológica válida. As linhagens JB03, JB04, JB05, ITA01 e ITA02 formaram um clado com as outras sequências, ao passo que a espécie *T. benneti* e as linhagens JB01 e JB02 agruparam-se externamente aos cladros das espécies *T. avim*, *T. cullicavium* e *T. corvi* (Figura 14).

Por este trabalho ser o primeiro a mostrar a diversidade molecular de tripanossomatídeos aviários no Brasil, acreditamos que a associação das novas linhagens às espécies válidas seria prematura. Apesar dos estudos com tripanosomas aviários já datarem de mais de um século atrás a taxonomia do grupo evolui lentamente. A maioria das espécies descritas foi pouco ilustrada e publicadas em periódicos não específicos (APANIUS 1991, VALKIUNAS 2011), isso torna a maioria das descrições originais de espécies pouco acessível para a comparação morfológica, assim muitas espécies de tripanossomatídeos aviários são inconsistentes.

Atualmente, a soma da biologia molecular aos estudos morfológicos tem dado mais robustez para a classificação do grupo e alguns estudos têm descrito novas espécies somando estas duas ferramentas, *Trypanosoma gallinarum* (SEHGAL, 2006), *Trypanosoma culicavium* (VOTPYKA, 2011), *Trypanosoma anguifomis* e *Trypanosoma poligranularis* (VALKIUNAS, 2011) e algumas espécies, mais bem amostradas pela ciência, têm sido contempladas com sequências genéticas, tornando espécies amplamente conhecidas pela sua morfologia, como *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma corvi*, igualmente conhecidos molecularmente (PORNAPANOM, 2019; VOTYPKA *et al.*, 2004), porém ainda há uma grande lacuna de amostragem para que se entenda os processos de especiação para uma classificação mais verdadeira por meio da biologia molecular.

Apesar de ainda inconclusivas sobre uma segura definição de espécies, as análises filogenéticas permitem recuperar outras informações igualmente ou mais relevantes. Quando consideramos o local de origem das linhagens, podemos, por meio da reconstrução filogenéticas, inferir hipóteses sobre a biogeografia e a história evolutiva dos tripanossomatídeos aviários. A literatura mostra que algumas espécies de tripanosomas aviários possuem uma distribuição ampla, como é o caso de *Trypanosoma avium*, parasitando aves na América do Norte, Europa, África e Ásia (ZIDKOVÁ, 2002; PORNAPANON, 2019), e outras uma distribuição mais restrita, como *Trypanosoma culicavium* relatado somente na Europa Central (VOTPYKA, 2011).

Em nossas hipóteses iniciais, pela ausência de amostragem molecular de tripanossomatídeos aviários no Brasil, esperávamos o agrupamento das novas linhagens descritas no Brasil em dois clados distintos, um clado formado pelas oriundas do Jardim Botânico UFJF (JB) e outro clado formado pelas linhagens oriundas do Itatiaia (ITA). No entanto, os resultados mostraram que as novas linhagens não só não se agruparam entre as microrregiões (JB e ITA), como também formaram clados com linhagens de outros continentes. Como exemplo, a linhagem JB03 descrita aqui, em uma floresta tropical na Mata Atlântica Brasileira que se agrupou à linhagem PAS71 descrita em uma floresta temperada na República Tcheca (ZIDKOVÁ, 2012) e não se agrupou as demais encontradas na mesma localidade. Algumas hipóteses podem ser levantadas, como a mesma espécie de *Trypanosoma* pode estar infectando as aves de diferentes espécies, os movimentos migratórios das aves podem dispersar os parasitos, ou ainda, os parasitos podem ser introduzidos por ação antrópica. Muitas lacunas ainda precisam ser respondidas, sendo necessários mais estudo com *Trypanosoma* em aves em diferentes continentes.

Uma importante variável ecológica a ser considerada nas relações parasita-hospedeiro é, sem dúvidas, o deslocamento das espécies. Além da variação espacial nos deslocamentos das espécies, deve-se considerar a variação temporal, que pode ocorrer sazonalmente, anualmente ou em ciclos de vários anos, e *T. albicollis* segue esse padrão, conforme Alves (2001) descreve sobre a frequência dessa espécie capturada na Floresta Atlântica, sendo mais registrada por meio de capturas com redes ornitológicas no sub-bosque da Floresta Atlântica da Ilha Grande e permitindo a avaliação da sua flutuação populacional ao longo do ano e entre anos, seguindo um padrão mais ou menos similar ao longo dos anos com amostragem mensal e metodologia padronizada.

As pesquisas de Kirkpatrick, (1986) sugerem que os tripanossomatídeos aviários mostram diferenciação genética específica do hospedeiro, apesar da observação em infecções experimentais que os tripanossomatídeos cruzam os limites das espécies hospedeiras com grande facilidade.

Outro aspecto interessante possibilitado pela reconstrução filogenética, que corrobora a ampla distribuição geográfica dos tripanossomatídeos aviários, é a inferência sobre a especificidade dos parasitos em relação aos seus hospedeiros. Na história taxonômica dos tripanosomas aviários, diversas descrições de espécies foram baseadas na hipótese de que os

parasitos eram específicos para cada hospedeiro, ou seja, cada novo registro em uma nova espécie de ave era passível de uma descrição de nova espécie de *Trypanosoma*. Entretanto, com o aumento dos estudos, experimentos de infecção e análises moleculares mostraram que cepas de *Trypanosoma* de mesma origem podiam ser vetoradas e infectar aves de diferentes espécies (BENNETT, 1961; MOLYNEUX, 1973; SEHGAL, 2001) e estudos de campo apoiados em biologia molecular mostraram que na natureza as espécies de *Trypanosoma* são capazes de infectar ampla gama de espécies de hospedeiros diferentes em comunidades aviárias (SEHGAL, 2011; TASÇI, 2018, PORNAPANON, 2019).

Em estudos recentes de Votypka, 2004 mostraram *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma corvi* podem parasitar o mesmo hospedeiro aviário sendo transmitido simpaticamente, por diferentes espécies de ceratopogonídeos. Logo, com a adição de novas ferramentas aos estudos, novas técnicas de cultivo e principalmente as infecções experimentais em diversas espécies de aves e vetores dípteros, esta hipótese de especificidade foi refutada (BENNETT 1961; MOLYNEAUX, 1973, VOTYPKA, 2004).

Os nossos resultados corroboram a inespecificidade dos tripanosomas aviários mostrada na literatura, as linhagens JB01, JB02, JB03, JB04 e JB05 foram encontradas em hospedeiros da espécie *Tachyphonus coronatus* e as linhagens ITA01 e ITA02 ocorreram nos hospedeiros das espécies *Turdus albicollis* e *Turdus flavipes*. Ambas as espécies de aves mostraram que podem abrigar linhagens diferentes de *Trypanosoma* e, por consequência, potencialmente espécies diferentes do parasito, reforçando o quão inespecífico é este parasito em relação ao seu hospedeiro e o quanto isto pode ter influenciado na construção da taxonomia do grupo. Além disso, a cristalização do conhecimento sobre inespecificidade de *Trypanosoma* em relação aos seus hospedeiros aviários nas últimas décadas permite questionar sobre qual o papel das aves no processo de especiação dos tripanosomas aviários, sugerindo que os vetores possam assumir um papel mais efetivo na especiação do grupo.

As amostras dos isolados deste estudo encontram-se próximos aos isolados do leste europeu (República Tcheca e Eslováquia), sendo praticamente todos eles provenientes de aves selvagens hospedeiras, em uma diversidade das ordens Passeriformes (*Emberiza citrinella*, *Ficedula albicollis*, *Phylloscopus sibilatrix*) Accipitriformes (*Clanga pomarina* e *Accipiter nisus*) encontradas na Europa, África e Ásia, e ainda, algumas dessas aves são migratórias. Há um isolado de *T. bennetti* sem referências para hospedeiro na República Tcheca e há de se ressaltar para o mesmo país referido, isolados não agrupados de um ectoparasita (*Ornithomya avicularia*), o qual se sabe tratar-se de uma mosca hematófaga (Diptera:Hippoboscidae) de aves (HILL, 1962; MAA, 1969; PETERSEN, 2018) e servem como vetores para patógenos associados ao sangue (BARTOS *et al.*, 2019).

Apesar de ainda estarmos muito distantes de compreender os papéis relativos da filogenia do hospedeiro e parasita, e também a ecologia de vetores na determinação da distribuição de *Trypanosoma* em comunidades naturais, os tripanossomatídeos aviários podem fornecer modelos úteis explorando a evolução dos hemoflagelados em métodos moleculares mais exigentes. A ecologia das aves fornece uma rica literatura a partir da qual algumas hipóteses são testadas sobre a importância relativa da ecologia do vetor e da filogenia do hospedeiro na evolução do tripanosoma (APANIUS, 1991).

Mediante a afirmação de Patz, (2000) sobre as mudanças ambientais alterando o balanço ecológico, bem como o contexto sob os quais os hospedeiros ou os vetores e parasitos são alimentados, desenvolvem-se e transmitem doenças, pode-se dizer que há um longo caminho a ser percorrido no conhecimento das interações parasita-hospedeiro e, tratando-se de um protozoário com alto grau de pleomorfismo, é necessário um estudo aprofundado dos processos genéticos de populações e das relações filogenéticas.

Partindo do pressuposto da possibilidade de coinfeção em nossas amostras desenvolvemos um ensaio de PCR associada a Clonagem para aumentar a chance de detectar

possíveis coinfeções por parasitos do gênero *Trypanosoma* nas espécies de aves estudadas. Apenas em um caso foi possível observar tal fato. Cinco clones de uma das três reações de PCR realizadas a partir do DNA extraído de *T. coronatus* foi possível observar, após a análise do sequenciamento, apenas a linhagem JB01. Nas outras duas reações de PCR (ou seja, dos 10 clones), recuperou-se apenas a linhagem JB05. De acordo com os resultados obtidos, fica evidente que a estratégia empregada no estudo não se mostrou eficiente para a detecção de processos de infecção mista. Acredita-se que estudos metagenômicos associados com metodologias de sequenciamento em larga escala possam revelar com maior precisão a diversidade de linhagens de *Trypanosoma* nas espécies de aves estudadas (GU *et al.*, 2019). Logo, nas análises de biologia molecular por meio de métodos de clonagem conseguimos recuperar duas linhagens diferentes (JB01 e JB05) no mesmo indivíduo da espécie *Tachyphonus coronatus*, ou seja, duas linhagens de *Trypanosoma* que se agruparam distantes nas análises filogenéticas (Figura 10) estão parasitando a mesma ave ao mesmo tempo. Logo, somada a alta variabilidade das formas encontradas nos esfregaços com a possibilidade de mais de uma espécie de *Trypanosoma* estar ocorrendo na mesma ave ao mesmo tempo, podemos questionar a validade da maioria de espécies de tripanossomatídeos aviários descritos e reforçar a importância de estudos com mais ferramentas para acessar a real diversidade do grupo.

Outra questão importante a ser ressaltada foi a qualidade das linhagens disponíveis no Genbank para as análises filogenéticas. Durante a preparação do dataset contendo as sequências de tripanossomatídeos aviários a serem utilizados, buscamos exaustivamente em publicações da área todas as sequências disponíveis de *Trypanosoma* parasitos de aves. Percebemos que não há uma padronização nos marcadores genéticos, além do uso do gene 18s, usado neste estudo, são utilizados outros marcadores, tornando a composição dos datasets limitada ao mesmo marcador. Atualmente, o Genbank conta com 95 sequências disponíveis do gene 18s de tripanossomatídeos aviários, das quais somente 63 foram utilizadas na reconstrução filogenética por outro problema, os diferentes comprimentos das sequências. Diferentes trabalhos realizados utilizam regiões diferentes do mesmo gene, como o 18s, gerando sequências deste gene de diferentes comprimentos, 18s SSU rRNA, por exemplo, onde são amplificadas regiões hipervariáveis, tornando as análises filogenéticas menos informativas devido a adequação das sequências ao tamanho comum as outras.

Acreditamos que a evolução dos marcadores, como genes completos e regiões mais informativas, e evolução da capacidade de análises de dados possa trazer clareza para o grupo, porém, apesar dos avanços serão necessários esforços conjuntos entre os pesquisadores da área para uma padronização das metodologias. Como bom exemplo, o banco de dados curado MalAvi (BENSCH *et al.*, 2009), abriga sequências do gene Cyt b de hemosporídeos de aves de todo o mundo e torna mais fácil o acesso dos pesquisadores aos dados. Isso torna as reconstruções filogenéticas mais ricas e seguras e contribui profundamente para o esclarecimento das relações evolutivas dos hemosporídeos. Entretanto, novamente, mostram-se necessárias iniciativas conjuntas e comunicação entre cientistas da área.

Assim, ressaltamos que estudo em voga, de modo inédito, é o primeiro a acessar a diversidade molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves no Brasil. Aqui, por meio de metodologias modernas para o grupo, revelamos sete novas sequências do gene 18s de tripanosomas aviários, contribuindo largamente para revelar a diversidade global de *Trypanosoma* que ainda está subestimada, e reafirmamos a ampla distribuição do parasito, bem como sua relação pouco específica com seus hospedeiros aviários. Logo, esperamos que o presente trabalho estimule outras pesquisas ao redor do globo com tripanosomas aviários, para que haja uma amostragem mais ampla e fiel da diversidade do parasito e suas relações com os hospedeiros. Esperamos também que as limitações metodológicas e lacunas encontradas e discutidas neste estudo incitem reflexões aos pesquisadores da área para uma

iniciativa conjunta de coesão a padronização das linhagens, para que no futuro se crie um banco de dados curado para análises filogenéticas mais precisas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem elaborar as seguintes conclusões:

1. Espécies de *Turdus* amostrados no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) apresentam uma baixa prevalência de infecção por *Trypanosoma*;
2. *Turdus flavipes* e *Turdus albicollis* foram registrados como novos hospedeiros de *Trypanosoma sp.* filogeneticamente relacionada com a espécie *T. bennetti*;
3. Sete novas sequências de 18S rDNA de tripanosomas aviários foram adicionadas aos bancos de dados públicos, favorecendo largamente a identificação da diversidade global de *Trypanosoma* em aves.;
4. *Tachyphonus coronatus* pode ser considerado hospedeiro de mais de uma linhagem de *Trypanosoma*, sendo uma delas filogeneticamente relacionada com *T. bennetti* e outra com *T. avium*;
5. A taxonomia integrativa é um caminho para aliar as técnicas mais adequadas para o estudo desses hemoprotozoários, principalmente levando em conta o pleomorfismo desses indivíduos;
6. Os dados do estudo proposto não deixam claro a especificidade dos parasitas aos seus hospedeiros devido ao baixo número amostral de aves positivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. A. S. Estudos de Ecologia de Aves na Ilha Grande, RJ, p. 61-68. *In*: ALBUQUERQUE, J. L. B.; Candido Jr, J. F.; Straube F.C. (eds.). **Ornitologia e Conservação**: da Ciência às Estratégias. Vol. 1. Florianópolis: Unisul, 2001.
- ALVES, M. A. S. Sistemas de migrações de aves em ambientes terrestres no Brasil: exemplos, lacunas e propostas para o avanço do conhecimento. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, n. 2, p. 231-238, 2007.
- ALVES, M. A. S. *et al.* *In*: BERGALLO, H. G.; ROCHA, C. F. D.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS M. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 113-124, 2000.
- ANDERSON, R. M.; MAY, R. M. Population Biology of Infectious Diseases. **Nature**, v. 280, p. 361-367, 1979.
- ANDRÉ, M. R. **Detecção sorológica e caracterização moleculares de agentes anaplasmatáceas, micoplasmas hemotróficos, piroplasmas e hepatozoonsp em carnívoros selvagens mantidos em cativeiro no Brasil**. 209 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.
- APANUS V. Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. **Parasitology today**, v.7, p. 87–90, 1991.
- ASGHAR, M. *at al.* Hidden costs of infection: chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. **Science**, v. 347, p. 436–438, 2015.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. *In*: **Bird-Parasite Interactions. Ecology, Evolution, and Behaviour** (ed.). Loye, J. E.; Zulk, M., pp. 19–48. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991.
- ATKINSON, C. T.; FORRESTER, D. J.; GREINER, E. C. Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: seasonal transmission and vector abundance. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, p. 45-51, 1988.
- BAKER, J. R. Biology of the trypanosomes of birds. *In*: Lumsden, W.H.R.; Evans, D.A. (Eds.). Biology of the Kinetoplastida, Vol. 1. **Academic Press**, London, U.K., pp. 131–174. 1976.
- BARTOS, M. *et al.* Louse flies of Charadrii and Scolopaci shorebirds migrating through Central Europe. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, n. 2, p. 202, 2019.
- BAKER J. R. Studies of *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. **Parasitology**, v. 46, p. 321–334. (1956a).

- BAKER, J. R. Studies of *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. III. Life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. **Parasitology**, v. 46, p. 335–352. (1956b).
- BARBOSA, B.C. *et al.* Aves do Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 20, n. 2, p.1-15, 2019.
- BENNETT, G. F.; EARLE, R.A.; SQUIRES-PARSONS, D. Trypanosomes of some sub-Saharan birds. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 263–271, 1994.
- 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. On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 39, p. 17–33, 1961.
- BENNETT, G. F.; WHITEWAY, M. A.; WOODWORTH-LYNAS, C. B. Host-parasite catalogue of the avian haematozoa. Memorial University of Newfoundland. **Occasional Papers in biology**, v. 5, p.243, 1982.
- BENCKE, G. A.; MAURICIO, G. N.; DEVELEY, P.F.; J.M. GOERCK. **Áreas Importantes Para a Conservação das Aves no Brasil: Parte 1 – Estados do Domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: Save Brasil, 2006.
- BENSCH, S. *et al.* MALAVI: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Resource.**, v. 9, p.1353–1358, 2009.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **The BirdLife checklist of the birds of the world**: version 8, 2015. Disponível em: <http://datazone.birdlife.org/home>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- BJÖERSDORFF, A. *et al.* Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 877–879, 2001.
- BORGES, S. H.; RAPÔSO-FILHO, J. R. Ornitologia da Reserva Biológica do Poço D’Anta: levantamento II. **Boletim do Instituto de Ciências Biológicas e Geociências**, v. 42, p. 45-55, 1989.
- BORGHEAN, T. C. *et al.* Molecular phylogenetic redefinition of herpetomonas (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. **Prostit**, v. 164, n. 1, p. 129-152, 2013.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade Brasileira - Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, 2002. 404 p.
- CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A. and Brazil. *In*: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS da ROSA J. F.S. An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. **Instituto Evandro Chagas**, Belém, p. 32-41, 1998.

- CAO, W. C. *et al.* Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 664-668, 2006.
- CARNEIRO, P.A.S.; FONTES, R. Desigualdade na Região da Zona da Mata Mineira. *In:* Fontes, R.; Fontes M.P.F. **Crescimento e desigualdade regional em Minas Gerais**. Viçosa, MG, p.389-465, 2005.
- CARINI, A.; BOTELHO, C. Alguns Trypanosomas de Pássaros do Brasil. *In:* **Paul. Med. Cirur.**, v. 3, n. 2, p. 1-3, 1914.
- CARINI, A.; MACIEL, J. Quelques hémoparasites d'oiseaux du Brésil. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 9, n. 4, p. 247-265, 1916.
- CARRARA, A. A. Estruturas agrárias e capitalismo: contribuição para o estudo da ocupação do solo e da transformação do trabalho na zona da Mata mineira (Séculos XVIII e XIX). **Série Estudos**, n. 2, UFOP, Mariana, 1999.
- CHADWICK. D. R. Viral meningitis. **British Medical Bulletin.**, v. 75 e 76, p.1-14, 2005.
- CAMPANILI, M.; SCHÄFFER, W.B. Mata Atlântica: **Manual de Adequação Ambiental**. Brasília: MMA/SBF, p. 96, 2010.
- CERQUEIRA, A. D. C. Contribuição ao estudo dos Trypanosomas das aves. **These**. Rio. L. Malafaia Jr. 1906.
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Listas das aves do Brasil**. 11. ed. 2014. Disponível em: <http://www.cbro.org.br>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- DAVIS, A. K. *et al.* New Findings from an Old Pathogen: Intraerythrocytic Bacteria (Family Anaplasmatacea) in Red-Backed Salamanders *Plethodon cinereus*. **EcoHealth**, v. 6, p. 219–228, 2009.
- DANIELS, T. J.; BATTALY, G. R.; LIVERIS, D. *et al.* Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 1524–1525, 2002.
- DEL HOYO, J. *et al.* Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona, 2018. Disponível em: <http://www.hbw.com/>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- DEMAREE, R.S. J. R.; MARQUARDT, W.C. Avian trypanosome division: A light and electron microscope study. **Journal of Protozoology.**, v.18, p. 388-9, 1971.
- DONOVAN, T.A. *et al.* Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.**, v. 20, p. 304–313, 2008.

DUMLER, J. S. *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EIDSON, M. *et al.* Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. **Emerging Infectious Diseases journal.**, v. 7, n. 4, p. 615-620, 2001.

ELIKWO, M. N. F. *et al.* Effects of Deforestation on Avian Parasitic Co-infections in Recaptured Birds from an African Tropical Rainforest. **Nanotechnology & Applications.**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2020.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS). **Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vixax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos.** Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP, 1997. 17p. EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa.

ERICKSON, H. T.; MUMFORD, R. E. Notes on birds of the Viçosa, Brazil region. West Lafayette: Purdue University, 1976. 29 p. (**Station Bull. Purdue University**, 131).

FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. **Molecular Ecology.**, v. 4, p. 663–673, 1995.

FERQUEL, E. *et al.* Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of *Lyme borreliosis* endemicity in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 3074-3078, 2006.

FONSECA, G. A. B. The vanishing Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 34, p. 17-34, 1985.

FOSTER, M. S. Feeding methods and efficiencies of selected frugivorous birds. *Condor.*, v. 89, p.566–580, 1987.

FROMONT, E. Hematologie et parasites sanguins des rapaces. Étude chez des oiseaux en réhabilitation. École Nationale Vétérinaire de Lyon. [**These pour le doctorat vétérinaire**], 1993.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais.** In: MACHADO, A. B. M. *et al.* (Eds.) Belo Horizonte, 1998. 605 p.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Revisão das listas das espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais.** Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, v. 3. Relatório Final, 2007.

FUNDAÇÃO JOÃO PINHEIRO (FJP). **As regiões de Minas Gerais e sua Inserção no Planejamento Nacional.** Belo Horizonte: Centro de Estudos Econômicos, 152 p. 1995.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 95. p. 557-565, 2000.

GAUNT, M.W. *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, p. 936-939, 2003.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Veterinary Parasitology.**, v. 110, p. 171–180, 2003.

GILL, F.; DONSKER D. **IOC world bird list** (version 8.2), 2018.

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

GREINER, E.C. *et al.* Distribution of the avian hematozoa of North America. **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, p. 1762–1787, 1975.

GU W.; MILLER, S.; CHIU, C.Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. **Annual Review of Pathology.**, v.14, p.319–338, 2019.

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

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W.C.; STEVENS J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution.**, v. 44, n. 1, p.15-25, 2007.

HERNÁNDEZ, R. *et al.* Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v. 41, p.207-212, 1990.

HILL, D. S. A study of the distribution and host preferences of the three species of *Ornithomyia* (Diptera, Hippoboscidae) in the British Isles. **Proceedings of the Entomological Society of London.**, v. 37, p. 37–48, 1962.

HOLMES, J. C. Parasitism and threats to biodiversity in shrinking ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 975-983, 1996.

HOLMES, J. C.; PRICE, P. Communities of parasites. Community ecology: patterns and processes. *In:* Anderson D. J.; Kikkawa J. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, p. 187-213, 1986.

IBAMA. **Plano de Ação Emergencial para o Parque Nacional de Itatiaia**, Brasília, DF. 1994.

IBGE. **Divisão Regional do Brasil em Mesorregiões e Microrregiões Geográficas.** v. 1, Rio de Janeiro, 1990.

IBGE. **Atlas Geográfico Escolar**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

ICMBio. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Itatiaia**. 2013. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/pm_parna_itatiaia_enc3.pdf. Acesso em: 11 ago. 2019.

IBDF/FBCN. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Itatiaia**. Brasília: 1982. 207p.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES - IUCN. 2011. **Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 31 ago. 2019.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES - IUCN. 2016. **Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 23 out. 2019.

JUKES, T. H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. *In*: Munro. H. N. **Mammalian Protein Metabolism**, pp. 21-132, Academic Press, New York, 1969.

JOHNSTON, E. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* infection in American robins and gray catbirds: an assessment of reservoir competence and disease in captive wildlife. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n.1, p. 163–170, 2013.

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

KIM, C. M. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 9, p. 5766-7576, 2006.

KIRKPATRICK, M.; RYAN, M. J. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. **Nature**, v. 350, p. 33-38, 1991.

KIRKPATRICK, C. E.; TERWAY-THOMPSON, C.A.; IYENGAR, M. R. Biochemical characterization of some raptor trypanosomes. II. Enzyme studies, with a description of *Trypanosoma bennetti* n.sp. **Canadian Journal of Zoology**, v. 64, p.195–203, 1986.

KÖPPEN, W. Climatologia como un estudio de los climas de la tierra. **Fondo de Cultura Económica**, México, 1948.

KUCERA, J. Incidence and some ecological aspects of avian trypanosomes in Czechoslovakia. **Folia parasit.** (Praha) 30: 209-222. (1983).

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

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- LAFFERTY, K. D.; HOLT, R. D. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? **Ecology letters**, v. 6, p. 654-664, 2003.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; HUMPHREY, P. S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the Area de Pesquisas Ecológicas do Guamá, Belém, Pará, Brasil. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 197–198, 1970.
- LIMA, L. M. **Birds of the Atlantic Forest: richness, status, composition, endemism, and conservation**. Dissertation - Universidade de São Paulo, 2014.
- LOCKHART, J. M. *et al.* Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 1681-1686, 1997.
- LUCENA, D. T. Haemoparasitas de algumas aves de São Paulo. **Rev. Biol. Hig.**, v. 9, n. 2, p. 158-161, 1938.
- LUTZ, A.; MEYER, C. Hematozoários endoglobulares. **Rev. Med. S. Paulo**, v. 9, p. 3–16, 1908.
- MAA, T.C. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). **Pacific Insects Monographs**, v. 20, p. 261– 299, 1969.
- MACHADO, R. Z. *et al.* Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 262-266, 2006.
- MACHADO, R. Z. *et al.* Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 705-708, 2012.
- MACHADO, A. B. M. *et al.* **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 605p. 1998.
- MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Vol. II. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2008.
- MACFIE, J.W.S.; THOMSON, J.G. A trypanosome of the canary (*Serinus canaries* Koch). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 23, p. 185–191, 1929.
- MAIA-GOUVÊA, E. R.; GOUVÊA, E.; PIRATELLI, A. Comunidade de aves de sub-bosque em uma área de entorno do Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22, p. 859-866. 2005.
- MALDONADO-COELHO, M. **Efeitos da fragmentação florestal em bandos mistos de aves de Mata Atlântica, no sudeste de Minas Gerais**. 2000. 100 f. Dissertação (Mestrado

em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

MANHÃES, M. A.; LOURES-RIBEIRO, A. The avifauna of the Poço D'Anta Municipal Biological Reserve, Juiz de Fora, MG. **Biota Neotropical.**, v.11, n. 3, p. 275-285, 2011.

MARZAL, A. *et al.* Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, v. 142, p. 541–545, 2004.

MATTER, SANDRO VON *et al.* Ornitologia e Conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. **Technical Books**. Rio de Janeiro, 2010. 516 p.

MARINI, M.A.; GARCIA, F.I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 95–102, 2005.

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

MICHELS, P. A.; HANNAERT, V. The evolution of kinetoplastid glycosomes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 26, p. 213-219, 1994.

MONTEIRO, A. R.; MATTOS, G. T.; PONTES, J. L. Avifauna identificada e observada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Experientiae**, v. 29, n. 3, p. 31–47, 1983.

MONTEIRO, A. R.; MATTOS, G. T. Avifauna do Parque Florestal de Viçosa - Minas Gerais. **Experientiae**, v. 29, n. 5, p. 1-13, 1984.

MOLYNEUX, D. H. Animal reservoirs and Gambian trypanosomiasis. **Annales de la Societe Belge de Medecine Tropical**, v. 53, n.6, p. 605–618, 1973.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.

MUNGOMBA, L. M.; MOLYNEUX, D. H.; WALLBANKS, K. R. Host-parasite relationship of *Trypanosoma corvi* in *Ornithomyia avicularia*. **Parasitology Research**, v. 75, p. 167–174, 1989.

NAROSKY, T.; YZURIETA, D. Guia para la identificacion de las aves de Argentina y Uruguay. Vazquez Mazzini, Buenos Aires, 1993. 438p.

NOVELLI, R. **Aves marinhas costeiras do Brasil**: identificação e biologia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997.

OGDEN, N. H. *et al.* Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma Phagocytophilum*. Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1780–1790, mar. 2008.

OLMOS, F. Aves ameaçadas, prioridades e políticas de conservação no Brasil. **Natureza e Conservação**, v. 3, n. 1, p. 24–42, 2005.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.1, p. 37–64, 2003.

PATZ, J. A. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environ. Health Perspect.**, v. 112, p. 1092-1098, 2000.

PEREIRA, R. A. **Mapeamento e caracterização de fragmentos de vegetação arbórea e alocação de áreas preferenciais para sua interligação no município de Viçosa**, MG. 1999. 203 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

PESSOA, S. B. Novos hemoparasitas de aves do Brasil. **Ann. Fac.Med. Univ. S. Paulo**, v.11, n. 2, p. 3-5, 1935.

PETERSEN, F.T. *Ornithomya avicularia* (Linnaeus, 1758). 2018a. **Fauna Europaea version**, 2018. Disponível em: [https:// fauna-eu.org](https://fauna-eu.org). Acesso em: 4 dez. 2018.

PINTO, O. M. O. Cinquenta anos de investigação ornitológica: história das origens e do desenvolvimento da coleção ornitológica do Museu Paulista e de seu subsequente progresso no Departamento de Zoologia da Secretaria de Agricultura. **Arquivos de Zoologia**, 1945. Separata do Tomo IV.

PINTO, O. M. O. Súmula histórica e sistemática da Ornitologia de Minas Gerais. **Arquivos de Zoologia**, v. 8, n. 1, p. 1-51, 1952.

PLIMMER, H. G. On certain blood parasites. **Jour. R. Micro. Soc.**, v. 133, 1912.

PORNPANOM, P. *et al.* Morphological and molecular characterization of avian trypanosomes in raptors from Thailand. **Parasitology Research**, v.118, p. 2419–2429, 2019.

PRUETT-JONES, S.G.; PRUETT-JONES, M.A.; JONES, H. I. Parasites and sexual selection in birds of paradise. **American Zoologist.**, v. 30, p. 287-298, 1990.

RADWANSKA, M. *et al.* Salivarian Trypanosomosis: a Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. **Frontiers in immunology.**, v. 9, p. 2253, 2018.

RADAMBRASIL, Projeto. **Levantamento de Recursos Naturais**: Folha SF.23/24 Rio/Vitória. Rio de Janeiro: Projeto RADAMBRASIL, 780p 1983.

REULLIER, J. *et al.* Diversity, distribution, and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 753-763, 2006.

RIBEIRO, S. F. *et al.* Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261–267, 2005.

RIBON, R. **Fatores que influenciam a distribuição da avifauna em fragmentos de Mata Atlântica nas montanhas de Minas Gerais**. 1998. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

RIBON, R. **Aves em fragmentos de Mata Atlântica: incidência, abundância e associação à topografia**. 2003. 128 f. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

RIBON, R.; LAMAS, I. R.; GOMES, H. B. Avifauna da Zona da Mata de Minas Gerais: municípios de Goianá e Rio Novo, com alguns registros para Coronel Pacheco e Juiz de Fora. **Revista Arvore**, v. 28, n. 2, p. 291-305, 2004.

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

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

RIZZOLI, A. *et al.* *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p. 119-122, 2004.

RYMASZEWSKA, A.; ADAMSKA, M. Participation of *Ixodes ricinus* developmental stages in transmission of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. **Wiad. Parazytol.**, v. 50, n. 3, p. 563-569, 2004.

RODRIGUES, M. Técnicas de captura e anilhamento de aves como ferramenta para o monitoramento de unidades de conservação. *In: 1º Curso de Monitoramento e Manejo de Fauna em Unidades de Conservação*. Ubatuba, UNESP, p. 96-127, 2002.

SACCHI, A. B.V. *et al.* Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, p. 325–334, 2012.

SACCHI, A. B. V. **Diagnóstico sorológico e molecular de agentes transmitidos por artrópodes em aves carnívoras**. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

SANTOS, N. G. *et al.* Pesquisa de hemoprotozoários em aves de rapina (ordens Falconiformes e Strigiformes) em centros de recuperação em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.103, n. 567-568, p.195-200, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHAFFER, C. **Relatório integrado do meio físico e zoneamento ambiental:** geologia, solos, geomorfologia e espeleologia do Parque Estadual do Ibitipoca – MG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 105 p. Relatório.

SCHOENER, E. *et al.* Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. **Plos one**, v. 13, n. 4, 2018.

SCOTT, M. E. The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. **Conservation Biology**. v. 2, p. 40-56, 1988.

SEBAIO, F. *et al.* Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds, effects of fragment size and habitat dependency. **Bird Conservation International**, v. 20, n. 4, p. 432–439, 2010.

SEBAIO, F. *et al.* Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 7–15, 2012.

SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T.B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2319-2327, 2001.

SEHGAL, H. I.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: A molecular approach. **Molecular Ecology**, v.10, p. 2319–2327, 2001.

SEHGAL, R. N. M. *et al.* Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum*. **Journal Parasitology**, v. 92, p. 1336–1343, 2006.

SEHGAL, R. N. M. *et al.* Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest birds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 278, p. 1025–1033, 2011.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira:** the avis brasiliensis field guide to the birds of Brazil. São Paulo: Editora Avis Brasilis, 2009.

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

SILVEIRA, J. A.; RABELO, E. M.; RIBEIRO, M. F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 4, p.353-360, 2012.

SIMON, J. E.; PACHECO, S. Nidificação de *Synallaxis cinerascens* Temminck 1823 (Aves, Furnariidae) no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, n. 3, p. 585-590, 1996.

SIMON, J. E.; LAMAS, I. R; GOMES, H.B. A avifauna do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 23, n. 1, p. 33–48, 1999.

- SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.
- SKARPHÉDINSSON, S.; JENSEN, P. M.; KRISTIANSEN, K. Survey of tickborne infections in Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n. 7, p. 1055-1061, 2005.
- SOUSA, G.; FERNANDES, M.C E.; COSTA, G. A. Classificação da susceptibilidade a ocorrência de incêndios através de mineração de dados e GEOBIA. **Revista Brasileira de Cartografia**, n. 67/3, p. 555-567, 2015.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.
- STEVENS, J. R. *et al.* The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 1–56, 2001.
- SPLENDORE, A. *Trypanosoma* di ucelletti e di pesei brasiliani». **Rev. Soc. Scient.**, S. Paulo, v. 5, p. 6–13, 1910.
- STRAUBE, F. C.; BIANCONI, G.V. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. **Chiroptera Neotropical**, v. 8, n. 1-2, p. 150-152, 2002.
- SVOBODOVÁ, M.; VOTÝPKA, J. Occurrence of blood protists in raptors (Falconiformes). **Buteo**, v. 10, p. 51–54. (In Czech.) 1998.
- TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, n. 4, p. 564–577, 2007.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.
- TAŞÇI, G.T. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Trypanosoma* spp. in domestic geese (*Anser anser domesticus*) from the North-East Anatolia Region of Turkey. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisiv.**, v. 24, n. 4, p. 539–543, 2018.
- TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 47–115. 1995.
- TOMZHINSKI, G.W. **Análise Geocológica dos Incêndios Florestais no Parque Nacional do Itatiaia**. 2012. 137f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Geografia – PPGG/UFRJ, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – UFJF. **Plano de Manejo da Reserva Biológica Municipal Poço D’Anta**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

VÁCLAV, R. *et al.* Associations between coinfection prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in hard ticks feeding on reptile hosts. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 245–253, 2011.

VALKIŪNAS, G. Avian malarial parasites and other haemosporidia. EUA: CRC Press. *In*: VOTÝPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, v. 125, p. 253-263, 2005.

VALKIŪNAS, G. *et al.* Two New *Trypanosoma* Species from African Birds, with Notes on the Taxonomy of Avian Trypanosomes. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 924–930, 2011.

VALKIŪNAS, G. *et al.* Further observations on the blood parasites of birds in Uganda. **Journal of wildlife diseases**, v. 41, p. 580–587. 2005.

VALVERDE, O. **Estudo regional da Zona da Mata, de Minas Gerais**. Revista Brasileira de Geografia, v. 20, n. 1, p. 3-82, 1958.

VAN RIPER, S.G. *et al.* The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaii land birds. **Ecology Monographs**, v. 56, p. 327–344, 1986.

VELOSO, H. P. Sistema fitogeográfico. *In*: H.P. VELOSO (org.). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, pp. 9–38, 1992.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. São Paulo: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 1991.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. *In*: Lumsden W.H.R.; Evans D.A. Biology of the Kinetoplastida. **Academic, London New York San Francisco.**, pp. 1-34, 1976.

VOTÝPKA, J. *et al.* *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology.**, v. 125, p. 253–263, 2002.

VOTÝPKA J.; LUKEŠ J.; OBORNÍK M. Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. **Acta Protozoologica.**, v. 43, p. 225–231, 2004.

VOTÝPKA J.; SVOBODOVÁ, M. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. **Parasitology Research.**, v. 92, p. 147–151, 2004.

WALLACE, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology.**, v. 18, p.124-193, 1966.

- WALLACE, F. G. *et al.* Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology.**, v. 30, p. 308–31, 1983.
- WALDENSTRÖM, J. *et al.* Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. **Molecular Ecology.**, v.11, p. 1545-1554, 2002.
- WALKER, D. H.; DUMLER, J. S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases.**, Atlanta, v. 2, n.1, p.18–29, 1996.
- WEATHERHEAD, P. J.; BENNETT, G. F. Ecology of red-winged blackbird parasitism by haematozoa. **Canadian journal of zoology.**, v. 69, p. 2352-2359, 1991.
- 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.
- WEN, B.; CAO, W; PAN, H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 990, p. 45–53, 2003.
- WIKIAVES. **WikiAves - A Enciclopédia das Aves do Brasil**, 2019. Disponível em: https://www.wikiaves.com.br/wiki/areas:pn_itatiaia:inicio. Acesso em: 17 set. 2019.
- WOO, P. T. K.; BARTLETT, C. *Trypanosoma ontarioensis* n.sp. and *T. paddae* from *Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* in Ontario, Canada, with notes on the biology of *T. ontarioensis* n.sp. **Can J Zool.**, v. 60, p. 2107-2115, 1982.
- YOUNG, B. E.; GARVIN, M. C.; MCDONALD, D. B. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Wild Diseases.**, v. 29, p.555-560, 1993.
- YU, X.; MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3–4, p. 337-346, 2006.
- ZÍDKOVÁ L. *et al.* Biodiversity of avian trypanosomes. **Infection Genetics and Evolution.** v.12, p.102–112, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - CEUA (IV/UFRRJ N° 6121130617)



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Hemoparasitas e Ectoparasitas de aves silvestres na Floresta Tropical Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Aspectos ecológicos, parasitológicos e moleculares", protocolada sob o CEUA nº 6121130617, sob a responsabilidade de **Huarrisson Azevedo Santos e equipe; Rodrigo Grendilha Duarte** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 14/06/2017.

We certify that the proposal "Hemoparasites and ectoparasites of wild birds in the Atlantic Rain Forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil: Ecological, parasitological and molecular aspects", utilizing 400 Birds (males and females), protocol number CEUA 6121130617, under the responsibility of **Huarrisson Azevedo Santos and team; Rodrigo Grendilha Duarte** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 06/14/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **12/2019**

Área: **Microbiologia E Imunologia Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 5 anos** N: **400** Linhagem: **Não se aplica** Peso: **200 a 500 g**

Resumo: As aves silvestres se destacam como o grupo de vertebrados com o maior número de espécies da Floresta Atlântica, característica que somada a sua alta sensibilidade a alterações ambientais faz com que elas também ocupem o lugar dos vertebrados com o maior número de espécies ameaçadas do bioma. Além disso, 75% das espécies de aves ameaçadas e endêmicas do Brasil encontram-se neste bioma. O estado do Rio de Janeiro abriga cerca de 700 espécies de aves. O impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações na abundância relativa, na estrutura de comunidade, na dispersão e na diversidade genética, e, também na dinâmica populacional do hospedeiro. Ainda se sabe pouco sobre a transmissão sazonal de hemoparasitos em regiões tropicais e subtropicais onde vetores permanecem ativos o ano todo.

Local do experimento: A coleta das amostras serão realizadas nos parques: a) Parque Nacional do Itatiaia ☒ Itatiaia-RJ; b) Parque Estadual da Pedra Selada ☒ Vila de Visconde de Mauá-RJ; c) Reserva Particular do Patrimônio Natural Estela ☒ Paracambi-RJ; As análises parasitológicas e moleculares serão realizadas no Laboratório de Sanidade Avícola do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ.

Seropédica, 05 de julho de 2017

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

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



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



Seropédica, 13 de junho de 2017

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Huarrisson Azevedo Santos**, CPF 983.833.295-04, responsável pelo projeto intitulado: "Hemoparasitas e Ectoparasitas de aves silvestres na Floresta Tropical Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Aspectos ecológicos, parasitológicos e moleculares", declaro que:

- a) li o disposto na Lei n 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Executor: RODRIGO GRENDILHA DUARTE

Assinatura:  Data: 13/06/2017

Responsável: Huarrisson Azevedo Santos

Assinatura:  Data: 13/06/2017

Huarrisson Azevedo Santos
Prof Adjunto DESP/IV/UFRRJ
SIAPE : 3701492

ANEXO B - Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO Números 55195-1 e 55195-2 (Renovação). Ministério do Meio Ambiente, Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade – ICMBio



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: 55195-1	Data da Emissão: 09/09/2016 09:39	Data para Revalidação*: 09/10/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RODRIGO GREDILHA DUARTE	CPF: 078.022.547-36
Título do Projeto: Hemoparasitos de aves Silvestre na Floresta Tropical Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Aspectos ecológicos, parasitológicos e moleculares	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05



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: 55195-2	Data da Emissão: 08/10/2017 20:50	Data para Revalidação*: 07/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RODRIGO GREDILHA DUARTE	CPF: 078.022.547-36
Título do Projeto: Hemoparasitos de aves Silvestre na Floresta Tropical Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Aspectos ecológicos, parasitológicos e moleculares	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

ANEXO C - Cadastro Técnico Federal no Ibama – CTF/AIDA. Comprovante de Inscrição



Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
**CADASTRO TÉCNICO FEDERAL DE ATIVIDADES E
INSTRUMENTOS DE DEFESA AMBIENTAL**



COMPROVANTE DE INSCRIÇÃO

Data de última atualização:	26/01/2017	Data de validade:	22/11/2021
CPF: 078.022.547-36			
NOME: RODRIGO GREDILHA DUARTE			
LOGRADOURO: RUA VISCONDE DE ABAETÉ, N°4 APT.401			
N.º: 4	COMPLEMENTO: 401		
MUNICÍPIO: RIO DE JANEIRO		UF: RIO DE JANEIRO	

Ocupações e áreas de atividades declaradas:

Médico Veterinário

Atuar na preservação ambiental

09/09/2009

Médico Veterinário

Elaborar laudos, pareceres e atestados

10/01/2014

TERMOS DA INSCRIÇÃO NO CTF/AIDA

A inscrição no Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental – CTF/AIDA constitui declaração, pe pessoa física, do cumprimento de exigências específicas de qualificação ou de limites de atuação que porventura sejam determinad pelo respectivo Conselho de Fiscalização Profissional.

A inscrição no CTF/AIDA não desobriga a pessoa física da obtenção de:

- i) licenças, autorizações, permissões, concessões, ou alvarás;
- ii) documentos de responsabilidade técnica, qualquer o tipo e conforme regulamentação do respectivo Conselho de Fiscalização Profissional;
- iii) demais documentos exigíveis por órgãos e entidades federais, distritais, estaduais e municipais para o exercício de suas atividades; e
- iv) do Comprovante de Inscrição e do Certificado de Regularidade emitidos pelo Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais - CTF/APP, quando esses também forem exigíveis.

O Comprovante de Inscrição no CTF/AIDA não produz qualquer efeito quanto à qualificação e à habilitação técnica da pessoa física inscrita.

**ANEXO D - Cadastro Técnico Federal no Ibama – CTF/AINDA. Certificado de Regularidade
com vencimento em 29/08/2020**



Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CADASTRO TÉCNICO FEDERAL
CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR



Registro n.º	Data da consulta:	CR emitido em:	CR válido até:
4204183	29/05/2020	29/05/2020	29/08/2020

Dados básicos:

CPF: 078.022.547-36
Nome: RODRIGO GREDILHA DUARTE

Endereço:

logradouro: RUA VISCONDE DE ABAETÉ, N°4 APT.401
N.º: 4 Complemento: 401
Bairro: VILA ISABEL Município: RIO DE JANEIRO
CEP: 20551-080 UF: RJ

**Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras
e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP**

Código	Descrição
21-27	Porte e uso de motosserra - Lei nº 12.651/2010: art. 69, § 1º

Conforme dados disponíveis na presente data, CERTIFICA-SE que a pessoa física está em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.

O Certificado de Regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.

O Certificado de Regularidade emitido pelo CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.

Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental – CTF/AIDA

Código CBO	Ocupação	Área de Atividade
2233-05	Médico Veterinário	Atuar na preservação ambiental
2233-05	Médico Veterinário	Elaborar laudos, pareceres e atestados

ANEXO E - Espécies, origem geográfica dos tripanosomas empregados na análise de sequências gênicas do gene 18S rDNA

Espécies	Hospedeiro	Nº acesso no GenBank do gene 18S rDNA	Origem Geográfica
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Fringilla coelebs</i> (Linnaeus,1758)	JN006827	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ornithomyia avicularia</i> (Linnaeus,1758)	JN006824	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Buteo buteo</i> (Linnaeus,1758)	JN006825	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Fringilla coelebs</i> (Linnaeus,1758)	JN006826	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Buteo buteo</i> (Linnaeus,1758)	JN006828	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Accipiter gentilis</i> (Linnaeus,1758)	JN006829	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus,1758)	JN006830	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phylloscopus collybita</i> (Vieillot, 1817)	JN006831	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phylloscopus collybita</i> (Vieillot, 1817)	JN006832	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phylloscopus collybita</i> (Vieillot, 1817)	JN006833	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Culex pipiens</i> (Vieillot, 1817)	JN006834	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006835	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phylloscopus collybita</i> (Vieillot, 1817)	JN006836	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sitta europaea</i>	JN006837	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	JN006838	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006840	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006841	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006842	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006843	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ornithomyia avicularia</i> (Linnaeus,1758)	JN006844	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sylvia atricapilla</i>	JN006845	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Parus caeruleus</i> (Linnaeus, 1758)	JN006846	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Turdus</i> sp.	JN006847	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	JN006848	República Tcheca

Continua

ANEXO E - Espécies, origem geográfica dos tripanosomas empregados na análise de sequências gênicas do gene 18S rDNA

Espécies	Hospedeiro	Nº acesso no GenBank do gene 18S rDNA	Origem Geográfica
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Accipiter nisus</i> (Sharpe, 1890)	JN006849	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Emberiza citrinella</i> (Linnaeus, 1758)	JN006850	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Emberiza citrinella</i> (Linnaeus, 1758)	JN006851	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Ficedula albicollis</i> (Linnaeus, 1758)	JN006852	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phylloscopus sibilatrix</i> (Bechstein, 1793)	JN006853	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Buteo buteo</i> (Linnaeus, 1758)	JN006854	República Tcheca
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Wallabia bicolor</i> (Desmarest, 1804)	AJ620564	-
<i>Trypanosoma</i> sp.	-	AJ223570	-
<i>Trypanosoma theileri</i>	-	AJ009163	-
<i>Trypanosoma vespertilionis</i>	-	AJ009166	-
<i>Trypanosoma conorhini</i>	-	AJ012411	-
<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	AJ009149	-
<i>Trypanosoma dionisii</i>	-	AJ009151	-
<i>Trypanosoma</i> sp.	-	AJ009168	-
<i>Trypanosoma microti</i>	-	AJ009158	-
<i>Trypanosoma musculi</i>	-	AJ223568	-
<i>Trypanosoma lewisi</i>	-	AJ223566	-
<i>Trypanosoma granulorum</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	AJ620552	Portugal
<i>Trypanosoma therezieni</i>	-	AJ223571	-
<i>Trypanosoma mega</i>	-	AJ009157	Canadá
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	-	AJ009161	Canadá
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Strepera</i> sp.	AJ620557	-
<i>Trypanosoma pestanai</i>	-	AJ009159	França
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Vombatus ursinus</i> (Shaw, 1800)	AJ620558	Austrália
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Vombatus ursinus</i> (Shaw, 1800)	AJ620559	Austrália
<i>Trypanosoma varani</i>	-	AJ005279	-
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	-	AJ223564	-
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	-	AJ223541	-
<i>Trypanosoma godfreyi</i>	-	AJ009155	-
<i>Trypanosoma avium</i>	-	AJ009140	-
<i>Trypanosoma congolense</i>	-	AJ009146	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	AJ009160	França
<i>Trypanosoma</i> sp.	-	AJ009169	-

Continua

ANEXO E - Espécies, origem geográfica dos tripanosomas empregados na análise de sequências gênicas do gene 18S rDNA

Espécies	Hospedeiro	Nº acesso no GenBank do gene 18S rDNA	Origem Geográfica
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Eusimulium securiforme</i> (Rubzov, 1958)	AF416563	República Tcheca
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Aquila pomarina</i> (Brehm, 1831)	AF416559	Eslováquia
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Ornithomyia avicularia</i> (Linnaeus, 1758)	AF416562	República Tcheca
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	AF416561	França
<i>Trypanosoma grosi</i>	<i>Apodemus speciosus</i> (Temminck, 1844)	AB175624	Japão
<i>Trypanosoma lewisi</i>	<i>Bandicota indica</i> (Bechstein, 1800)	AB242273	Indonésia
<i>Trypanosoma minasense</i>	<i>Saguinus midas</i> (Linnaeus, 1758)	AB362411	Japão
<i>Trypanosoma otospermophili</i>	<i>Spermophilus columbianus</i> (Merriam e Stejneger, 1891)	AB190228	Japão
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Falco tinnunculus</i> (Linnaeus, 1758)	AY099319	República Tcheca
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Buteo buteo</i> (Linnaeus, 1758)	AY099320	República Tcheca
<i>Trypanosoma corvi</i>	<i>Corvus frugilegus</i> (Linnaeus, 1758)	AY461665	Reino Unido
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Glossina</i> sp.	AM503350	Tanzânia
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Corvus frugilegus</i> (Linnaeus, 1758)	U39578	-
<i>Trypanosoma scelopori</i>		U67182	República Tcheca
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Phascolarctos cinereus</i> (Goldfuss, 1817)	FJ649481	Austrália
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Phascolarctos cinereus</i> (Goldfuss, 1817)	FJ649482	Austrália
<i>Trypanosoma avium</i>	<i>Phascolarctos cinereus</i> (Goldfuss, 1817)	FJ649483	Austrália
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Phascolarctos cinereus</i> (Goldfuss, 1817)	FJ649484	Austrália
<i>Trypanosoma bennetti</i>	<i>Aquila pomarina</i> (Brehm, 1831)	JF778738	Eslováquia
<i>Trypanosoma bennetti</i>	-	AJ223562	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	-	D89527	Japão
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	HQ107968	República Tcheca
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex molestus</i>	HQ909084	República Tcheca
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	HQ107966	República Tcheca
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)	HQ107969	República Tcheca

Continua

ANEXO E - Espécies, origem geográfica dos tripanosomas empregados na análise de sequências gênicas do gene 18S rDNA

Espécies	Hospedeiro	Nº acesso no GenBank do gene 18S rDNA	Origem Geográfica
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	HQ107967	República Tcheca
<i>Trypanosoma culicavium</i>	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	HQ107970	República Tcheca
<i>Wallacemonas collosoma</i>	<i>Gerris</i> sp	AF153038	Rússia
<i>Trypanosoma binneyi</i>	-	AJ132351	-
<i>Trypanosoma siniperca</i>	-	DQ494415	China
<i>Trypanosoma cyclops</i>	-	AJ131958	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	<i>Glossina p. gambiensis</i> (Vanderplank, 1911)	AJ620546	-
<i>Trypanosoma triglae</i>	<i>Trigla lineata</i> (Gmelin, 1789)	U39584	-
<i>Trypanosoma boissoni</i>	<i>Zanobatus atlanticus</i> (Chabanaud, 1928)	U39580	-