

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Luiz Gustavo Magalhães Alves

**DISTRIBUIÇÃO ANUAL E RIQUEZA DE HEMOPARASITOS AVIÁRIOS EM UMA
ÁREA DE TRANSIÇÃO DE MATA ATLÂNTICA E CERRADO NO ESTADO DE
MINAS GERAIS, BRASIL**

Belo Horizonte

2024

LUIZ GUSTAVO MAGALHÃES ALVES

**DISTRIBUIÇÃO ANUAL E RIQUEZA DE HEMOPARASITOS AVIÁRIOS EM UMA
ÁREA DE TRANSIÇÃO DE MATA ATLÂNTICA E CERRADO NO ESTADO DE
MINAS GERAIS, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a. Érika Martins Braga

Belo Horizonte

2024

043 Alves, Luiz Gustavo Magalhães.

Distribuição anual e riqueza de hemoparasitos aviários em uma área de transição de Mata Atlântica e Cerrado no estado de Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Luiz Gustavo Magalhães Alves. – 2024.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Érika Martins Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Aves. 3. Parasitos. 4. Plasmodium. 5. Taxonomia. 6. Biodiversidade. 7. Interações Hospedeiro-Parasita. I. Braga, Érika Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO
DISSERTAÇÃO 463/2024/01

**TÍTULO: "Distribuição Anual e Riqueza de Hemoparasitos
Aviários em Uma Área de Transição de Mata Atlântica e Cerrado
no Estado de Minas Gerais, Brasil"**

ALUNO: LUIZ GUSTAVO MAGALHÃES ALVES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e um de março de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas

Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Felipe Bisaggio Pereira

UFMG

Weslen Fabricio Pires Teixeira

UFMG

Érika Martins Braga -

Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 21 de março de 2024.



Professora do Magistério Superior, em 12/04/2024, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Erika Martins Braga**,



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Bisaggio Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 15/04/2024, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3081424** e o código CRC **B594DD4E**.

AGRADECIMENTOS

À Deus e às entidades, pelo caminho que construímos durante minha jornada até este momento. No percurso acadêmico e pessoal tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis que participaram na formação de quem sou hoje.

À minha orientadora, Érika Martins Braga, pelo acolhimento e por aceitar fazer parte da minha formação. Pesquisadora cuja empolgação muitas vezes me brilhou os olhos, com quem aprendi que fazer ciência no Brasil não é fácil, mas também não é impossível; sempre com palavras incentivadoras dizendo “confie mais em nosso trabalho e nos dados que você produziu”. Deixo aqui registrado minha profunda admiração, respeito e carinho pela pesquisadora, mãe e mulher que é; carrego com ternura as lembranças de nossa viagem a Paris.

À Dr^a. Coralie Martin, e toda sua equipe do Museu de História Natural de Paris e CAPES cofecub, pela oportunidade que tive de estagiar no museu e o suporte financeiro e intelectual oferecido para desenvolver parte desta pesquisa. Foi uma experiência enriquecedora para meus conhecimentos acerca dos filarídeos aviários, mas também um momento de crescimento pessoal. Agradeço à Dr^a. Irene Landou, para mim foi um privilégio compartilhar o microscópio com você e aprender mais sobre os hemosporídeos de aves e répteis que tanto nos fascinam.

Ao Professor Leonardo Lopes, que viabilizou as coletas na UFV-Florestal e nos deu suporte para a captura e identificação de aves, assim como nos abrigou nos períodos de campo. À Professora Patrícia Abreu, da UFOP, por ser uma grande parceira do grupo de pesquisa e sempre disposta a ajudar quando necessário. À Professora Daniella Bartholomeu e Dr^a. Vanessa Gomes, com quem pude compartilhar o espaço de trabalho e aprender diariamente.

Aos meus colegas e amigos com quem convivi no Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos, com vocês pude conversar, aprender, desabafar e festejar. Vitor e Regiane foram fundamentais para que eu pudesse aprender tudo que sei sobre os campos para captura de aves; além disso, Regiane, sou muito grato por toda sua ajuda e paciência com as análises de GLMM. Aos alunos de iniciação científica, Pedro e Vitória, sou extremamente grato por sua disposição em me acompanhar nos campos e participarem da minha formação, torço muito por vocês. Aline e Gustavo, obrigado pelo companheirismo, amizade, surtos e inseguranças acadêmicas que compartilhamos nesse período, não imagino como seriam meus dias sem vocês.

Ao Francisco, carinhosamente conhecido como Chiquinho, por todo aprendizado durante minha iniciação científica no antigo Laboratório de Malária.

À minha turma de mestrado, em especial e com imenso carinho, agradeço ao outro quartil com quem compartilhei vários momentos maravilhosos durante a imersão no caos das disciplinas e Januária, meus amigos Aline, Carol, Gabriela, Marcela e João.

À Talita, que surgiu na minha vida sem prometer nada, mas entregou uma amizade maravilhosa, com quem posso contar para desabafos pessoais e para me ajudar a responder dúvidas relacionadas a biologia molecular.

À Pós-graduação em Parasitologia, docentes, discentes, Sumara e Sibebe, agradeço por participarem dessa formação magnífica que pude ter enquanto mestrando do programa. À CAPES sou grato pelo suporte financeiro concedido durante esse percurso acadêmico.

Aos meus amigos da graduação, Bárbara, Marcelo e Raquel, que me incentivaram a seguir esse caminho antes e durante o mestrado, permitindo que eu alcançasse mais este sonho. À Dávila, minha amiga que mesmo a distância sempre se fez presente, com risadas durante choros nos passeios por Ouro Preto. Às minhas amarguradas preferidas, Elisa, Thaís e Letícia, agradeço pelo apoio, paciência, carinho e todos os momentos maravilhosos que vivemos. Todos foram parte de uma rede de apoio incrível durante a pandemia e me deram as mãos durante cada passo que dei durante o mestrado. Deixo aqui registrado para as amarguradas todo o carinho que sinto por vocês e que eu sempre levarei o antepasto para casa.

À minha família eu agradeço por todo o apoio durante minha vida, sem vocês eu não seria a metade de quem sou. Mãe, Pai e irmão, a minha trajetória só foi possível com o apoio de vocês, a base familiar que construímos me deu segurança e conforto.

Registro aqui meu grande agradecimento ao ensino público brasileiro que, nos seus piores e melhores momentos, contou com profissionais capacitados que participaram da minha formação enquanto homem, preto, gay, periférico e pesquisador.

RESUMO

Hemosporídeos e filarídeos são hemoparasitos transmitidos por dípteros e outros artrópodes hematófagos que comumente são detectados em aves silvestres. A infecção por esses parasitos pode acarretar alterações no fitness e sobrevivência de seus hospedeiros, desencadeando a redução de suas populações e levando à extinção de espécies. O estudo da dinâmica hemoparasito-ave em diferentes biomas e fitofisionomias permite determinar os diversos fatores ecológicos, evolutivos e biológicos associados à transmissão de patógenos disseminados por vetores, gerando informações para o entendimento de padrões de emergência e reemergência de doenças em todo mundo. O presente estudo investigou a ocorrência de hemoparasitos aviários e os fatores que estruturam a distribuição destes parasitos em uma área de transição entre a Mata Atlântica e Cerrado no município de Florestal, Minas Gerais. As aves foram amostradas durante 12 meses consecutivos (entre novembro de 2021 e outubro de 2022). No momento da captura, os animais foram identificados, anilhados e avaliados em relação ao sexo, presença de placa de incubação, muda e ectoparasitos. O sangue foi coletado para confecção de esfregaços sanguíneos, diagnóstico molecular e sequenciamento de hemoparasitos (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, filarídeos). A associação entre a análise morfológica e testes moleculares revelou que dentre 452 aves, 64 (14%) apresentaram-se positivas para hemosporídeos (*Plasmodium* e/ou *Haemoproteus*) e de 334 avaliadas para filarídeos, foi possível confirmar a infecção em 19 (5,6%). Os dados morfológicos e moleculares permitiram validar um novo protocolo para o diagnóstico molecular de panfilarídeos aviários, a partir da amplificação de um fragmento do gene 28S. Seis aves desta coorte apresentaram coinfeção por hemosporídeos e filarídeos, mas pouco se sabe acerca dos impactos dessa relação entre parasitos e seus hospedeiros. A partir de uma abordagem taxonômica integrativa, identificou-se a ocorrência de um oncocercídeo da espécie *Aproctella alessandroi* e cinco espécies de hemosporídeos - *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus*, *H. (H) coatneyi*, *Plasmodium cathemerium*, *P. juxtannucleare* e *Plasmodium* n. sp. Além disso, foi desenvolvido um modelo linear generalizado misto (GLMM) para avaliar a influência dos fatores ambientais (pluviosidade, temperatura e estação) e individuais (idade, presença de placa de incubação, ectoparasitos e muda) na distribuição de hemosporídeos. A ocorrência de muda e presença de placa de incubação foram as únicas variáveis correlacionadas à infecção. Estes dados demonstram a importância da taxonomia integrativa para a identificação de novas linhagens e espécies de hemoparasitos, ampliando os conhecimentos da biodiversidade, história evolutiva, e dos mecanismos determinantes das relações parasitos-aves silvestres.

Palavras-chave: Hemoparasitos aviários. Onchocercidae. *Plasmodium*. *Haemoproteus*. Taxonomia integrativa. Biodiversidade.

ABSTRACT

Haemosporidian and filarioid nematodes are hemoparasites transmitted by dipterans and hematophagous arthropods, commonly detected in wild birds. Infection by these parasites can result in alterations in the fitness and survival of their hosts, triggering the reduction of their populations and leading to species extinction. The study of host-parasite dynamics in different biomes and phytophysiognomies has allowed for the determination of several ecological, evolutionary, and biological factors associated with vector-borne pathogen transmission, thus providing insight into the emergence and reemergence of diseases. We aimed to identify the elements that structure the avian hemoparasite community and its influence on the bird population in a transition area between the Atlantic Forest and Cerrado in the municipality of Florestal, Minas Gerais. Birds were captured between November 2021 and October 2022, and a blood sample was collected from the brachial vein puncture for preparing blood smears and PCR/sequencing diagnosis. These animals were identified, ringed, and evaluated concerning sex, reproduction period, moulting, and ectoparasites. Morphological and molecular evaluation revealed that out of 452 birds, 64 (14%) tested positive for haemosporidian (*Plasmodium/Haemoproteus*), and out of 334 evaluated for filarioid nematoda, infection was confirmed in 19 (5.6%). Morphological and molecular data allowed the validation of a new protocol for the molecular diagnosis of avian filarioid, based on the amplification of a fragment of the 28S gene. Six birds from this cohort showed co-infection by haemosporidian and onchocercids, but little is known about the impacts of the presence of both parasites on their hosts. Based on integrative taxonomy we found an onchocercid species, *Aproctella alessandroi*, and five haemosporidian - *Haemoproteus (Haemoproteus) paramultipigmentatus*, *H. (H) coatneyi*, *Plasmodium cathemerium*, *P. juxtannucleare*, and *Plasmodium* ns. sp. Fitting a generalized linear mixed model (GLMM) we found that the reproduction period and moulting were the only variables correlated with haemosporidian infection. These data demonstrate the importance of integrative taxonomy for identifying new lineages and species of hemoparasites, expanding knowledge of biodiversity, evolutionary history, and the determinants of parasite-avian host systems.

Key words: Avian hemoparasites. Onchocercidae. *Plasmodium*. *Haemoproteus*. Integrative taxonomy. Biodiversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa da distribuição e riqueza de aves no mundo.	20
Figura 2 - Ciclo geral de hemosporídeos aviários.	22
Figura 3 - Ciclo de filarídeos da família Onchocercidae.....	26
Figura 4 - Mapa do Brasil e de Minas Gerais indicando a cidade de Florestal.....	31
Figura 5 – Aves capturadas em rede de neblina	33
Figura 6 – Coleta de sangue das aves capturadas.....	35
Figura 7 - Distribuição de espécies de aves por guildas alimentares	46
Figura 8 – Formas sanguíneas de <i>Haemoproteus (H) coatneyi</i>	49
Figura 9 - Formas sanguíneas de <i>Haemoproteus (H) paramultipigmentatus</i>	50
Figura 10 - Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de <i>Haemoproteus</i> spp.	51
Figura 11 - Formas sanguíneas de <i>Plasmodium cathemerium</i>	53
Figura 12 - Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de <i>Plasmodium</i> spp.....	54
Figura 13 - Formas sanguíneas de <i>Plasmodium</i> ns. sp em <i>Pyriglena leucoptera</i>	55
Figura 14 - Microscopia óptica evidenciando um espécime de <i>Aproctella alessondroi</i>	60
Figura 15 - Filogenia de Onchocercidae	61
Figura 16 - Esfregaço sanguíneo de um espécime de <i>Volatinia jacarina</i> indicando coinfeção por hemosporídeos.....	63
Gráfico 1 - Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo em Florestal, Minas Gerais, Brasil.....	32
Gráfico 2 - Distribuição de indivíduos capturados de acordo com a família da ave hospedeira.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Iniciadores para diagnóstico de <i>Haemoproteus</i> spp e/ou <i>Plasmodium</i> spp., segundo o protocolo descrito por Fallon et al., (2003).	37
Quadro 2 - Iniciadores para caracterização genética de <i>Haemoproteus</i> spp e <i>Plasmodium</i> spp. De acordo com Hellgren et al., (2004) e Bensch et al., (2000).	38
Quadro 3 – Novos iniciadores para o diagnóstico de filarídeos.....	40
Quadro 4 – Iniciadores utilizados para caracterização genética dos genes 12S, CoxI e 18S de oncocercídeos segundo Casiraghi et al., (2001) e Lefoulon et al., (2015).	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características taxonômicas que diferenciam os gêneros de hemosporídeos aviários	22
Tabela 2 - Número de indivíduos diagnosticados positivos para hemosporídeos.....	47
Tabela 3 - Linhagens e espécies de hemosporídeos de acordo com a família e espécie de aves hospedeiras.	48
Tabela 4 - Dados morfométricos de <i>Plasmodium</i> ns. sp. infectando <i>Pyriglena leucoptera</i> . Foram mensurados: comprimento, largura e área dos gametócitos, esquizontes e trofozoítos, assim como a área das hemácias infectadas e seu núcleo. Além disso, foram registradas as medidas de hemácias não infectadas (n=15). O número total de cada forma de desenvolvimento analisada está indicado na própria tabela	56
Tabela 5 - Dados morfométricos de <i>Plasmodium rouxi</i> , descrito por Sergent e colaboradores (1928) e concatenados por Laird (1962) e Valkiūnas (2005).....	57
Tabela 6 - Número de indivíduos diagnosticados positivos para filarídeos.	58
Tabela 7 - Linhagens de filarídeos pertencentes ao gênero <i>Aproctella</i> de acordo com a família e espécie de ave hospedeira, obtidas a partir da amplificação dos genes 12S e COXI.	59
Tabela 8 - Animais coinfectados por hemosporídeos e filarídeos de acordo com a associação entre os métodos moleculares e/ou microscópicos.....	62
Tabela 9 – Análise das variáveis-resposta associadas à probabilidade de infecção das aves por hemoparasitos segundo o Modelo linear Generalizado Misto. A presença de muda e placa de incubação são as únicas variáveis explicativas com valores significativos para a presença de hemosporídeos.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	– Critério de Informação de Akaike (do inglês " <i>Akaike Information Criterion</i> ")
AD	– Filarídeos adultos
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMAVE	– Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COXI	– Citocromo c oxidase subunidade I
Cyt-b	– Citocromo b
dNTP	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (do inglês, " <i>Deoxyribonucleotide Phosphates</i> ")
DNA	– Ácido desoxirribonucleico (do inglês, " <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ")
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês, " <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ")
GLMM	– Modelo Linear Generalizado Misto (do inglês, " <i>Generalized Linear Mixed Model</i> ")
ICB	– Instituto de Ciências Biológicas
ICMBIO	– Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
L1	– Larvas de primeiro estágio
L2	– Larvas de segundo estágio
L3	– Larvas de terceiro estágio
L4	– Larvas de quarto estágio
MG	– Minas Gerais
MF	– Microfilária
MNHN	– Museu Nacional de História Natural de Paris
pb	– Pares de base
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")
dPCR	– Reação em Cadeia da Polimerase digital
qPCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
PEG	– Polietilenoglicol

R² – Coeficiente de determinação

SSU rRNA – RNA ribossômico de subunidade pequena (do inglês, "*small subunit ribosomal RNA*")

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFV – Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. Aves: um modelo de estudo da interação hemoparasitos-hospedeiros.....	19
1.2. Hemosporídeos aviários.....	20
1.3. Filarídeos aviários.....	25
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivo Geral:.....	30
3.2. Objetivos específicos:.....	30
4. Materiais e Métodos.....	31
4.1. Área de estudo.....	31
4.2. Captura das Aves.....	32
4.3. Identificação das aves, coleta de sangue e de dados relacionados às condições corporais.....	34
4.4. Avaliação dos esfregaços sanguíneos.....	35
4.5. Extração do DNA.....	36
4.6. Diagnóstico e caracterização molecular dos hemoparasitos.....	37
4.7. Análises estatísticas.....	43
5. Resultados.....	45
5.1. Perfil das aves amostradas.....	45
5.2. Prevalência e diversidade de hemosporídeos de aves silvestres capturadas no município de Florestal – MG.....	46
5.3. Prevalência e diversidade de filarídeos em Florestal – MG.....	58
5.4. Coinfecção entre hemoparasitos.....	62
5.5. Variáveis preditoras da ocorrência de hemosporídeos.....	63
6. Discussão.....	64
7. Conclusões.....	74
8. Referências.....	75
Apêndice.....	89

1. Introdução

A curiosidade acerca dos diferentes organismos que compartilham o espaço físico com os seres humanos sempre foi foco de interesse para nossa espécie. Entender as dinâmicas dessas interações abrange uma área de estudo denominada Ecologia (*oikos*=casa, *logia*=estudo) que compreende o estudo das correlações entre os organismos e os ambientes que ocupam. Neste campo, destaca-se o parasitismo, definido como a relação entre dois organismos na qual um deles, o parasito, obrigatoriamente utiliza seu hospedeiro como fonte de nutrição e sobrevivência; nesta relação comumente um parasito utiliza apenas um organismo, ou alguns poucos, como fonte de recursos causando danos que podem levar a morte desses hospedeiros (Begon 2005; Atkinson et al., 2009).

Com o passar do tempo, surgiu a necessidade de definir e integrar conceitos parasitológicos associados à ecologia (Poulin, 2021). Os estudos em ecologia parasitária têm permitido o conhecimento dos mecanismos fisiológicos, ecológicos, evolutivos entre outros que determinam características das relações parasito-hospedeiro, assim como o esclarecimento do papel de fatores bióticos e abióticos no sucesso desta relação (Krasnov et al., 2007; Atkinson et al., 2009; Ishtiaq et al., 2010; Jenkins & Owens, 2011).

Sabe-se que os parasitos compreendem um grupo diverso, representando a maior riqueza de espécies no mundo (Dobson et al., 2008; Carlson et al., 2020). Parasitos podem ser agrupados a partir de características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. Os hemoparasitos representam um conjunto de organismos que têm como habitat a circulação sanguínea do hospedeiro (Bennett, 1987; Benedikt et al., 2009). Podem infectar células sanguíneas ou viver livremente na circulação, de modo que apresentam mecanismos que permitem seu sucesso como organismos parasitários, apresentando diferentes graus de dependência de seus hospedeiros (Anderson, 2000; Valkiunas, 2005; Atkinson et al., 2009).

Parasitos sanguíneos são encontrados em diferentes vertebrados, como aves, répteis e mamíferos, incluindo seres humanos. Infecções por esses organismos podem causar impactos fisiológicos em seus hospedeiros, causando o aparecimento de sinais clínicos, redução do *fitness* e sobrevivência desses indivíduos (Goater & Holmes 1997; Marzal et al., 2005; Ortego et al., 2008).

Dentre os hemoparasitos, os hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) e filarídeos (Nematoda: Onchocercidae) são usualmente estudados por incluírem representantes que infectam seres humanos, animais domésticos e silvestres, o que os torna bons modelos para

estudos ecológicos e evolutivos (Apanius, 1991; Poulin & Morand, 2000). Além dos vertebrados, esses organismos infectam uma pluralidade de invertebrados, como culicídeos, ceratopogonídeos, simulídeos e outros artrópodes, indispensáveis para o desenvolvimento do ciclo de vida desses parasitos (Baker, 1976; Levine, 1988; Anderson, 2000; Santiago-Alarcon et al., 2012; Sehgal et al., 2015). Sendo assim, fatores bióticos e abióticos podem impactar o desenvolvimento desses vetores, beneficiando ou prejudicando a atuação desses invertebrados na disseminação dos hemoparasitos. Alterações ambientais e das dinâmicas de interação entre parasitos e hospedeiros podem resultar em consequências severas, como a extinção de espécies e desequilíbrio ecológico local (Warner, 1968; Van Riper et al., 1986; Atkinson & LaPointe, 2009).

Diversos grupos de pesquisa têm utilizado as aves como modelo de estudo, o que permite a caracterização da biodiversidade de seus parasitos, bem como o entendimento dos mecanismos ecológicos, evolutivos e imunológicos envolvidos na interação parasito-hospedeiro. Para isso, é fundamental a detecção e identificação dos hemoparasitos a partir da coleta de sangue para detecção microscópica de formas sanguíneas e por técnicas moleculares, como reação em cadeia polimerase (PCR). Desta forma, reconhece-se a relevância dos estudos de taxonomia integrativa nos quais diferentes métodos de detecção e identificação devem ser utilizados concomitantemente para caracterização morfológica e genética de hemoparasitos como hemosporídeos e filarídeos (Perkins et al., 1998; Bensch et al., 2004; Valkiūnas et al., 2011; Chagas et al., 2021).

Na América do Sul existem poucos grupos de pesquisa capacitados a caracterizar morfológica e molecularmente hemosporídeos e filarídeos e há um acúmulo de sequências genéticas sem a devida associação a uma morfoespécie; isso afeta a avaliação da prevalência e biodiversidade destes parasitos em animais silvestres. Parte dos haplótipos descobertos e depositados em bancos de dados não apresenta uma descrição morfológica do parasito, o que dificulta a identificação das espécies, limitando, assim, os conhecimentos taxonômicos acerca desses organismos (Bain et al., 2008; Valkiūnas & Iezhova, 2018). Além disso, a ocorrência de coinfeções e de espécies crípticas (organismos que não apresentam caracteres morfológicos distinguíveis, mas são geneticamente distintos) pode dificultar uma caracterização precisa da comunidade de parasitos encontrados em diferentes ecossistemas (Perkins, 2000; Pacheco & Escalante, 2023).

1.1. Aves: um modelo de estudo da interação hemoparasitos-hospedeiros

Aves são uma classe de vertebrados comumente utilizados como símbolos culturais e ritualísticos; nos dias atuais têm sido usadas para representar liberdade, e no passado foram importantes representações de deusas e deuses no império greco-romano e no Egito Antigo, por exemplo (Hall, 2018; Filipek, 2023). De igual modo, para outros povos, esses animais ainda são utilizados para sacrifícios e rituais religiosos de matrizes africanas (Leo-Neto et al., 2009) e até mesmo suas penas são importantes adereços artísticos e sociais de povos indígenas brasileiros (Araújo & de Sá, 2021). Ademais, são parte fundamental da economia moderna de diversos países, além de serem alvo de atividades de observação, exposições científicas e caça e comporem a dieta alimentar de diversas culturas em todo o mundo (Anderson, 2010; Bezerra et al., 2013).

Dentre os vertebrados terrestres, a avifauna compreende a maior diversidade de espécies, sendo que esses animais apresentam importantes papéis ecológicos. Atuam, por exemplo, na dispersão de sementes, polinização, carreamento de vetores e patógenos durante eventos de migração. O equilíbrio dessas funções está ameaçado pelo aquecimento global, desmatamento e urbanização, que atuam como pressões seletivas podendo resultar na extinção de diversas formas de vida e favorecer a sobrevivência de organismos mais generalistas adaptados às novas condições (Marzluff, 2001; Mckinney, 2002; Quesada & MacGregor-Fors, 2010; Aronson et al., 2014; Whelan et al., 2015).

O Brasil é o segundo país com maior riqueza de aves (Figura 1), com 1971 espécies descritas (de Piacentini et al., 2015; Develey, 2021; CBRO, 2023), isso permite que o modelo aviário de interação parasito-hospedeiro seja avaliado em suas diferentes interfaces ecológicas. Podemos observar o efeito das condições bióticas (coinfecção, idade, período de reprodução, condição imunológica, diversidade e riqueza de parasitos e hospedeiros) e abióticas (biomas, geografia, sazonalidade, pluviosidade, umidade, temperatura e a antropização) na distribuição e ocorrência dos hemosporídeos e filarídeos. Estudos acerca dos hemoparasitos aviários permitem a obtenção de amostras biológicas com um impacto reduzido no bem-estar e no nível de estresse desses animais, sendo necessária apenas uma pequena alíquota de sangue, liberando o animal em seguida (Cosgrove et al., 2008; Chasar et al., 2009; Møller, 2010; Sehgal et al., 2015; Ferreira Junior et al., 2017; Jiménez-Peñuela et al., 2021).

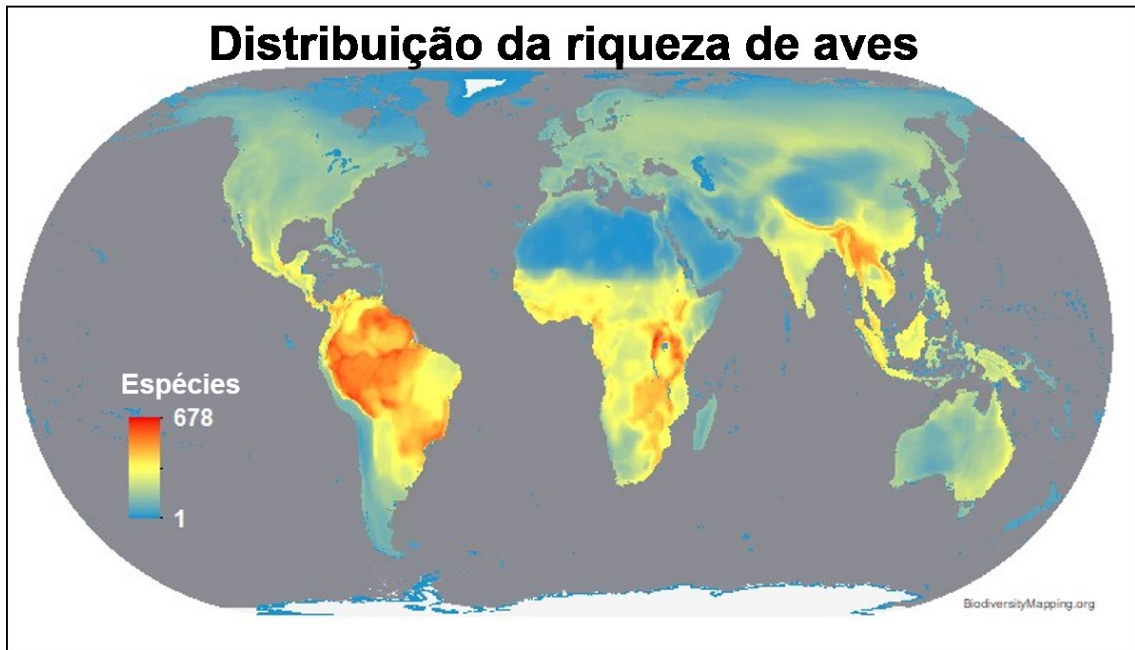


Figura 1 – Mapa de distribuição e riqueza de aves no mundo, adaptado de <https://biodiversitymapping.org> (novembro de 2023).

As características associadas aos hospedeiros, como idade, sexo, condição imunológica, nutricional podem influenciar o sucesso do estabelecimento de parasitos (Poulin 1996; Mccurdy et al., 1998; Calero-Riestra & García 2016; Clark et al., 2016). Co-infecções também devem ser consideradas como um fator determinante, já que a coexistência de diferentes organismos em um mesmo hospedeiro pode alterar a resposta imune, resultando em competição ou mutualismo (Clark et al., 2016; Hernandez-Córdoba & Braga, 2019).

O comportamento das aves pode favorecer a distribuição de parasitos, contribuindo para a sua dispersão e infecção de novos hospedeiros. A migração pode auxiliar a disseminação de patógenos para novas áreas, viabilizando a transmissão para aves residentes, que com frequência não apresentam imunidade contra novos parasitos. A transferência de parasitos durante a migração permite seu espalhamento para novos hospedeiros (“*spillover*”); isso favorece o contato entre diferentes linhagens da mesma espécie de parasito, e conseqüentemente, a troca de material genético entre eles, levando ao aumento de riqueza de espécies e diversificação genética desses parasitos (Bensch et al., 2004; Outlaw & Ricklefs 2014; de Angeli Dutra et al., 2021; Poulin & de Angeli Dutra, 2021).

1.2. Hemosporídeos aviários

Hemosporídeos pertencem ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, e são parasitos heteroxenos capazes de invadir células teciduais e sanguíneas. Este grupo abrange quatro

famílias, Plasmodiidae, Haemoproteiidae, Leucocytozooiidae e Garniidae, e cada uma é representada por apenas um gênero que infecta aves, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*, respectivamente. Os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são os parasitos de aves silvestres mais investigados atualmente devido à sua ampla distribuição no mundo, biodiversidade e seu importante papel ecológico na manutenção de populações aviárias (Valkiunas, 2005; Atkinson & LaPointe, 2009; Telford, 2009). A identificação de espécies que compõem esse grupo em diferentes regiões nos permite conhecer a biodiversidade destes organismos e compreender melhor as dinâmicas da interação parasito-hospedeiro. Apesar disso, ainda há diversas lacunas acerca da biologia destes parasitos e sua distribuição na América do Sul (Fecchio et al., 2020).

Os plasmódios, agentes etiológicos da malária, são hemosporídeos amplamente estudados e de grande importância médica humana, com registros de seu impacto que datam mais de 2000 anos (Cox, 2010). Em 1880, Louis Alphonse Laveran observou gametócitos na circulação periférica de um paciente infectado por *Plasmodium*, e quatro anos depois desta descoberta, o naturalista Vasily Danilewsky encontrou parasitos sanguíneos semelhantes em aves, agrupados como hemosporídeos (Danilewsky, 1889). A partir dos achados de Danilewsky foi possível elaborar modelos de pesquisa com base nos hemosporídeos aviários a fim de elucidar mecanismos que pudessem ser associados ao modelo de infecção humana. E por meio de conhecimentos do modelo de interação hemosporídeos-aves, o médico inglês Sir Ronald Ross, ganhador do prêmio nobel em fisiologia e medicina, descobriu que os agentes etiológicos da malária humana são transmitidos por dípteros hematófagos (Ross, 1898). O modelo experimental aviário foi fundamental para a construção dos conhecimentos sobre os causadores da malária e, atualmente, estruturam conhecimentos acerca da biodiversidade, taxonomia, evolução e ecomparasitologia (Santiago-Alarcon & Marzal, 2020).

Atualmente, tem-se conhecimento de mais de 260 espécies e mais de 4600 linhagens genéticas de hemosporídeos aviários, que apresentam um ciclo de vida complexo envolvendo, além dos hospedeiros vertebrados, insetos vetores como culicídeos, hipoboscídeos, simulídeos e ceratopogonídeos (Figura 2). Nos invertebrados ocorre a reprodução sexuada, nos quais é possível encontrar formas de desenvolvimento como microgameta, macrogameta, oocineto, oocisto e esporozoítos. Por sua vez, nos hospedeiros vertebrados, esses parasitos se reproduzem assexuadamente e apresentam ciclo exoeritrocítico e eritrocítico, nos quais se desenvolvem os trofozoítos, esquizontes, merozoítos e gametócitos. A diferenciação dos quatro gêneros de Haemosporida (Tabela 1) pode ser feita a partir da observação das formas sanguíneas e das

células infectadas (Garnham, 1966; Valkiunas, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2012; Fecchio et al., 2020).

Tabela 1 - Características taxonômicas que diferenciam os gêneros de hemosporídeos aviários

Características	<i>Plasmodium</i>	<i>Haemoproteus</i>	<i>Leucocytozoon</i>	<i>Fallisia</i>
Esquizogonia em sangue	Sim	Não	Não	Sim
Produz pigmento malárico	Sim	Sim	Não	Não
Forma gametócitos em hemácias	Sim	Sim	Não	Não

Dentre os caracteres válidos para a identificação de hemosporídeos, leva-se em consideração a presença de um ou mais parasitos infectando uma mesma célula sanguínea, o posicionamento do parasito em relação ao núcleo das células do hospedeiro e a ocorrência de deslocamento dessa estrutura. Além disso, a quantidade, formato e distribuição do pigmento malárico, presença ou ausência de vacúolo, tamanho e aspecto do parasito, entre outras características, podem ser elencadas (Valkiunas, 2005).

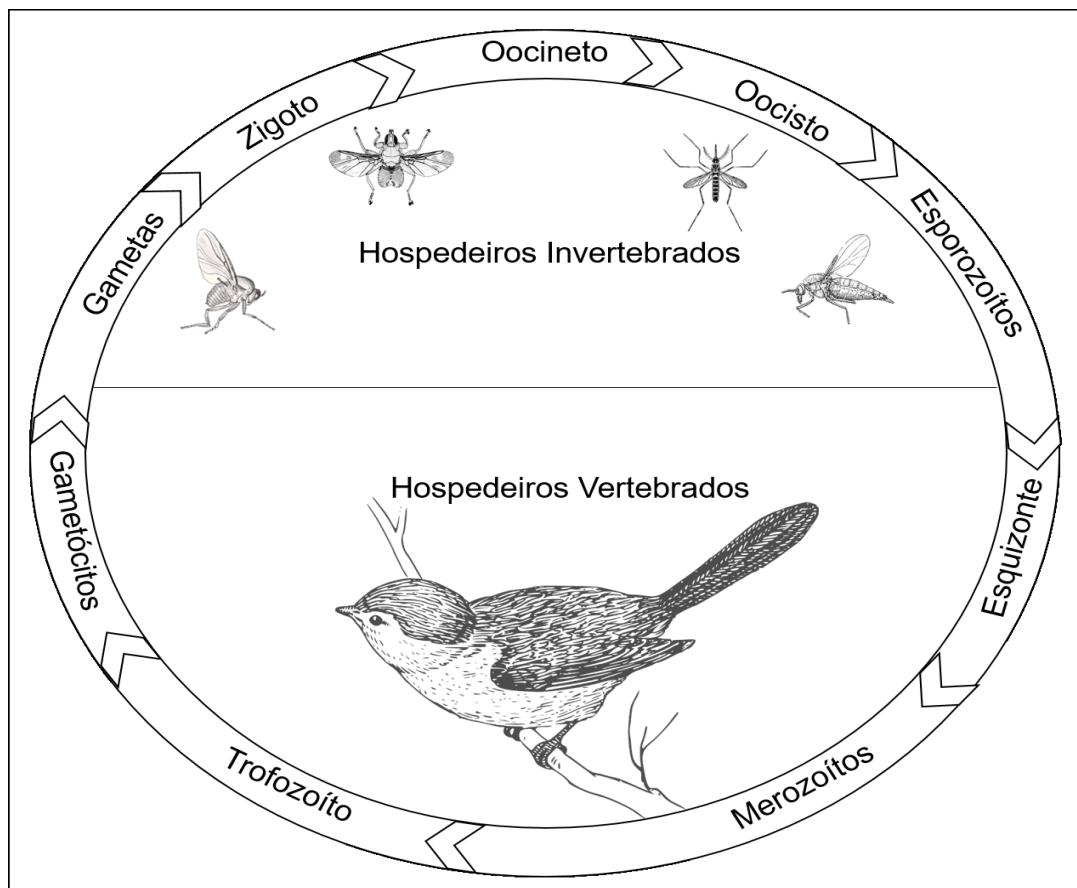


Figura 2 - Ciclo geral de hemosporídeos aviários: possuem um desenvolvimento complexo e heteroxeno, com reprodução assexuada ocorrendo nos hospedeiros invertebrados, nos quais se desenvolvem os gametas, zigoto, oocineto, oocistos e esporozoítos. Por sua vez, no hospedeiro vertebrado são encontrados os esquizontes, merozoítos, trofozoítos e gametócitos.

1.2.1. *Plasmodium*

Plasmodium (Haemosporida: Plasmodiidae) é um gênero de parasitos capaz de infectar humanos e outros mamíferos, répteis, anfíbios e aves. No mundo, existem mais de 55 espécies capazes de infectar aves, apresentando características genéticas, morfológicas e ciclo de vida semelhantes. Das espécies de plasmódios aviários, apenas 24 estão associadas a linhagens genéticas, e atualmente há mais de 1250 haplótipos únicos, pertencentes a esse gênero (Valkiūnas & Iezhova, 2018; Fecchio et al., 2020). São encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártica, e frequentemente são generalistas em relação a seus hospedeiros, de maneira que uma mesma espécie de *Plasmodium* spp. pode infectar diferentes ordens e espécies de aves.

Tais parasitos são transmitidos por fêmeas de invertebrados hematófagos da família Culicidae e seus diferentes gêneros, como *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e outros. Os plasmódios aviários são agrupados em cinco subgêneros de acordo com sua proximidade filogenética e morfológica: *Bennettinia*, *Giovannolaia*, *Haemamoeba*, *Hufia* e *Novyella* (Valkiūnas, 2005).

Em seus hospedeiros vertebrados, esses organismos possuem um desenvolvimento exoeritrocítico, no qual os esporozoítos inoculados pelos vetores infectam células endoteliais e hematopoiéticas; nestas células amadurecem por reprodução assexuada, resultando em esquizogonias. No estágio exoeritrocítico, parasitos do gênero *Plasmodium* podem desenvolver a esquizogonia primária e secundária. A formação da esquizogonia primária ocorre antes da fase eritrocítica (na circulação sanguínea), é composta por duas fases de esquizontes denominados, respectivamente, de criptozoítos e metacriptozoítos.

No sangue (fase eritrocítica), os merozoítos invadem as hemácias e se desenvolvem em esquizontes sanguíneos que darão origem a novos merozoítos ou gametócitos, formas fundamentais para identificação morfológica das espécies. Uma vez que se deu início ao ciclo eritrocítico, a esquizogonia secundária (exoeritrocítica) pode ocorrer, resultando em gerações de merontes teciduais rotulados de fanerozoítos; essas formas, em conjunto dos merontes sanguíneos, mantêm fase crônica da infecção, com parasitemias reduzidas.

Os gametócitos produzidos na circulação sanguínea podem ser ingeridos por vetores competentes; assim, são liberados das hemácias e transformam-se em gametas (macro e microgametócitos), seguindo-se a fecundação e a posterior formação do oocineto. Esta forma móvel se adere à lâmina basal do intestino dos insetos, onde os esporozoítos são gerados por

esporogonia e liberados para a hemocele; por migração pela hemolinfa, atingem a glândula salivar, sendo inoculados em um próximo repasto sanguíneo (Valkiūnas, 2005).

Plasmodium tem características biológicas que possibilitam diferenciá-lo de outros hemosporídeos, pois são os únicos que apresentam esquizontes em eritrócitos. Ademais, as formas sanguíneas produzem pigmento malárico ou hemozoína, por não serem capazes de metabolizar a hemoglobina. Distinções entre as características das formas sanguíneas associadas a dados moleculares têm possibilitado a identificação e classificação de espécies deste gênero com maior precisão (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas & Iezhova, 2018; Fecchio et al., 2020).

1.2.2. *Haemoproteus*

Haemoproteus (Haemosporida: Haemoproteidae) é um grupo irmão de *Plasmodium* e consiste em mais de 170 espécies descritas e cerca 1400 linhagens únicas já identificadas e depositadas em banco de dados (Valkiūnas & Iezhova, 2022). Das espécies já descritas morfológicamente, apenas 67 apresentam associação com dados moleculares gerados. Estes parasitos cosmopolitas, majoritariamente encontrados na América do Sul, África e Ásia, são bastante estudados; suas espécies são consideradas especialistas, pois frequentemente infectam uma ordem, gênero ou espécie particular de aves hospedeiras (Valkiūnas, 2005 e Fecchio et al., 2020; Matoso et al., 2021).

O gênero é dividido em dois subgêneros, *Parahaemoproteus* e *Haemoproteus* de acordo com hospedeiros invertebrados e vertebrados que infectam, bem como por diferenças em sua esporogonia. Ceratopogonidae são vetores tipicamente de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*), encontrados, principalmente, em passeriformes. Por sua vez, Hippoboscidae é uma família reconhecida por transmitir espécies do subgênero *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) que infectam majoritariamente aves das ordens Columbiforme, Charadriiformes e Suliformes (Levin et al., 2012; Fecchio et al., 2020; Valkiūnas & Iezhova, 2022).

Nos dípteros hematófagos citados acima, os parasitos do gênero *Haemoproteus* desenvolvem seu ciclo sexuado, processo similar ao que ocorre com mosquitos infectados pelo gênero *Plasmodium*. Durante a hematofagia as aves podem se infectar a partir da inoculação de esporozoítos, dando início a fase exoeritrocítica, na qual os esporozoítos invadem células endoteliais, mioblastos e macrófagos residentes. Nessas células ocorre a formação de pelo menos duas fases de esquizogonia, sendo os merontes da segunda fase denominados de megalomerontes. Após pelo menos duas esquizogonias exo-eritrocíticas, os parasitos alcançam

a circulação sanguínea, dando-se início à fase eritrocítica na qual ocorre apenas o desenvolvimento de gametócitos que ao serem ingeridos por seus vetores seguem o ciclo esporogônico como descrito para os parasitos do gênero *Plasmodium*. A partir da análise das características morfológicas dos gametócitos eritrocíticos e sua relação com a célula hospedeira, é possível a identificação dos parasitos em nível de espécie. Em vista disso, a infecção de vertebrados por representantes deste gênero pode ser diferenciada dos plasmódios por não apresentarem esquizogonia em células sanguíneas e também se distinguem de outros hemosporídeos pelo fato de suas formas eritrocíticas apresentarem pigmento malárico (Valkiūnas, 2005).

1.3. Filarídeos aviários

A família de nematoides parasitos Onchocercidae, pertencente a superfamília Filarioidea, com oito subfamílias (Onchocercinae, Dirofilariinae, Splendidofilariinae, Lemdaninae, Setariinae, Waltonellinae, Icosiellinae e Oswaldofilariinae) que infectam vertebrados e apresentam formas embrionárias denominadas microfírias. Podem infectar aves, répteis e mamíferos, impactando o *fitness*, qualidade de vida e sobrevivência desses animais (Simpson et al., 1996; Anderson, 2000; De La Torre et al., 2020).

Esses vermes são heterexonos (Figura 3), usualmente apresentam culicídeos, ceratopogonídeos, simulídeos, carrapatos, piolhos e outros artrópodes como vetores (Anderson, 2000). Em aves infectadas por estes parasitos, os vermes adultos (machos e fêmeas) são detectados em tecidos de sua preferência, entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que os permitem alcançar essas regiões. As microfírias usualmente eclodem ainda no útero das fêmeas e apresentam a região anterior arredondada; por sua vez, a porção posterior pode ser arredonda, cônica ou filamentososa. Esses embriões podem ser ingeridos pelos vetores durante o repasto sanguíneo, dando seguimento ao seu ciclo de vida (Bain, 2002; Atkinson et al., 2009).

As formas embrionárias ingeridas pelos hospedeiros invertebrados alcançam o intestino e por penetração se estabelecem na lâmina basal. Nesta região a microfíria se desenvolve em larva de primeiro estágio (L1) tornando-se mais curta e robusta que não se movimenta. Após realizar a muda, o parasito se converte em larva de segundo estágio (L2), longa e fina, que se desenvolve e transforma em larva de terceiro estágio (L3) que se movimenta e migra para o aparato bucal dos vetores. A L3 é a forma infectante para os vertebrados, pois durante o repasto sanguíneo dos artrópodes esta larva evade a probóscide desses animais e penetra o tecido das aves, dando início à infecção. No hospedeiro definitivo a L3 realiza a muda dando origem à

larva de quarto estágio que da origem às formas adultas (Anderson, 2000; Bain & Babayan, 2003).

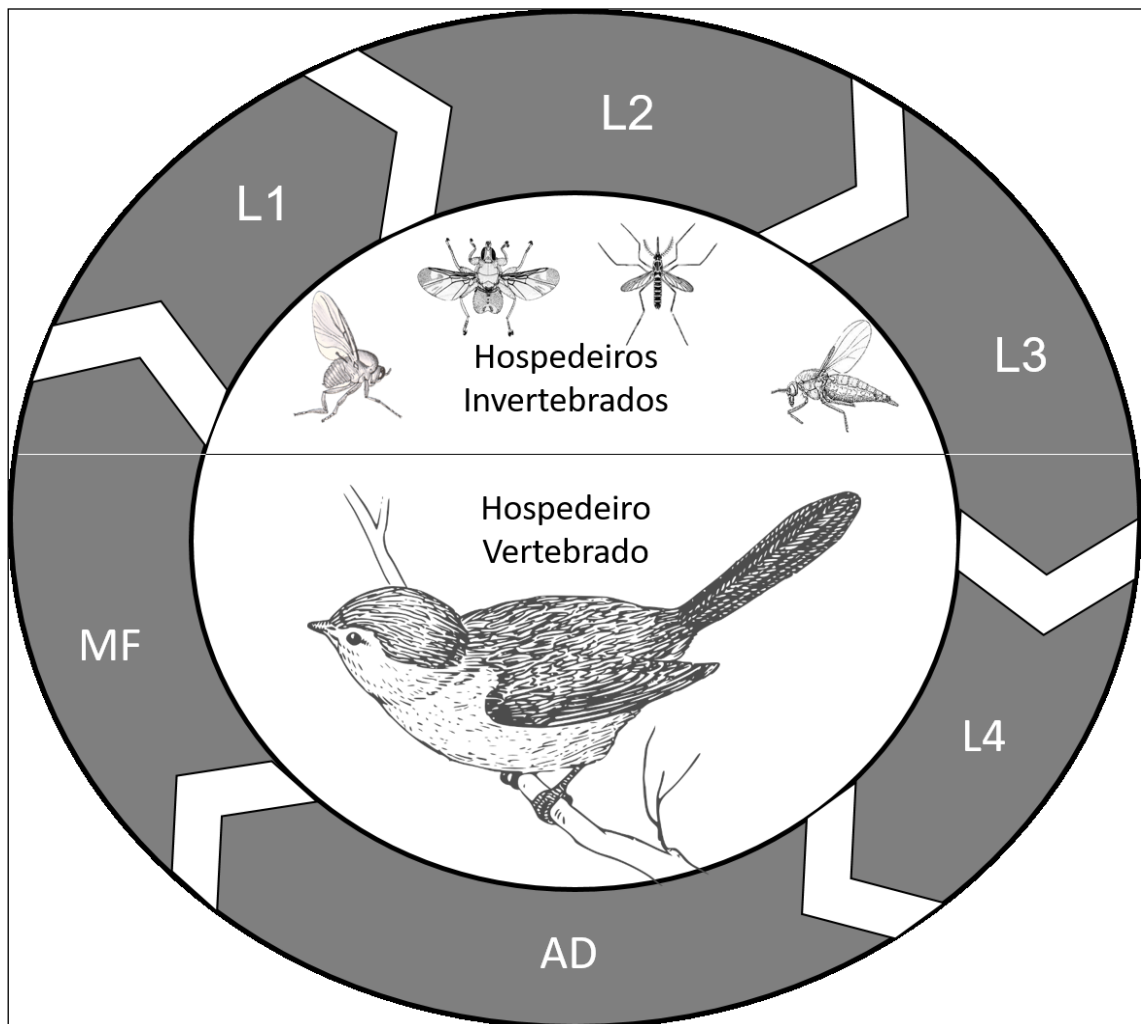


Figura 3- Ciclo de filarídeos da família Onchocercidae: representa o ciclo que ocorre nos hospedeiros invertebrados, sendo L1, L2 e L3 os respectivos estádios larvais que se desenvolvem nos vetores, L3 é a forma infectante; L4 é o estágio larval precursor das formas adultas (AD) encontradas nas aves, alojadas em órgãos e tecidos; MF são as formas embrionárias conhecidas como microfíliarias podendo ser observadas na circulação sanguínea dos hospedeiros.

Atualmente, cerca de 600 espécies de filarídeos são conhecidas, das quais mais de 160 infectam aves e são amplamente distribuídas pelo mundo, sendo agrupadas nas subfamílias Onchocercinae, Dirofilariinae, Splendidofilariinae e Lemdaninae (Bartlett, 2009). A identificação de espécies é realizada a partir da observação das formas adultas, e para isso é necessária a eutanásia dos hospedeiros vertebrados (McKeand, 1999; Ferri et al., 2009; Binkienė et al., 2021). Entretanto, as microfíliarias são facilmente visualizadas no sangue periférico, sem a necessidade do abate das aves. Contudo, não é possível realizar o diagnóstico específico utilizando apenas caracteres morfológicos dessas formas embrionárias; a escassez de

dados moleculares associados a essas formas embrionárias dificultam sua identificação em nível de espécies utilizando-se marcadores genéticos (Chagas et al., 2021).

A caracterização das espécies e associação com seus hospedeiros é um processo necessário para elucidar a história evolutiva desses parasitos. A sistemática desse grupo ainda apresenta lacunas, uma das barreiras que dificulta o esclarecimento da classificação desses parasitos é o próprio desenvolvimento de uma vida parasitária (Chabaud & Bain, 1994). O surgimento desses parasitos tem origens diferentes, resultando na perda de alguns critérios morfológicos e presença de homoplasias, dificultando seu agrupamento filogenético baseado em características morfológicas (Lefoulon et al., 2015). Portanto, é essencial o desenvolvimento de metodologias que auxiliem na caracterização e comparação de similaridade desses vermes (adultos e microfilárias). Além disso, a fim de detectar filarídeos em aves silvestres, em cativeiro e em risco de extinção, evitando a eutanásia dos hospedeiros, são necessários estudos de caracterização morfológica e molecular das formas sanguíneas desses filarídeos.

2. Justificativa

Infecções por hemoparasitos, como os hemosporídeos e filarídeos, são frequentemente descritas em animais silvestres. Podem resultar em danos na qualidade de vida, redução do *fitness* e sobrevivência, alterações da resposta imunológica e morte de seus hospedeiros. Dentre os diversos vertebrados acometidos por esses organismos, destacam-se as aves, animais que apresentam grande importância econômica, cultural e ecológica. As interações entre aves e seus hemoparasitos é um modelo ideal de estudo para a compreensão da interação parasito-hospedeiro-ambiente e dos efeitos das diferentes variáveis individuais, temporais e estruturais na composição dos diferentes nichos ecológicos.

O Brasil apresenta uma das maiores riquezas de aves no mundo, o que sugere uma grande diversidade desses parasitos. Para estimar a biodiversidade de hemosporídeos é fundamental que a caracterização morfológica esteja associada ao sequenciamento das morfoespécies. Há diversos grupos de pesquisa que verificam a prevalência de hemosporídeos na avifauna dos diferentes biomas brasileiros e utilizam, exclusivamente, técnicas moleculares para o diagnóstico e caracterização dos parasitos. Com isso, existe um déficit de informações morfológicas dos hemosporídeos, essenciais para a identificação destes parasitos em nível de espécie. Ademais, o diagnóstico unicamente por PCR limita o reconhecimento de coinfeções e, portanto, dificulta a avaliação da interação parasito-hospedeiro.

Concernente aos filarídeos aviários, os estudos costumam realizar a eutanásia dos hospedeiros para localizar e identificar os vermes adultos; com isso, desconsideram as formas sanguíneas para diagnóstico, mesmo que sejam amostradas por métodos menos invasivos. Atualmente, há poucos recursos técnicos que permitem caracterizar morfológica e geneticamente espécies de filarídeos a partir da amostragem de microfíliarias presentes no sangue. A necessidade de eutanásia dos animais restringe o número de indivíduos e a riqueza amostrada, e isso prejudica estudos eco-evolutivos que avaliam a prevalência e diversidade desses parasitos. Desse modo, é relevante o desenvolvimento de abordagens integrativas para um diagnóstico e caracterização mais precisos desses parasitos a fim de elucidar os fatores determinantes das interações parasito-hospedeiro.

Em Minas Gerais, ocorrem fitofisionomias exclusivas e particulares, como a área avaliada neste estudo, que representa a transição entre o Cerrado e a Mata Atlântica. Trata-se de uma fitofisionomia semidecidual com características únicas, abrigando avifaunas endêmicas de ambos os biomas, além de ser rota migratória de algumas espécies e possuir uma sazonalidade

bem definida em estações chuvosas e secas. Pouco se sabe acerca da descrição e interação de hemoparasitos e seus hospedeiros em regiões de florestas semidecíduais. Diante da singularidade dessa fitofisionomia, surgem perguntas importantes acerca dessas interações: quais fatores bióticos e abióticos favorecem a ocorrência de hemoparasitos? Será que períodos chuvosos fomentam condições ideais para o aumento da reprodução dos vetores, aumentando assim a prevalência desses parasitos aviários? Migração e hábito alimentar são características que influenciam essa dinâmica parasito-hospedeiro? Fatores individuais, como sexo, idade, reprodução e muda estão mais associados a aves infectadas por esses parasitos? A presença de um ou mais hemoparasitos influencia o sucesso de infecção por outros parasitos?

A integração de diferentes áreas do conhecimento, como parasitologia, biologia molecular, ecologia e evolução, fornece uma abordagem única para o entendimento dos mecanismos determinantes dos sistemas parasito-hospedeiro. Desse modo, estudos em ambientes de fitofisionomia semidecidual, com características marcantes de sazonalidade, são necessários para elucidar as relações entre hospedeiros, filarídeos e hemosporídeos, contribuindo para o desenvolvimento de medidas de conservação da biodiversidade. Além disso, a identificação morfológica e genética desses parasitos contribui para o registro de novas espécies bem como para a compreensão da história evolutiva de grupos taxonômicos relevantes.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo Geral:

A partir de uma análise integrativa, realizar a caracterização morfológica e/ou molecular de hemoparasitos encontrados na comunidade aviária de uma área de mata semidecidual entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica em Minas Gerais no decorrer de doze meses.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Determinar a ocorrência de protozoários pertencentes aos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, bem como filarídeos por microscopia óptica e técnicas moleculares ao longo de 12 meses.
- 2) Caracterizar morfológica e geneticamente os parasitos detectados na comunidade aviária amostrada.
- 3) Correlacionar a ocorrência de hemoparasitos a fatores abióticos, como pluviosidade e temperatura, e bióticos, como idade, dieta, muda de penas, presença de ectoparasitos, período de reprodução e comportamento migratório.
- 4) Validar novos iniciadores para diagnóstico molecular mais sensível de filarídeos.
- 5) Avaliar as interações filogenéticas entre as espécies e linhagens dos hemoparasitos de acordo com seus grupos taxonômicos.
- 6) Avaliar se os hemoparasitos encontrados apresentam perfil generalista ou especialista em relação a seus hospedeiros.

4. Materiais e Métodos

4.1. Área de estudo

As aves foram capturadas na área que abrange o Campus Florestal da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Florestal, Minas Gerais (19°52'16''S e 44°25'26''W) (Figura 4).

O clima local é caracterizado como tropical de altitude (815 metros), com fauna e flora que transitam entre os biomas de Cerrado e Mata Atlântica, e possui 1.503,5 ha de extensão. Dispõe de uma temperatura média anual de 19,9°C, com precipitação anual média de 1.447,7 mm, distribuídos principalmente entre os meses de outubro e março, período definido como estação chuvosa, e entre os meses de abril e setembro, período seco. Durante novembro de 2021 a outubro de 2022, meses que compreenderam este estudo, a temperatura média anual registrada foi de 20,2°C e a precipitação total registrada foi de 2024,2 mm (Gráfico 1). Consoante a plataforma digital “eBird” (<https://ebird.org/>), a região apresenta registros de mais de 196 espécies de aves.

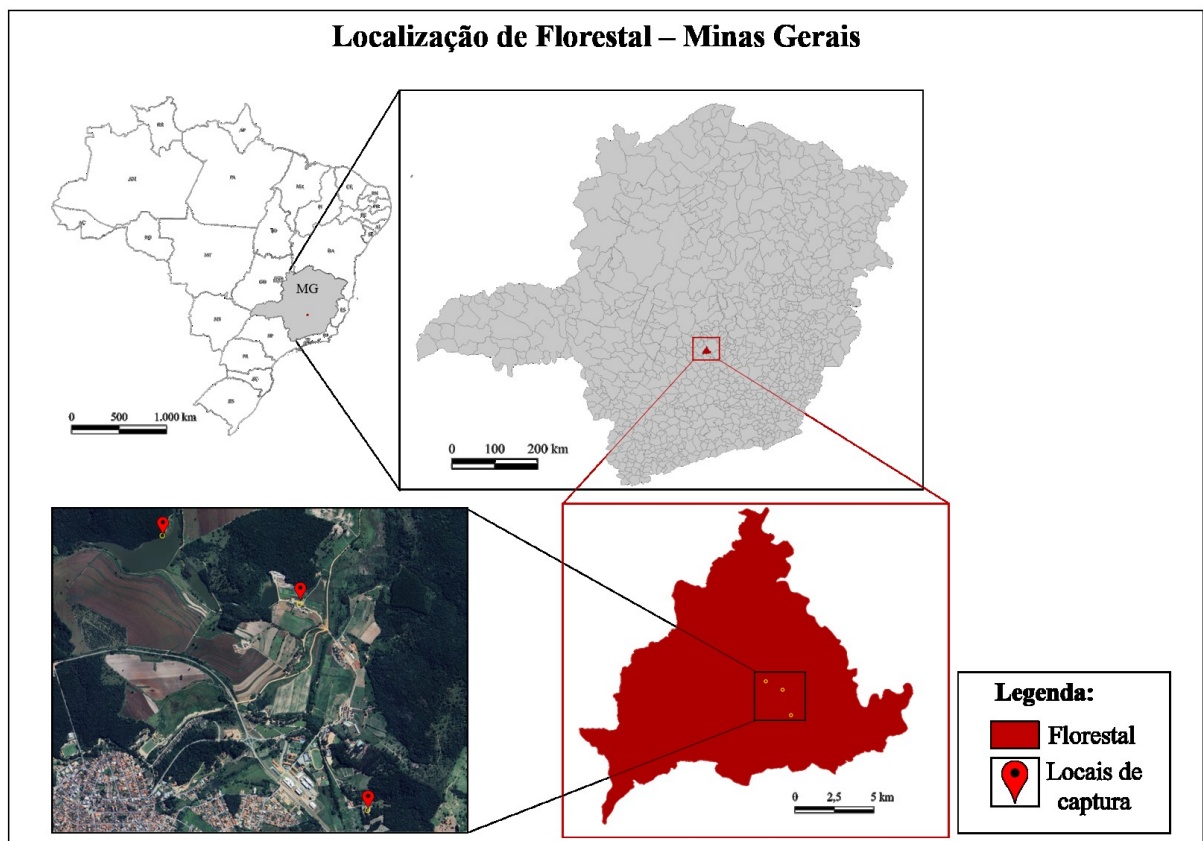


Figura 4- Mapa do Brasil e de Minas Gerais indicando a cidade de Florestal, área de estudo onde se amostrou uma comunidade de aves.

A cidade de Florestal está situada a 68 km da capital de Minas Gerais, Belo Horizonte; é uma região antropizada, com matas secundárias e primárias, o que indica mudanças ambientais

recentes. As primeiras fazendas de Florestal surgiram no século XIX, e com elas houve desenvolvimento de grandes engenhos, produção de café, algodão e exportação de madeira. Em 1936, a região sofreu modificações com a criação da Usina Hidrelétrica de Florestal, que permaneceu ativa até 1983. Atualmente, são desenvolvidas atividades de pecuária leiteira e de corte, criação de aves, produção de ovos, produção de hortifrutigranjeiros e piscicultura. As mudanças ambientais que acometeram a região podem refletir o conjunto de atividades antrópicas desenvolvidas, alterando a organização ecológica encontrada originalmente em Florestal.

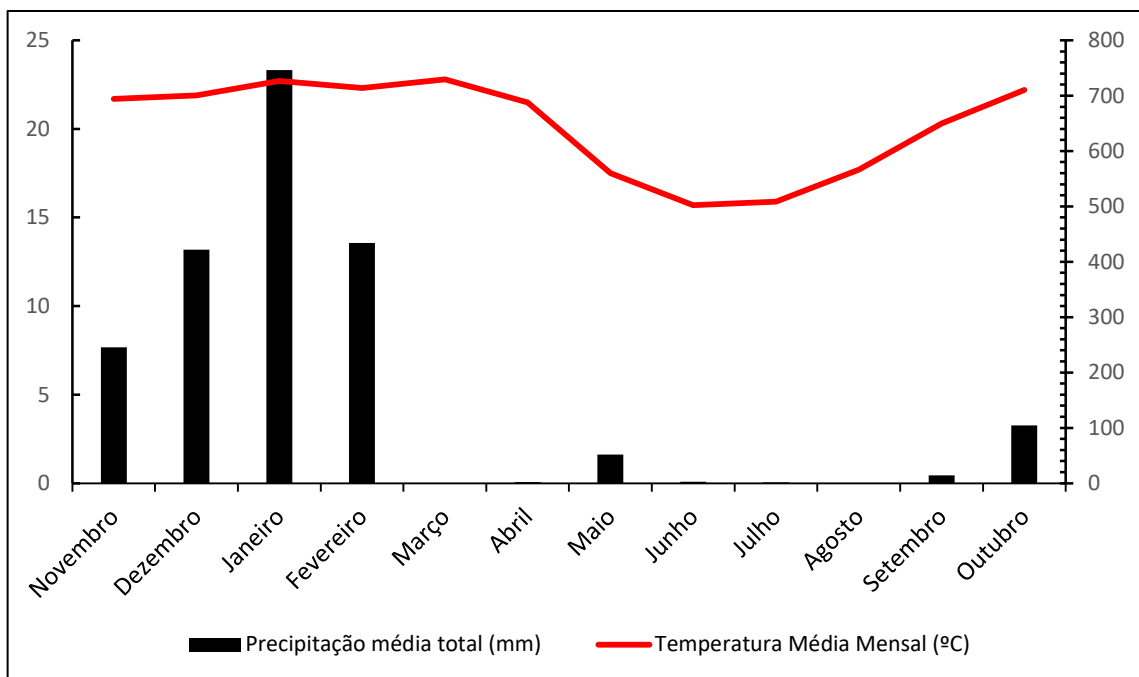


Gráfico 1 - Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo em Florestal, Minas Gerais, Brasil. Dados climáticos obtidos através do Banco de Dados Meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia - Estação Meteorológica de Florestal <<https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em: 30 jun. 2023>.

4.2. Captura das Aves

Os espécimes foram capturados em três pontos diferentes do campus Forestal, com no mínimo um quilômetro e trezentos metros de distância entre eles. A comunidade aviária amostrada transita entre esses locais que, por serem nos arredores da cidade, apresentam impactos antrópicos. Esses pontos de coleta estão perto de lagoas que permaneceram durante todo o ano com volume visualmente significativo de água. Além disso, em um dos locais de captura realizam-se atividades ligadas à piscicultura, o que favorece a manutenção desses corpos d'água.

A amostragem foi realizada mensalmente por 12 meses consecutivos, entre novembro de 2021 e outubro de 2022. Durante esse período, as aves foram capturadas por dois dias ao

mês, com intervalo de no mínimo 15 dias entre cada campanha mensal, totalizando um esforço amostral de 24 dias. Nos dias de coleta, foram utilizadas 14 redes de neblina (12 m de comprimento e 3 m de altura de 12x3 m, espessura de 19 mm), dispostas em locais estratégicos para a captura dos animais, permanecendo ativas por seis horas, a contar do nascer do sol. Os pesquisadores permaneceram no mínimo a 30 metros do local onde as armadilhas foram estruturadas e vistorias às redes foram feitas em intervalos de 30 minutos, a fim de minimizar os danos e estresse das aves capturadas.



Figura 5 – Aves capturadas em rede de neblina (Fotos: Luiz Alves)

Os espécimes foram devidamente removidos das redes de neblina (Figura 5), colocados em sacos apropriados, de modo que não pudessem se debater ou se ferir, e posteriormente liberados no mesmo local da sua captura. Neste estudo, os protocolos éticos padrões de manuseio dos animais silvestres foram seguidos, e autorizados pela Comissão de ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa — Campus Florestal (processo número: 03/2018,), pela CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (processo número: 198/2022) e pelo Sistema de autorização e informação em biodiversidade (SISBIO, permissão 81134-1). Além disso, as aves foram identificadas com anilhas fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/ICMBIO).

4.3. Identificação das aves, coleta de sangue e de dados relacionados às condições corporais

As aves foram identificadas utilizando como base o Guia de Classificação de Aves do Brasil: Pantanal e Cerrado (2010) e a plataforma digital WikiAves (<https://www.wikiaves.com.br/>), que apresenta atualizações acerca dos nomes científicos. Quando possível, os animais foram avaliados em relação ao sexo, idade e tiveram medidas como peso, tamanho total, comprimento e largura do tarso mensurados. Também foi observada a presença de muda e placa de incubação no momento da captura. A presença de ectoparasitos foi anotada. As aves tiveram o sangue periférico coletado a partir da punção da veia braquial utilizando uma agulha estéril (dimensão: 13mm x 4,5mm) de modo que o volume máximo coletado não ultrapassasse mais que 1% do peso do animal (Clark et al., 2009). O sangue foi utilizado para a confecção de esfregaços sanguíneos e armazenado em papel filtro, acondicionado posteriormente a -20°C (Figura 6).

Para categorizar os comportamentos de migração e alimentação das aves, foram utilizadas três plataformas de maneira complementar: Wikiaves, AVONET (Tobias et al., 2022) e Birdlife International (<http://datazone.birdlife.org/home>). Nestes bancos de dados é possível encontrar informações acerca da distribuição geográfica, características físicas e comportamento geral das espécies aviárias. Com base nesses dados, as aves capturadas neste estudo foram categorizadas conforme o comportamento migratório ou residente e hábito alimentar, determinado pela composição de mais de 80% da dieta da espécie.

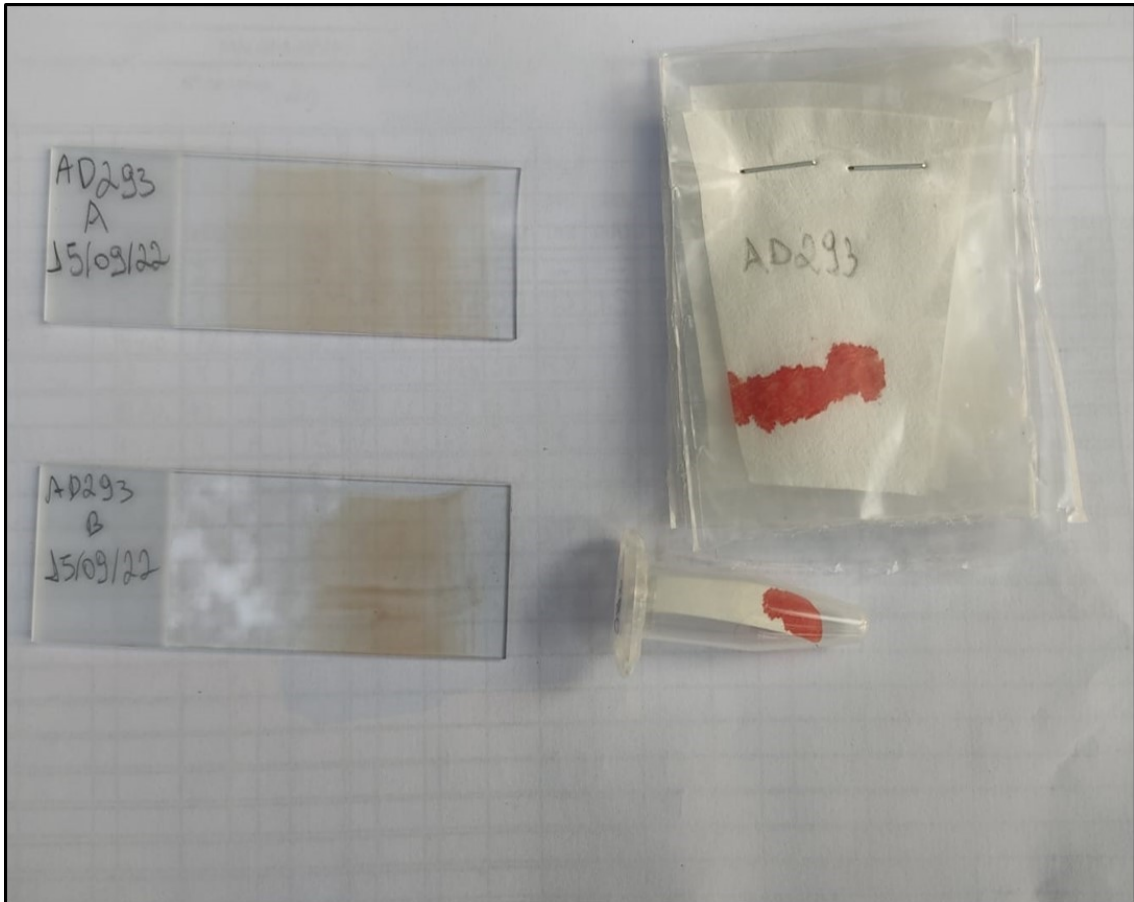


Figura 6 – Coleta de sangue das aves capturadas. O sangue coletado foi utilizado para confecção de esfregaços sanguíneos e armazenados em papel filtro. Do material coletado em papel filtro, uma alíquota foi reservada em tubos para análise molecular.

4.4. Avaliação dos esfregaços sanguíneos

As lâminas confeccionadas em campo foram fixadas em metanol absoluto e coradas com Giemsa 10%. Os esfregaços foram triados em aumento de 40X para a detecção de filarídeos e 100X para observação de hemosporídeos. Toda a extensão da lâmina foi avaliada em busca de microfilárias; para a detecção de hemosporídeos foram examinados 100 campos microscópicos, sem sobreposição de hemácias, de modo que foram avaliadas cerca de 10.000 hemácias (Godfrey et al., 1987; Valkiūnas et al., 2008). As características morfológicas dos hemosporídeos foram avaliadas segundo Valkiūnas (2005), sendo mensurado o comprimento, largura e área dos parasitos, das hemácias infectadas e seu núcleo. Foi registrada a quantidade de pigmentos maláricos nos trofozoítos, esquizontes e gametócitos, além disso, os esquizontes detectados tiveram o número de núcleos contabilizados. A posição do parasito em relação ao núcleo da hemácia foi outra característica avaliada, assim como se o parasito desloca ou não o núcleo. Os hemoparasitos foram fotografados utilizando-se um Microscópio de luz Olympus CX31 equipado com o Sistema de imagem Q-Color5 (Olympus, Tóquio, Japão) e *software* de

imagem QCapture Pro7 (QImaging, Surrey, Canadá). As fotomicrografias foram utilizadas para a caracterização morfológica das formas observadas: com auxílio do *software* ImageJ, os parasitos e suas estruturas ou posicionamento dentro das células hospedeiras foram mensurados a fim de se identificar possíveis espécies (Valkiūnas & Iezhova, 2018; Valkiūnas & Iezhova, 2022).

4.5. Extração do DNA

Para o diagnóstico molecular de hemosporídeos, DNA presente no sangue armazenado em papel filtro foi extraído no Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais. Utilizou-se o método fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol (adaptado de Sambrook & Russell, 2001). Um quadrado de 5mm x 5mm com cerca de 15µL do sangue foi acondicionado em um microtubo de 1,5mL, devidamente identificado. Aos microtubos contendo as amostras de sangue, foi adicionado 250 µL de tampão de lise (50mM de NaCl; 50mM de Tris-HCl pH = 7,4; 10mM de EDTA; 1% (v/v) de Triton X-100; 200µg/ml de Proteinase-K) e o material foi mantido à temperatura de 60°C por 18-24 h. Em seguida, as amostras foram agitadas manualmente e centrifugadas por 20s a 5000g, e posteriormente acrescentamos 125 µL de fenol tamponado (Phoneutria®) e 125 µL de clorofórmio puro, (Synth®). Novamente, as amostras foram agitadas manualmente e centrifugadas por 5 min a 20.000g, para a separação do sobrenadante em novo microtubo. A este produto foram acrescentados 300 µL de solução de clorofórmio álcool-isoamilico (Synth®) (em proporção de 24:1), para nova centrifugação, conforme descrito acima. O próximo passo consistiu em coletar cuidadosamente a porção inferior da solução e descartá-la. Aos microtubos foram adicionados 300 µL de clorofórmio puro seguindo de centrifugação por 5 min a 20.000g; novamente a fase inferior foi descartada e em seguida 600 µL de isopropanol foram acrescentados para posterior centrifugação por 20 min a 20.000g. O produto da centrifugação foi totalmente descartado e o excesso foi dispensado em papel toalha; a cada amostra adicionaram-se 600 µL de etanol 70% seguindo-se centrifugação por 20 min a 20.000g. Ao final desse processo, descartou-se o etanol 70% e os microtubos foram acondicionados em estufa a 37°C, até evaporação total do álcool. O precipitado foi dissolvido utilizando água ultrapura mantidos a 64°C por 60 min em banho-maria e as amostras foram conservadas em freezer a -20°C.

Para análises moleculares de filarídeos, o DNA das amostras em sangue foi extraído no Museu Nacional de História Natural da França (MNHN), em coluna de sílica, utilizando o kit QIAamp® DNA Microkit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Um quadrado de

5mm por 5mm de papel de filtro contendo sangue seco foi condicionado a um tubo de 1,5 µL e tratado com 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K (10mg/ml) a 56°C por 2h, com agitação. À solução brevemente centrifugada para remover material presente na parede do tubo foi posteriormente adicionado 200 µL do tampão AL, e submetido a 70°C por 10 min. Transferiu-se este produto para colunas de centrifugação QIAamp acopladas em tubos de coleta, e foram centrifugados a 6.000g por 2min. O precipitado foi descartado e a coluna integrada a um novo tubo de coleta adicionaram-se 500 µL de AW1; o material foi centrifugado novamente a 6000g por 1 min. O processo de troca do tubo de coleta foi realizado novamente, adicionando desta vez à coluna a solução AW2 para nova centrifugação idêntica a anterior. O tubo de coleta com precipitado foi novamente descartado e a coluna adicionada um tubo limpo, sem adicionar soluções á coluna foi centrifugada por 3min a 20.000g para que a membrana seque. Por fim, com a coluna acoplada a um novo tubo de 1,5 µL foi adicionado 50 µL de água ultrapura e deixada em temperatura ambiente por 5min, seguindo-se de centrifugação a 20.000g por 1min. A coluna foi descartada e o produto nos tubos de 1,5 µL foram armazenados a -20°C. A quantificação do DNA de todas as amostras foi realizada pelo espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®) segundo instruções do fabricante.

4.6. Diagnóstico e caracterização molecular dos hemoparasitos

O DNA extraído foi submetido a diferentes reações em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico dos hemoparasitos conforme descrito a seguir.

4.6.1. Diagnóstico de *Plasmodium* e *Haemoproteus*

A fim de avaliar a presença de hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus*, as amostras foram submetidas a uma PCR simples para a amplificação de uma região altamente conservada do gene SSU rRNA mitocondrial segundo Fallon et al., (2003). Para isso, foram utilizados os seguintes iniciadores (Quadro 1) capazes de amplificar um fragmento de 154 pares de bases (pb):

Quadro 1 - Iniciadores para diagnóstico de *Haemoproteus* spp e/ou *Plasmodium* spp., segundo o protocolo descrito por Fallon et al., (2003).

Iniciadores	343 F	5'-GCTCACGCATCGCTTCT-3'
	496 R	5'-GACCGGTCATTTTCTTTG-3'

Para esta reação foram utilizados 2 µL do DNA extraído do sangue das aves, em uma concentração entre 40 a 80 ng/µL, aplicado em 13 µL de reação contendo: 1X de solução

tampão IO (Phoneutria®); 3 mM de MgCl₂ (Phoneutria®); 0.16 μM dNTP (Ludwig®); 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,2mM de cada iniciador e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para o volume final de 15 μL. O programa da amplificação em termociclador consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, seguida de anelamento a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e 10s. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 2 min e a extensão final a 72°C por 3 min, finalizando à temperatura de 12°C. Como controles positivos foram utilizados DNA genômico de filhotes de *Gallus gallus* experimentalmente infectados por *Plasmodium gallinaceum* cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou — CPqRR, Belo Horizonte, MG. Como controle negativo, adicionou-se água ultrapura estéril nas mesmas condições em que as amostras de campo foram adicionadas aos seus respectivos microtubos.

O produto da PCR (8μl) foi adicionado a uma solução tampão (1,6 μL) contendo azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30% e água e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante em tampão TBE-1X. A eletroforese foi executada por 45 min a 180 volts e foi aplicado um peso molecular de 1kb (Ludwig®) como marcador da altura dos fragmentos. O gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 0,5% por 10 min, corado por nitrato de prata 2,3% durante 15 min e revelado em formaldeído 3% e hidróxido de sódio 37,5% (Sanguinetti *et al.*, 1994)

4.6.2. Caracterização molecular e riqueza dos gêneros de hemosporídeos em amostras com diagnóstico positivo

As amostras positivas para *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus*, de acordo com a PCR preliminar descrita por Fallon (2003), foram submetidas à *Nested-PCR* para amplificação de um fragmento de 478 pb que abrange parte do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade b (*cyt-b*). Para as reações utilizaram-se primers (Quadro 2) descritos por Hellgren *et al.*, (2004) e Bensch *et al.*, (2000):

Quadro 2 - Iniciadores para caracterização genética de *Haemoproteus spp* e *Plasmodium spp*. De acordo com Hellgren *et al.*, (2004) e Bensch *et al.*, (2000).

cyt b - Iniciadores Externos	HaemNFI	5'- CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'
	HaemNR3	5'- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'
cyt b - Iniciadores Internos	HaemF	5'- ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'
	HaemR2	5'- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'

Para a primeira reação de PCR foram utilizados 2 μ L de DNA, com concentração entre 40 e 80 ng/ μ L, em um volume total de 25 μ L do mix de reação contendo: 1X de solução tampão IO (Phoneutria®); 3 mM MgCl₂ (Phoneutria®); 0,125 mM dNTP (Ludwig®); 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,4mM dos iniciadores HaemNFI e HaemNR3 e água ultrapura estéril qsp. O programa da primeira reação consistiu em 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, seguida de anelamento a 50°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 min e a extensão final a 72°C por 10 min, finalizando-se a temperatura de 4°C. Posteriormente, 1 μ L do produto amplificado foi adicionado a 24 μ L do mix de reagentes da segunda reação em concentrações idênticas às descritas para primeira reação. A diferença entre as duas reações está nos iniciadores utilizados, HaemF/HaemR2 para a segunda reação. As condições da segunda reação foram similares à primeira, consistindo, porém, em 35 ciclos. A utilização dos controles positivos e negativos para hemossporídeos seguiu os mesmos critérios da PCR de diagnóstico, assim como a revelação do material amplificado.

Amostras com fragmentos positivos em gel de acrilamida foram submetidas ao processo de purificação a fim de eliminar o excesso de iniciadores, impurezas e bandas inespecíficas de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Para isso, 50 μ L do amplicon da *Nested*-PCR foram transferidos para novos tubos, aos quais adicionou-se o mesmo volume de PEG8000 (polietilenoglicol 20%) sendo o material mantido a 37° C por 15 min. As amostras foram centrifugadas para a remoção e descarte do sobrenadante seguindo-se duas lavagens em etanol 80% (5 min a 20.000 x g), ao final da purificação o DNA foi diluído em água ultrapura.

O produto foi sequenciado pelo método de Sanger (Sanger et al., 1977) em sequenciador automático capilar ABI 3730 DNA Analyser, sendo obtido uma sequência para cada um dos iniciadores. O produto da purificação com concentrações entre 3 e 10 ng/ μ L foram sequenciados utilizando-se a plataforma do Instituto de Pesquisa Rene Rachou – Belo Horizonte, MG. Utilizou-se 1 μ L de cada amostra purificada, 5,5 μ L de água ultrapura, 2,5 μ L BygDyeTerminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), juntamente com 1 μ L dos iniciadores internos descritos na *Nested*-PCR, totalizando 10 μ L de volume final. A reação de sequenciamento apresentou as seguintes etapas: 1 min a 94° C antes da reação cíclica, a qual é constituída de 35 ciclos de 15 s a 96° C, 15 s a 50° C e 4 min a 60° C. Por fim, as corridas foram feitas em capilares de 50cm utilizando o polímero POP7 e as sequências são analisadas pelo *software* Sequencing Analysis 5.4 utilizando o Base Caller KB.

4.6. 3 Análise filogenética dos hemossporídeos aviários

A qualidade e edição das sequências de hemsporídeos obtidas foi avaliada utilizando o *software* ChromasPro (Technelysium Pty Ltd) que também permitiu avaliar a presença de coinfeções a partir da análise da ocorrência de sobreposição de ácidos nucleicos no cromatograma. As sequências obtidas foram comparadas àquelas depositadas em bancos de dados de livre acesso como o Genbank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e o MalAvi [(Bensch et al. 2009) - <http://mbioserv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>]. Destes bancos de dados, foram recuperadas sequências para as análises filogenéticas, sendo selecionadas as que apresentam associações a morfoespécies já descritas. Para a reconstrução filogenética dos hemsporídeos, as sequências foram alinhadas utilizando-se o *software* MEGA11, sendo considerada a divergência em um ou mais nucleotídeos suficientes para a descrição de linhagens distintas do *cyt-b* (Bensch et al., 2004). Além disso, a presença de picos duplos nas sequências obtidas pode ser considerada coinfeções por diferentes espécies de hemsporídeos, de modo que amostras que apresentaram picos duplos foram excluídas desta análise. Para as inferências filogenéticas por análise bayesiana foi utilizado o *software* Mr. Bayes 3.2.7. (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), aplicando-se o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + R + 1 definido a partir de análise no ModelTest (Posada & Crandall, 1998). Foram executadas duas cadeias Markov simultaneamente por 5.000.000 gerações, amostradas a cada 1000 gerações. As primeiras 1.250 (25%) árvores foram descartadas e as árvores remanescentes foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores. Como grupo externo foi utilizado o parasito *Leucocytozoon cariname* (Vieira et al., 2023).

4.6.4. Diagnóstico molecular de Filarídeos

O diagnóstico molecular para detecção de filarídeos foi realizado em parceria com o Museu Nacional de História Natural (MNHN) utilizando-se PCR em tempo real (qPCR) com novos iniciadores desenvolvidos pelo grupo da Dra. Coralie Martin do MNHN (Quadro 3) que amplificam um fragmento (970pb) do gene ribossomal 28S. Para a execução da PCR quantitativa foram utilizados 5 µL Mastermix 2X (kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit – Bioline), 1 µL dos iniciadores a 5mM, 2 µL da amostra de DNA e 2 µL água ultrapura estéril qsp. Como controle positivo foi aplicado DNA de *Litosomoides sigmodontis* extraído da cultura do parasito mantida em *Meriones unguiculatus*. O sangue de roedores não infectados por nematódeos e H₂O ultrapura foram usados como controle negativo nas reações.

Quadro 3 – Novos iniciadores para o diagnóstico de filarídeos.

28S – Iniciadores	F_q28SF3	5'-TAGAGTCGGGTTGTTTGAGATTG-3'
-------------------	----------	-------------------------------

	F_q28SR3	5'-TTCCCTCACGGTACTTGTTTG-3'
--	----------	-----------------------------

A amplificação foi realizada em termociclador LightCycler®480 (Roche), no qual a reação foi submetida a 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s, seguida de anelamento a 59°C por 5 s e extensão a 72°C por 10 s. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 10 min e a extensão final a 65°C por 1 min. A curva de positividade foi estabelecida a partir da menor concentração do controle positivo capaz de ser detectada na reação. Duplicatas de todas as amostras foram realizadas a fim de evitar resultados falsos positivos e negativos.

As amostras com resultados inconclusivos, com base na discrepância entre as curvas de positividade das duplicatas das amostras, foram submetidas a PCR digital (d-PCR) para confirmação do diagnóstico. A d-PCR foi conduzida em termociclador C100 (Biorad), sendo utilizado 11 µL de QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix 1X, 1 µL de cada primer a 250nM, 4 µL da amostra de DNA a 1ng e 6 µL água ultrapura estéril qsp. A d-PCR foi realizada com o mesmo par de iniciadores da qPCR, iniciando a reação a 95 °C por 2 min para desnaturação. Em seguida, foram realizados 40 ciclos, incluindo uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 s seguida de anelamento a 59°C por 15 s e uma etapa de extensão a 72°C por 15 s. Ao final dos ciclos, as amostras foram resfriadas a 40°C por 5 min para obtenção dos resultados, que foram comparados com a qPCR para o diagnóstico final.

4.6.5. Caracterização molecular e riqueza de filarídeos

A caracterização de Onchocercidae foi determinada a partir da amplificação dos genes mitocondriais *12S* e *COX1*, por *Nested-PCR*, e a amplificação do gene nuclear *18S*, por PCR convencional. O produto destas amplificações foi avaliado em gel de agarose 1,3% na presença de 2 µL de Gel Red (Biotium®). Após a solidificação do gel, 2 µL de peso molecular e 4 µL do produto amplificado foram adicionados a 2 µL de tampão de corrida de eletroforese e o gel foi submetido a 80v por 30 min. As amostras positivas foram sequenciadas pelo método de Sanger, seguindo os padrões da empresa Eurofins – França.

Os iniciadores estão indicados abaixo (Quadro 4) e as condições das reações foram descritas por Casiraghi e colaboradores (2001) e Lefoulon e colaboradores (2015)

Quadro 4 – Iniciadores utilizados para caracterização genética dos genes *12S*, *CoxI* e *18S* de oncocercídeos segundo Casiraghi et al., (2001) e Lefoulon et al., (2015).

12S – Iniciadores Externos	12SdegF2/	5'-ATTACYTATTYTTAGTTTA-3'
	12SnemR2	5'-CTACCATACTACAACCTTACGC-3'
12S – Iniciadores Internos	12SF/	5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3'
	12SdegR	5'-ATTGACGGATGRTTTTGTACC-3'
CoxI – Iniciadores Externos	FCo1extdF1	5'-TATAATTCTGTTYTDACTA-3'
	FCo1extdR1	5'-ATGAAAATGAGCYACWACATAA-3'
CoxI – Iniciadores Internos	COIntF/	5'-TGA TTG GTG GTT TTG GTA A-3'
	COIntR	5'-ATA AGT ACG AGT ATC AAT ATC-3'
18S – Iniciadores	F18ScF1	5'-ACCGCCCTAGTTCTGACCGTAAA-3'
	F18ScR1	5'-GGTCAAGCCACTGCGATTAAAGC-3'

4.6.6. Análise filogenética dos filarídeos

Os cromatogramas foram analisados no *software* ChromasLite 2.6, a fim de aferir a qualidade dos mesmos e a ausência de picos duplos indicando coinfeção. Foram selecionadas sequências depositadas previamente nos bancos de dados do GENBANK e nos arquivos do MNHN. Para a reconstrução filogenética, foram utilizadas sequências dos genes *12S*, *COXI*, *18S*, *28S*, *hsp70*, *myoHC* e *rbp1* obtidas neste estudo e armazenadas nos bancos genéticos. As sequências foram alinhadas no programa MAFFT (Katoh, 2002; Katoh & Toh, 2008) e os modelos evolutivos foram escolhidos com auxílio do *software* JmodelTest2 (Darriba et al., 2012). Utilizando o critério de informação Akaike (AIC) foi definido qual seria o modelo mais adequado para cada conjunto de gene.

Para os genes *COXI*, *hsp70*, *12S* e *28S*, o modelo evolutivo GTR+I+ Γ foi o mais indicado; GTR+ Γ foi o mais adequado para os genes *MyoHC* e *rbp1*, e o *18S* foi analisado a partir do modelo K80+I+ Γ . A reconstrução da filogenia, com base em sequências concatenadas de diferentes genes, foi realizada a partir do *software* Mr. Bayes, seguindo os mesmos padrões descritos para os hemosporídeos (Lefoulon et al., 2015). Como grupo externo as espécies *Filaria latala* (Chabaud & Mohammad, 1989) e *Protospirura muricola* (Gedoelst, 1916) foram utilizadas.

4.7. Análises estatísticas

Os dados biológicos das aves e das análises morfológicas e moleculares dos hemoparasitos foram tabulados em uma planilha utilizando o *software* Excel (2010). Análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa R, versão 4.2.3., e foram considerados valores significativos de $p < 0,05$. A prevalência de hemosporídeos e filarídeos durante os 12 meses de captura foi avaliada não considerando os indivíduos recapturados, a fim de evitar que um mesmo indivíduo fosse amostrado duas vezes.

Para verificar quais fatores poderiam influenciar a prevalência de hemosporídeos na comunidade aviária de Florestal, a probabilidade de infecção do indivíduo foi modelada em função de características individuais, como idade, presença de ectoparasitos, placa de incubação e muda. Além disso, o modelo foi construído em função de características climáticas, como a média de precipitação e temperatura mensal do mês em que a ave foi capturada e o comportamento em nível de espécie, como hábito alimentar e migratório. Não foi possível coletar informações individuais para todas as aves em campo, portanto, foram removidas do conjunto de dados os indivíduos com dados não preenchidos.

O Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) foi utilizado incorporando as variáveis sexo e espécie do hospedeiro como efeito aleatório. A situação de infecção da ave foi definida como variável resposta binária (0: não infectado; 1: infectado) e estruturado como um ensaio de Bernoulli com distribuição binomial e função de ligação logit. Um modelo completo foi elaborado utilizando a função ‘glmer’ do pacote lme4 (Bates et al., 2015). Como variáveis explicativas, as características individuais (presença de placa, muda e ectoparasitos), climáticas (estação do ano, pluviosidade e temperatura) e comportamentais da espécie (ave migratória ou residente, hábito alimentar) foram considerados fatores fixos e sem interações. Um modelo nulo foi utilizado para confirmar a significância do nosso modelo completo e assim, selecionar as variáveis-resposta que poderiam estar associadas à probabilidade de infecção das aves por hemoparasitos.

Desse modo, diferentes modelos foram construídos a partir da remoção das variáveis que não apresentaram resultados significativos; para isso foi utilizada a função ‘drop1’ do pacote lme4, até que o modelo indicasse apenas os preditores com valores significativos ($p < 0,05$). Com essa exclusão foram gerados outros dois modelos, além do completo e nulo, e ao comparar o Critério de Informação de Akaike (AIC) gerados para cada um deles, foi considerado o modelo com menor AIC adequado aos dados trabalhados.

A função ‘r.squaredGLMM’, no pacote ‘MuMIn’ (Nakagawa & Schielzeth, 2013) foi utilizada para calcular o R^2 marginal (R^2_m) eem condicional (R^2_c) para o modelo final; o R^2_m

fornece o percentual de variância da variável resposta explicado pelos fatores fixos, enquanto o R^2 c fornece o percentual total de variância explicado pelo modelo completo. A função 'icc', do pacote 'sjstats' (Wu et al., 2012), indica porcentagem da variância residual explicada por cada fator aleatório, espécie e sexo.

Para as amostras positivas por filarídeos não foi utilizado GLMM devido à baixa prevalência e ausência de dados individuais da maioria dos hospedeiros infectados por esses parasitos. Desse modo, optou-se por verificar se houve diferença estatisticamente significativa na prevalência entre as estações seca e chuvosa; para isso foi realizado o teste chi-quadrado, aplicando-se a função "chisq.test" no R.

5. Resultados

5.1. Perfil das aves amostradas

No período de 12 meses foram capturadas 467 aves, distribuídas em sete ordens (Apodiforme, Passeriformes, Coraciiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Psittaciformes, Galbuliformes) totalizando 24 famílias, 67 gêneros e 84 espécies (Apêndice A). Passeriformes foi a ordem mais amostrada (89,3%), com grande abundância de indivíduos da família Thraupidae com 226 aves (48,5%) (Gráfico 1).

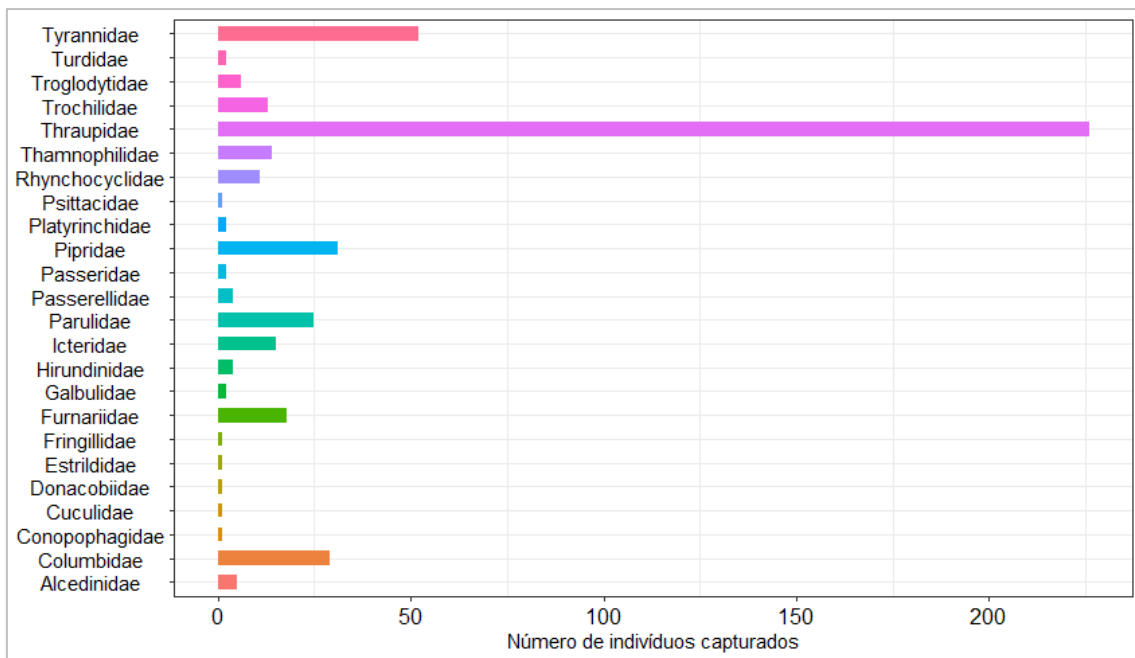


Gráfico 2 - Distribuição das famílias de aves capturadas.

As 84 espécies amostradas apresentaram diferentes comportamentos e funções ecológicas. Dentre as espécies avaliadas, oito apresentam comportamento migratório e 76 são consideradas espécies residentes. Além disso, os animais foram distribuídos em sete guildas alimentares, sendo classificadas como aves nectarívoras, frugívoras, insetívoras, onívoras, granívoras, herbívoras e carnívoras; entretanto, o comportamento alimentar de algumas espécies não se restringiu a apenas a um tipo de dieta (Figura 7).

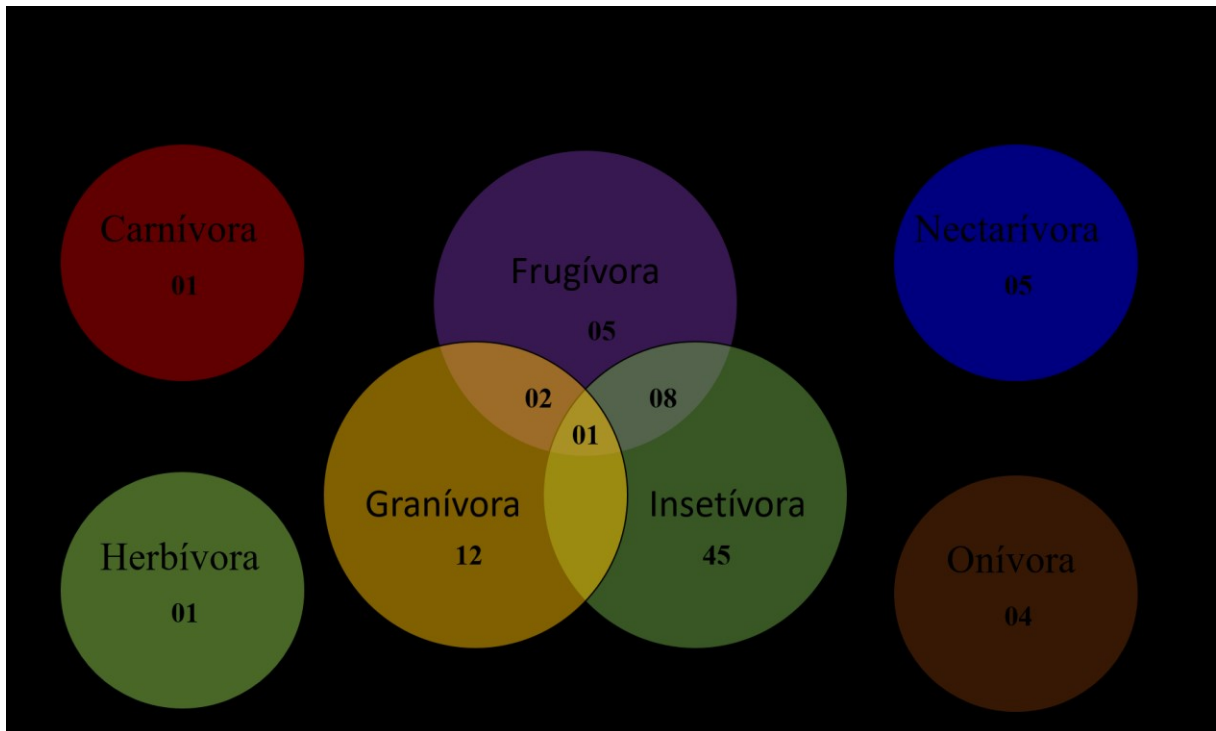


Figura 7 - Distribuição de espécies de aves por guildas alimentares. O diagrama expressa as diferentes guildas alimentares observadas nas aves capturadas em Florestal e a relação do número de espécies que podem apresentar tal comportamento alimentar.

Das espécies amostradas, cinco se destacam por apresentar 20 ou mais indivíduos capturados neste estudo: *Sicalis flaveola* (n=88), *Volatinia jacarina* (n=66), *Manacus manacus* (n=25), *Columbina talpacoti* (n=24) e *Myiothlypis flaveola* (n=20). O sangue de 456 indivíduos foi armazenado em papel filtro para as análises moleculares. Outros 11 indivíduos não tiveram sangue coletado devido a diferentes causas, como volume insuficiente para a extração de DNA, animais liberados antes da coleta de sangue em favor do bem-estar da ave e por escaparem durante o processamento e coleta de dados.

5.2. Prevalência e diversidade de hemosporídeos na avifauna amostrada

Das 456 aves avaliadas para a presença de hemosporídeos, 64 (14%) apresentaram diagnóstico positivo para *Plasmodium/Haemoproteus*. Os animais infectados pertenceram a 24 espécies, sendo as maiores prevalências observadas em duas das cinco espécies mais amostradas, *C. talpacoti* com 80% dos espécimes infectados (19/24) e *V. jacarina* com 19,6% (13/66). Em contrapartida, a espécie mais abundante, *S. flaveola*, apresentou apenas 5,9% dos indivíduos infectados. As 64 aves positivas para hemosporídeos detectadas pela PCR foram avaliadas por microscopia óptica e, destas, 30 (46,9%) evidenciaram formas eritrocíticas de hemosporídeos, cuja morfologia foi caracterizada (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de indivíduos diagnosticados positivos para hemosporídeos.

Espécie	Diagnóstico molecular (PCR)	Diagnóstico microscópico (Esfregaço sanguíneo)
<i>Arremon flavirostris</i> (n=4)	1	0
<i>Certhiaxis cinnamomeus</i> (n=3)	1	0
<i>Chrysomus ruficapillus</i> (n=11)	1	1
<i>Coereba flaveola</i> (n=5)	1	0
<i>Columbina minuta</i> (n=2)	2	2
<i>Columbina talpacoti</i> (n=24)	19	15
<i>Coryphospingus pileatus</i> (n=7)	1	1
<i>Dysithamnus mentalis</i> (n=4)	1	0
<i>Formicivora rufa</i> (n=1)	1	0
<i>Furnarius figulus</i> (n=4)	1	0
<i>Lathrotriccus euleri</i> (n=10)	1	0
<i>Myiarchus ferox</i> (n=5)	3	2
<i>Myiodynastes maculatus</i> (n=2)	1	1
<i>Myiothlypis flaveola</i> (n=20)	1	0
<i>Pitangus sulphuratus</i> (n=2)	1	1
<i>Pyriglena leucoptera</i> (n=2)	1	1
<i>Sicalis flaveola</i> (n=85)	5	0
<i>Sporophila caerulescens</i> (n=2)	1	0
<i>Stilpnia cayana</i> (n=5)	2	2
<i>Tachyphonus coronatus</i> (n=2)	1	0
<i>Thamnophilus caerulescens</i> (n=4)	2	0
<i>Thraupis sayaca</i> (n=6)	2	2
<i>Troglodytes musculus</i> (n=5)	1	0
<i>Volatinia jacarina</i> (n=66)	13	2

Dentre as 64 amostras positivas para hemosporídeos detectadas a partir do diagnóstico molecular, foram obtidas 27 (42%) sequências de um fragmento de 478pb do *cyt-b*, com qualidade adequada para a determinação de linhagens e/ou espécies de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* infectando diferentes espécies de aves hospedeiras (Tabela 3). Três novas linhagens e 11 sequências de organismos previamente registrados em bancos de dados, Genbank e Malvi, foram recuperadas. Das linhagens identificadas, oito foram associadas à suas morfoespécies e as sequências não evidenciaram a presença de picos duplos. Apesar de o sequenciamento não revelar coinfeções, dois indivíduos da espécie *V. jacarina* apresentaram em esfregaços sanguíneos diferentes morfotipos de gametócitos.

Tabela 3 - Linhagens e espécies de hemosporídeos de acordo com a família e espécie de aves hospedeiras.

Família	Espécie de hospedeiro	Gênero/Espécie dos Parasitos	Código de acesso GENBANK /Linhagem
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	<i>H. (H) paramultipigmentatus</i>	MK264406.1/SocH4 (n=2)
			KY304994.1/COTAL01 (n=6)
Icteridae	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	KY305005.1/PHPAT01 (n=1)
Passerellidae	<i>Arremon flavirostris</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	Nova linhagem (n=1)
Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	<i>P. cathemerium</i>	MT724420/GEOFOR01 (n=1)
	<i>Formicivora rufa</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	KP686108.1/FOMEL03 (n=1)
	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	JX021484.1/PYLEU01 (n=1)
Thraupidae	<i>Sporophila caerulescens</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	KY305005.1/PHPAT01 (n=1)
	<i>Stilpnia cayana</i>	<i>H. (H) coatneyi</i>	Nova linhagem (n=2)
	<i>Thraupis sayaca</i>	<i>H. (H) coatneyi</i>	MT724390.1/THRSAY01 (n=1) Nova linhagem (n=1)
	<i>Volatinia jacarina</i>	<i>P. juxtannucleare</i>	MH177857.1/PADOM11 (n=3)
		<i>Plasmodium</i> sp.	KY305006/LEPCOR05 (n=1) Nova linhagem (n=1)
Tyrannidae	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>P. cathemerium</i>	JX021461.1/MYITIR01 (n=1)
		<i>H. (H) coatneyi</i>	Nova linhagem (n=1)
	<i>Myiodynastes maculatus</i>	<i>P. cathemerium</i>	JX021461.1/MYITIR01 (n=1)
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	<i>P. cathemerium</i>	KY305002.1/PADOM09 (n=1)

5.2.1. Caracterização de *Haemoproteus* na avifauna amostrada

A integração de testes moleculares e análises morfológicas dos hemosporídeos permitiu o reconhecimento de 24 animais infectados por dois parasitos do gênero *Haemoproteus*: *Haemoproteus (Haemoproteus) coatneyi* e *H. (H). paramultipigmentatus*. A análise das sequências indicou uma nova linhagem de *H. (H). coatneyi*, encontrada em três espécies de hospedeiros (tabela 3) e um haplótipo conhecido (THRSAY01) infectando *Thraupis sayaca*. Duas linhagens de *H. (H). paramultipigmentatus* foram observadas em oito aves da espécie *C. talpacoti*, sendo uma linhagem encontrada no final da estação chuvosa e outra no final da seca e início da chuvosa. Outros 11 indivíduos do gênero *Columbina* apresentaram formas

sanguíneas idênticas à espécie *H. (H). paramultipigmentatus* observada em indivíduos infectados.

A avaliação de esfregaços sanguíneos dos indivíduos infectados por linhagens de *H. (H). coatneyi* permitiu a visualização de gametócitos característicos do grupo (Figura 8), em todos os cinco indivíduos sequenciados. Os gametócitos desta espécie crescem lateralmente ao redor do núcleo, podendo deslocá-lo levemente e, quando alcançam a maturidade ficam em contato direto com o núcleo e a membrana do eritrócito. Geralmente possuem forma de halter e suas extremidades se expandem até os polos da hemácia; um número médio de 11 pigmentos maláricos distribuídos pelo citoplasma do parasito também foi observado.

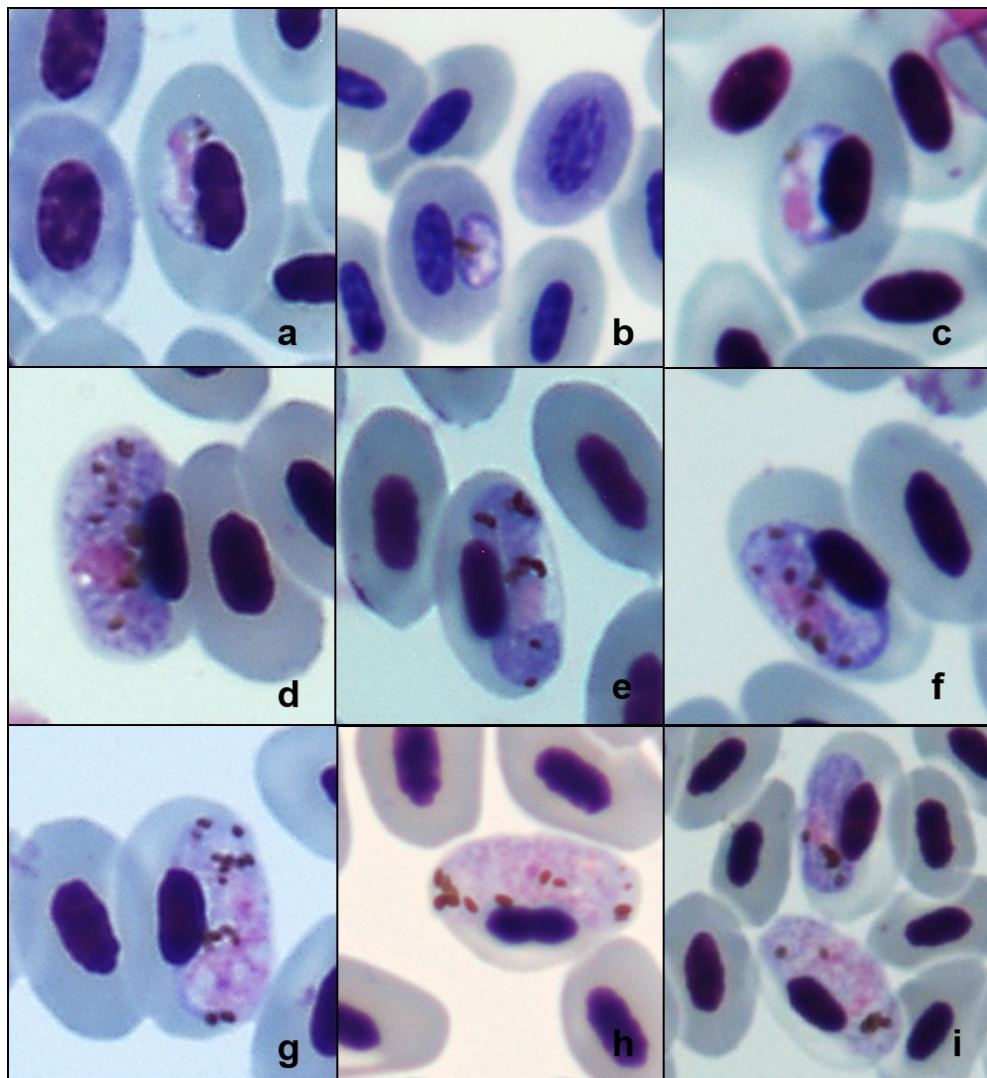


Figura 8 – Formas sanguíneas de *Haemoproteus (H) coatneyi* em *Stilpnia cayana*: gametócitos jovens (a-c), macrogametócitos (d-f e i) e microgametócitos (g-i).

Aves infectadas por *H. (H). paramultipigmentatus* (Figura 9) apresentaram gametócitos típicos da espécie, confirmando os resultados do sequenciamento do gene *cyt-b*. Gametócitos

de *H. (H). paramultipigmentatus* também foram verificados em esfregaços sanguíneos de 11 amostras não sequenciadas de *C. talpacoti* e *C. minuta*, constituindo a espécie mais prevalente neste estudo. Suas formas maduras envolvem parcialmente o núcleo das hemácias, mas sem encostar diretamente neste, alcançando geralmente as regiões polares da célula; podem apresentar vacúolos dispersos no citoplasma do parasito. Como o nome “paramultipigmentatus” sugere, esse parasito apresenta diversos pigmentos maláricos pequenos e dispersos por todo o citoplasma do parasito. Os microgametócitos apresentam estes pigmentos concentrados nas regiões polares, diferente dos macrogametócitos que exibem estas estruturas dispersas por todo seu citoplasma.

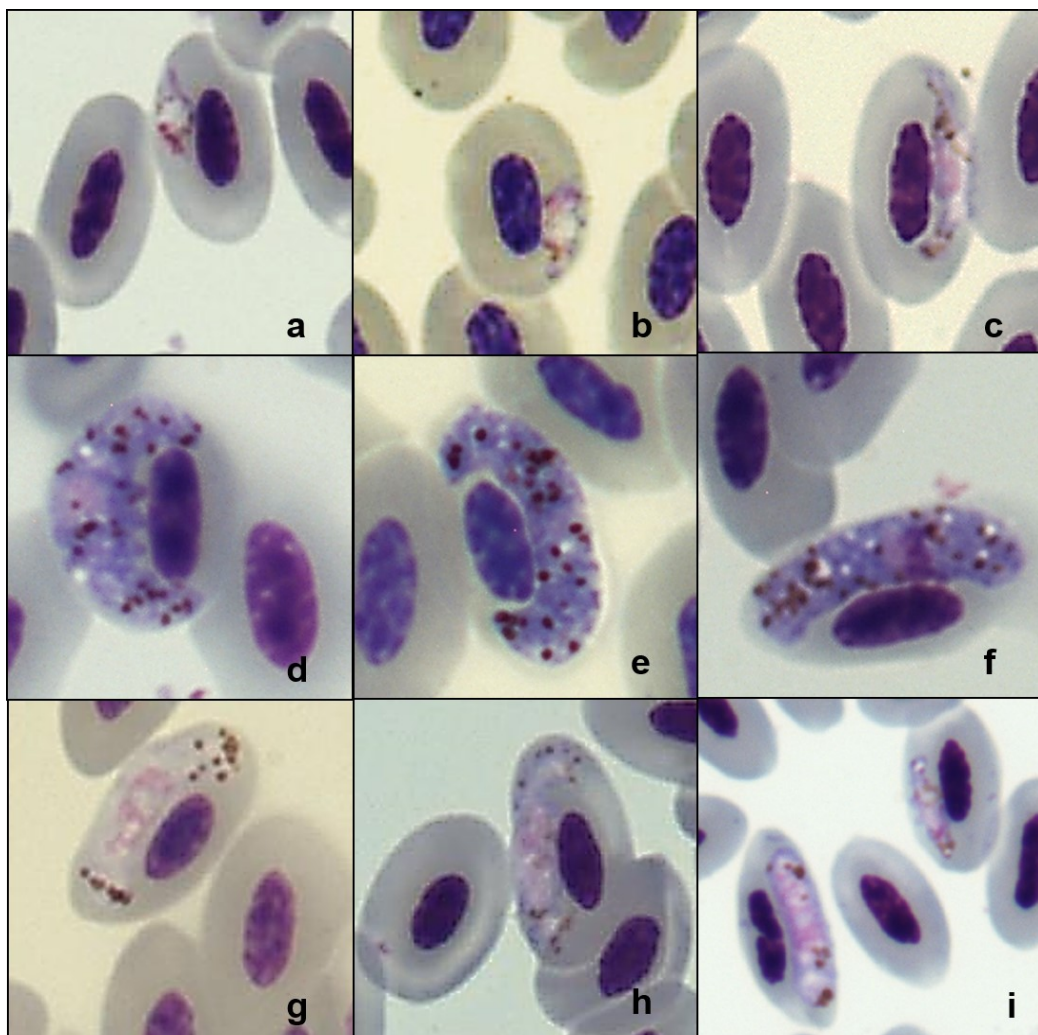


Figura 9 - Formas sanguíneas de *Haemoproteus (H) paramultipigmentatus* em *Columbina talpacoti*: gametócitos jovens nas imagens a – c; macrogametócitos d-f; microgametócitos g-i.

A análise das relações filogenéticas das linhagens dos parasitos do gênero *Haemoproteus* evidenciou dois clados distintos. O clado formado por linhagens de *H. (H). paramultipigmentatus* é ocupado por aves hospedeiras da ordem Columbiforme e o outro clado

contendo haplótipos de *H. (H). coatneyi* foi formado por um grupo monofilético de parasitos que infectam majoritariamente passeriformes (Figura 10). As duas linhagens encontradas neste estudo morfológicamente associadas ao *H. (H). coatneyi* apresentaram 97,70% de similaridade genética entre si e com o haplótipo padrão (acesso GENBANK: KF537309); entretanto, filogeneticamente a nova linhagem esteve mais relacionada a essa linhagem tipo. Por sua vez, a linhagem THRSAY01 constituiu um clado monofilético. As linhagens da espécie *H. paramultipigmentatus* (SocH4 e COTAL01) encontradas em Florestal apresentaram similaridade de 97,49% e estavam agrupadas em um clado com outras espécies que infectam majoritariamente aves não-passeriformes.



Figura 10 - Inferência filogenética Bayesiana reconstruída com base em linhagens de *Haemoproteus*. A filogenia bayesiana foi baseada em sequências do gene *cytb*, utilizando como grupo externo a espécie *Leucocytozoon cariamae*. A sequências encontradas neste trabalho são indicadas pela cor vermelha. O número de acesso do genbank está associado com o nome das espécies. O valor nodal de suporte na base dos clados indicam em porcentagem a probabilidade posterior.

5.2.2. Caracterização de *Plasmodium* spp na avifauna amostrada

Infecções por parasitos do gênero *Plasmodium* foram detectadas em 15 aves, das quais 10 linhagens foram recuperadas, sendo duas inéditas. Foi possível identificar em nível de espécie, por integração de dados morfológicos e moleculares, cinco linhagens de plasmódios já descritas anteriormente. Dentre estes haplótipos previamente depositados nos bancos de dados, um apresentou uma morfoespécie inédita; a avaliação dos esfregaços sanguíneos associados à linhagem PYLEU01 possibilitou a caracterização de uma nova espécie. Todavia, cinco linhagens não apresentam identificação com nenhuma morfoespécie depositada no GENBANK ou MalAvi; ressalta-se que a ausência de formas sanguíneas dos parasitos em esfregaços sanguíneos não permitiu a identificação ou descrição morfológica desses parasitos.

Três indivíduos da espécie *V. jacarina* apresentaram-se infectados por parasitos cujas sequências possuem 100% de similaridade com a linhagem PADOM11, já associada morfológicamente ao *Plasmodium juxtannucleare* (acesso GENBANK: MH177857.1). Entretanto, não foram observadas formas de desenvolvimento do parasito nos esfregaços sanguíneos, necessárias para a confirmação morfológica da infecção por parasitos desta espécie. Em um terceiro espécime foi recuperada uma linhagem nova com 99,79% de similaridade à sequência PADOM11, mas não possível identificar a morfoespécie já que não foram observadas as formas sanguíneas. O mesmo ocorreu para um quarto indivíduo que apresentou infecção pela linhagem LEPCOR05, mas sem formas detectadas em lâmina.

Um espécime de *Pitangus sulphuratus* apresentou infecção por uma linhagem com 100% de similaridade ao *Plasmodium cathemerium* PADOM09. Nesta amostra, foi possível encontrar formas sanguíneas como trofozoítos e microgametócitos (Figura 11) que correspondem à morfoespécie *P. cathemerium*. Adicionalmente, foram detectadas outras três sequências identificadas como as linhagens MYITYR01 (n=02) e GEOFOR01 (n=01), infectando hospedeiros diferentes; um indivíduo de cada uma das linhagens apresentou em lâmina parasitos com morfologia compatível à de *P. cathemerium*. A associação dos dados morfológicos e moleculares possibilitou determinar que as quatro aves em questão estavam infectadas por esta espécie de plasmódio, com três linhagens distintas ocorrendo na região.

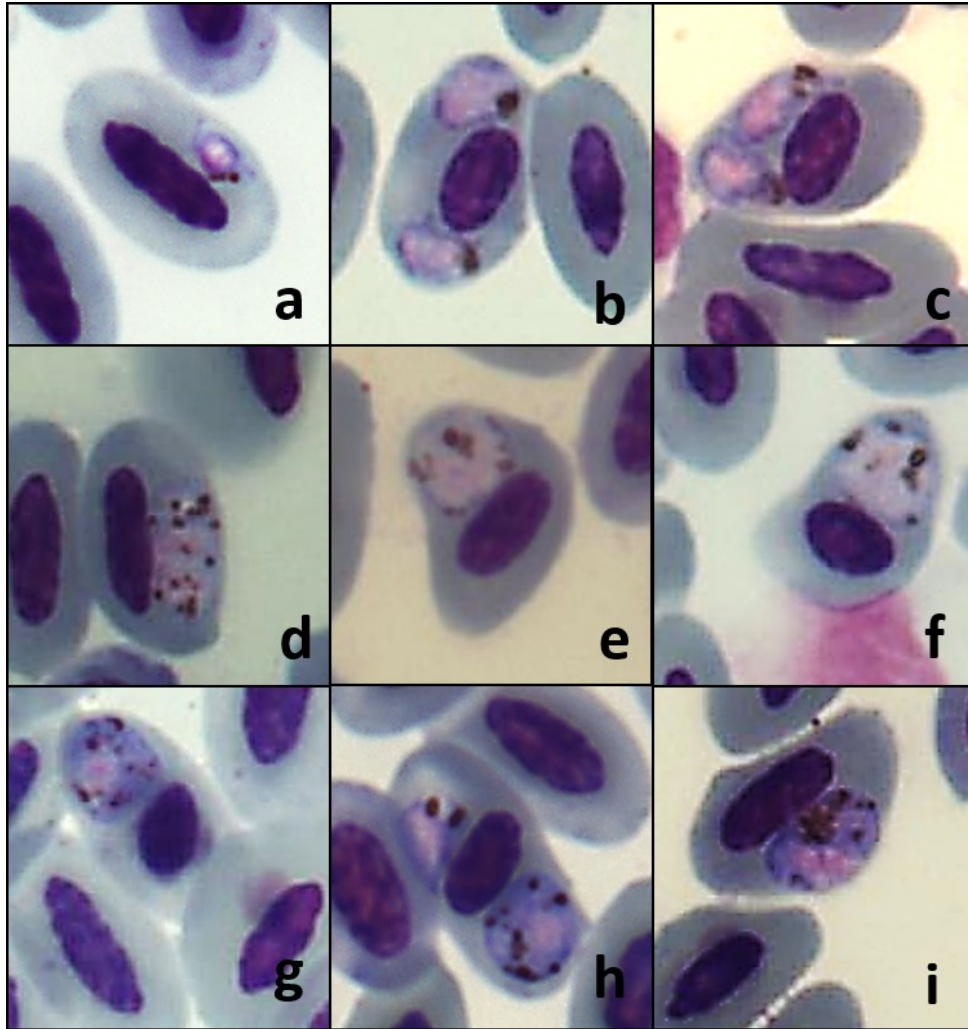


Figura 11 - Formas sanguíneas de *Plasmodium cathemerium*. As formas sanguíneas foram encontradas em esfregaços de três hospedeiros diferentes (*Pitangus sulphuratus*, *Myiarchus ferox* e *Myiodynastes maculatus*). Trofozoítos (a-c); microgametócitos (d-f); macrogametócitos (g-i).

Dentre as linhagens de *Plasmodium* encontradas em Florestal, cinco já tinham sido depositadas previamente em bancos de dados, mas não possuíam nenhuma associação com morfoespécies descritas. Os esfregaços sanguíneos das amostras foram exaustivamente avaliados, contudo, não foram detectadas formas de desenvolvimento do parasito, o que impediu a identificação em nível de espécie. As linhagens foram utilizadas para a reconstrução filogenética, se agrupando em diferentes clados e subgêneros de *Plasmodium* (Figura 12).

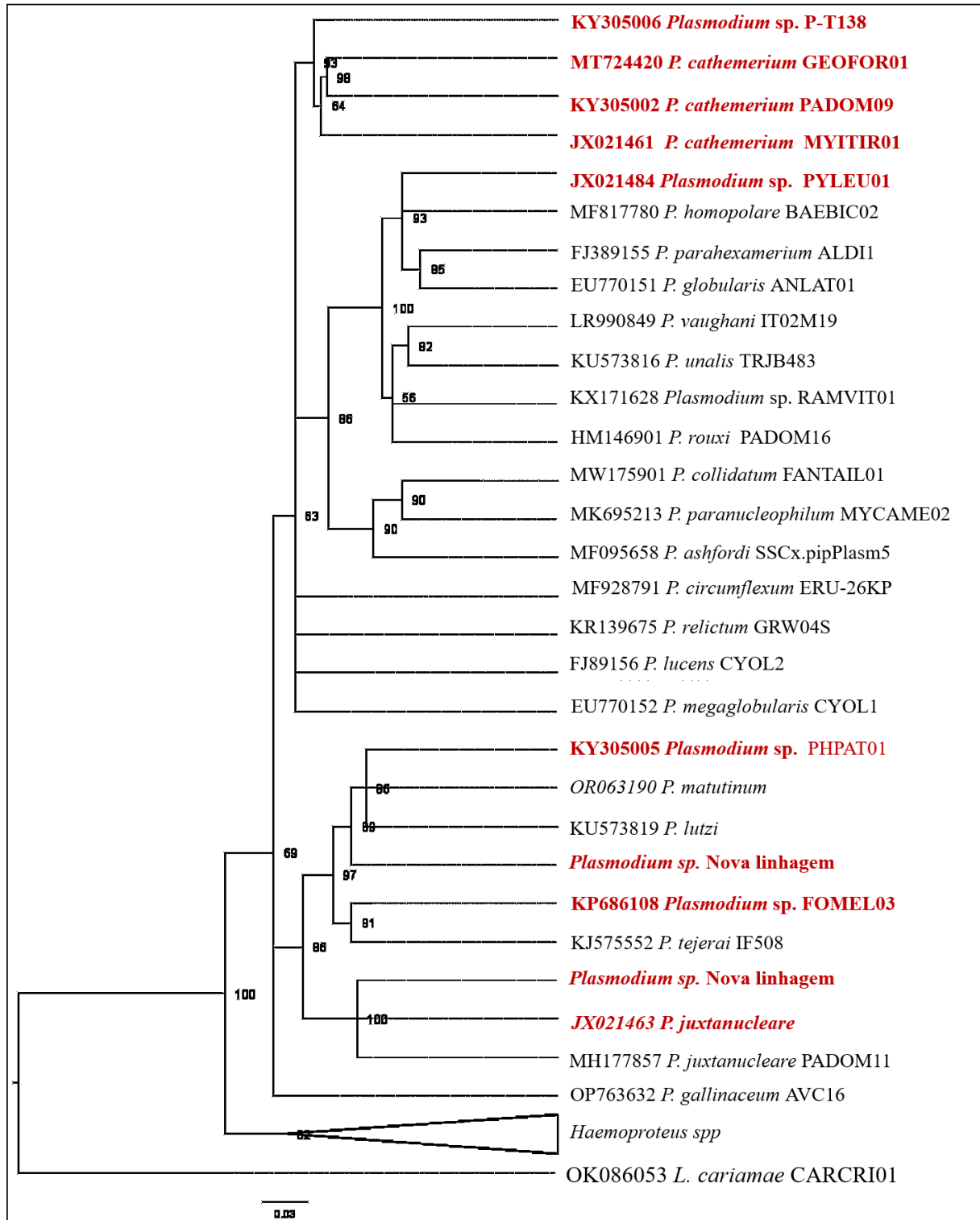


Figura 12 - Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de *Plasmodium* spp. A filogenia bayesiana foi baseada em sequências do gene *cytb*, utilizando como grupo externo a espécie *Leucocytozoon cariamae*. A sequências encontradas nesse trabalho são indicadas pela cor vermelha. O número de acesso do genbank está associado com o nome das espécies. Os valores de suporte na base dos cladogramas indicam em porcentagem a probabilidade posterior.

Uma das sequências recuperadas apresentou 100% de identidade genética com a linhagem PYLEU01 (acesso GENBANK: JX021484), ambas possuem como hospedeiros aves

da espécie *Pyriglena leucoptera*. A linhagem não está associada a nenhuma morfoespécie, sendo *Plasmodium homopolare*, linhagem BAEBIC02 (acesso GENBANK: MF817780), a espécie mais similar (95,82%). O exame do esfregaço sanguíneo desta amostra possibilitou observar todas as formas sanguíneas necessárias para a morfometria (Tabela 4) e identificação em nível de espécie (Figura 13), revelando dissimilaridade morfológica com o *P. homopolare*.

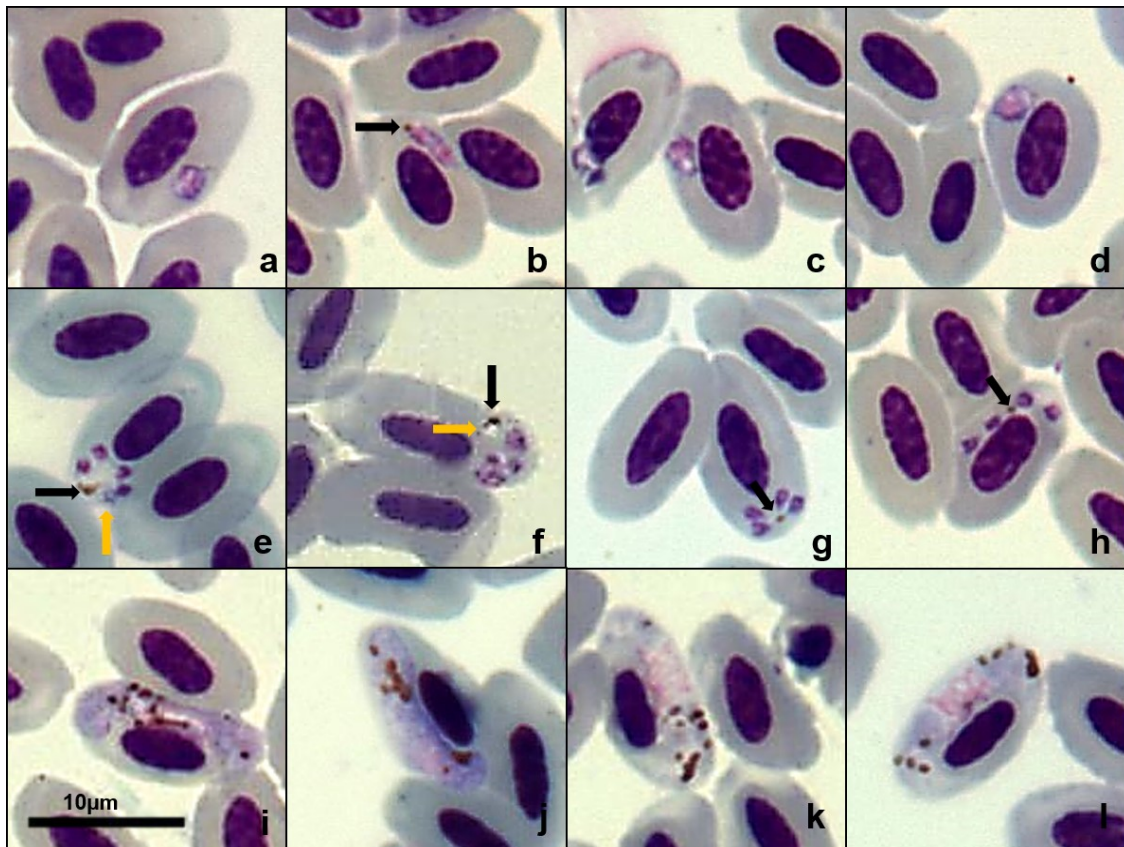


Figura 13 - Formas sanguíneas de *Plasmodium* n. sp em *Pyriglena leucoptera*. É possível observar todas as formas de desenvolvimento eritrocítico: trofozoítos (a-d); esquizontes (e-h); macrogametócitos (i e j); microgametócitos (k e l). As setas pretas apontam o pigmento malárico e as amarelas apontam um glóbulo sem cor ou azulado que acompanha os pigmentos em alguns esquizontes.

Trofozoítos: as formas jovens são comumente irregulares, mas foram observadas formas de anel e ovais, com um vacúolo nítido. Os trofozoítos maduros encontrados são amebóides e alongados, nos quais é possível ver a presença de um ou dois pigmentos maláricos médios ($>0,5\mu\text{m}$) nas extremidades, além disso, observa-se uma projeção de seu citoplasma. Os trofozoítos foram encontrados principalmente nas regiões polares e subpolares das hemácias, mas também podem ser localizados nas laterais, nunca encostando ou deslocando o núcleo.

Esquizontes: formas pequenas com citoplasma escasso sem ultrapassar o tamanho do núcleo da hemácia. Foram encontrados na região lateral, polar e subpolar do eritrócito, sem

deslocar seu núcleo. Os esquizontes possuem no máximo quatro núcleos, frequentemente com um pigmento malárico médio no centro ou em região oposta aos núcleos. Adicionalmente, foi observada a forma típica de “gravata borboleta”, descrita por Mohammed (1958). Nessas formas mais usuais notamos um glóbulo sem cor, ou raramente azulado, de tamanho similar ao pigmento malárico e sempre próximo a ele. Também foram identificados esquizontes com morfologia incomum, apresentando quatro núcleos em linha reta e um grânulo no meio. Foram observadas, raramente, esquizogonias exo-eritrocítica em trombócitos.

Gametócitos: são alongados, envolvendo o núcleo da hemácia até as regiões polares, comumente deslocando lateralmente o núcleo da célula e tocando-o. A diferenciação do micro e macrogametócitos é um processo laborioso, com base nos caracteres dimórficos dessas formas. Estão sempre em posição lateral e apresentam de 4 a 11 pigmentos maláricos, em média 08, com tamanhos médios e grandes (sempre maiores que $0,5\mu\text{m}$ e alguns podendo ultrapassar $1\mu\text{m}$) dispersos no citoplasma.

Tabela 4 - Dados morfométricos de *Plasmodium* n. sp. infectando *Pyriglena leucoptera*. Foram mensurados: comprimento, largura e área dos gametócitos, esquizontes e trofozoítos, assim como a área das hemácias infectadas e seu núcleo. Além disso, foram registradas as medidas de hemácias não infectadas (n=15). O número total de cada forma de desenvolvimento analisada está indicado na própria tabela

Gametócitos (n=23)	Medidas (μm)	Média e Desvio padrão (μm)
Comprimento	10,0 — 14,8	12,3 \pm 1,6
Largura	1,8 — 3,4	2,5 \pm 0,4
Área do parasito	23,7 — 44,0	33,6 \pm 5,5
Área da hemácia	57,2 — 75,8	65,5 \pm 4,9
Área do núcleo da hemácia	14,3 — 11,3	12,3 \pm 0,9
Esquizontes (n=18)		
Comprimento	3,2 — 5,0	3,9 \pm 0,4
Largura	1,0 — 4,3	2,3 \pm 0,9
Continuação da tabela 4		
Área	6,0 — 17,7	9,3 \pm 3,2
Área da hemácia	52,4 — 72,8	62,7 \pm 6,4
Área do núcleo da hemácia	9,4 — 15,2	12,8 \pm 1,45
Trofozoítos (n=14)		
Comprimento	2,0 — 4,3	2,8 \pm 0,7

Largura	1,2 — 1,9	1,6±0,3
Continuação Tabela 4		
Área	3,2 — 6,2	4,5±1,0
Área da hemácia	54,9 — 73,5	63,8±5,4
Área do núcleo da hemácia	12,5-16,9	15,0±1,29
Hemácias não infectadas		
Comprimento	10,2 — 13,3	11,4±0,8
Largura	6,0 — 7,7	6,7±0,5
Área total da hemácia	53,3 — 68,8	62,1±4,9
Área do núcleo da hemácia	10,9 — 18,6	13,3±1,8

A avaliação morfométrica revelou traços que se assemelham àqueles de *P. rouxi* (Sergent et al., 1928). Dentre as características em comum, destacam-se os trofozoítos com um ou dois pigmentos maláricos, esquizontes com citoplasma escasso, quatro núcleos e um pigmento malárico, comumente acompanhado de um glóbulo. Entretanto, gametócitos de *P. rouxi* possuem pigmento malárico concentrado na região polar, seu citoplasma não preenche as regiões polares dos eritrócitos e nem entram em contato com núcleo da célula. Também foi observado que o parasito registrado neste estudo é maior do que o descrito por Sergent e colaboradores (1928). Portanto, o conjunto das características do *P. rouxi* o diferem do parasito detectado em Florestal (Figura 15).

Tabela 5 - Dados morfométricos de *Plasmodium rouxi*, descrito por Sergent e colaboradores (1928) e concatenados por Laird (1962) e Valkiūnas (2005).

Gametócitos	Medidas (µm)	Média e desvio Padrão (µm)
Comprimento	7,0 — 12,0	10,0±0,3
Largura	1,0 — 2,7	2,0±0,2
Esquizontes		
Comprimento	1,2 — 4,9	3,0±0,2
Largura	0,7 — 3,0	1,8±0,2
Trofozoítos		

Comprimento	2 — 4	—
Largura	1 — 1,5	—

*Não foram encontradas informações relacionadas a média e desvio padrão das medidas dos trofozoítos.

Além das características morfológicas, a linhagem PYLEU01 diverge geneticamente mais de 5% das três sequências associadas a essa espécie, (acesso GENBANK: HM146901, HQ453998 e AY178904). Filogeneticamente esse parasito encontra-se em clado distinto das linhagens associadas ao *P. rouxi*, sendo observado seu agrupamento em um clado constituído por outras morfoespécies pertencentes ao subgênero *Plasmodium Novyella* spp. Estas diferenças morfológicas e genéticas detectadas sugerem que a linhagem PYLEU01, observada em *P. leucoptera*, seja uma espécie de *Plasmodium* ainda não descrita.

5.3. Prevalência e diversidade de filarídeos na avifauna amostrada

Para os estudos moleculares de filarídeos aviários, foram analisados 334 indivíduos que possuíam sangue em papel filtro; destes indivíduos examinados por qPCR e dPCR, 18 (5,38%) confirmaram infecção por filarídeos. Os esfregaços sanguíneos dos 467 indivíduos foram rigorosamente analisados para o diagnóstico microscópico de filarídeos, confirmando-se a presença de microfílarías no sangue periférico de oito animais. Das amostras positivas por microscopia, sete tiveram o diagnóstico confirmado molecularmente; apenas uma amostra positiva em lâmina não foi submetida a qPCR por ausência de sangue para extração de DNA.

Tabela 6 - Número de indivíduos diagnosticados positivos para filarídeos.

Espécie	Diagnóstico molecular (qPCR e dPCR)	Diagnóstico microscópico (Esfregaço sanguíneo)
<i>Antilophia galeata</i> (n=4)	1	0
<i>Columbina talpacoti</i> (n=24)	1	0
<i>Conopophaga lineata</i> (n=1)	1	0
<i>Coryphospingus pileatus</i> (n=7)	1	0
<i>Furnarius figulus</i> (n=4)	0	1
<i>Myiarchus ferox</i> (n=5)	1	0
<i>Myiarchus tyrannulus</i> (n=1)	1	0
<i>Myiodynastes maculatus</i> (n=2)	1	0
<i>Pitangus sulphuratus</i> (n=2)	1	0
<i>Platyrinchus mystaceus</i> (n=2)	1	0
<i>Sicalis flaveola</i> (n=85)	1	1
<i>Sporophila lineola</i> (n=9)	1	0

<i>Stelgidopteryx ruficollis</i> (n=2)	1	1
<i>Stilpnia cayana</i> (n=5)	3	3
<i>Synallaxis frontalis</i> (n=5)	1	1
<i>Turdus amaurochalinus</i> (n=2)	1	1
<i>Volatinia jacarina</i> (n=66)	1	0

Estes parasitos foram detectados em 16 espécies e nove famílias de aves, com destaque para Thraupidae e Tyrannidae com, respectivamente, sete e quatro representantes infectados por filarídeos. A partir do sequenciamento das amostras positivas para filarídeos foram recuperadas seis sequências do gene COX1, sete do gene 12S e 11 sequências do gene 18S (Tabela 7). Das 18 amostras positivas para filarídeos, 11 tiveram sequências obtidas para pelo menos um dos genes avaliados e foram comparadas aos dados depositados no Genbank e disponibilizados pelo MNHN. O sequenciamento do gene 18S apontou que todas as amostras pertencem à família Onchocercidae; por sua vez, o sequenciamento dos genes 12S e COX1 revelou um grupo monofilético com sete amostras que integram o gênero *Aproctella*, sendo possível identificar duas amostras em nível de espécie.

Tabela 7 - Linhagens de filarídeos pertencentes ao gênero *Aproctella* de acordo com a família e espécie de ave hospedeira, obtidas a partir da amplificação dos genes 12S e COX1.

Família do hospedeiro	Espécie do hospedeiro	18S	12S	COX1
Furnariidae	<i>Synallaxis frontalis</i>	Onchocercidae	<i>Aproctella</i> sp. FR827905.1	—
Hirundinidae	<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Onchocercidae	<i>Aproctella</i> sp. FR827905.1	<i>Aproctella</i> sp. FR823331.1
Pipridae	<i>Antilophia galeata</i>	Onchocercidae	—	—
Platyrrinchidae	<i>Platyrrinchus mystaceus</i>	Onchocercidae	<i>Aproctella</i> sp. FR827905.1	—
Thraupidae	<i>Sicalis flaveola</i>	Onchocercidae	<i>Aproctella</i> sp. FR827905.1	<i>Aproctella</i> sp. FR823331.1
	<i>Stilpnia cayana</i>	Onchocercidae	<i>Aproctella</i> sp. FR827900.1	<i>Aproctella</i> sp. FR823331.1

			FR827905.1	
Turdidae	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Onchocercidae	—	<i>Aproctella</i> sp. FR823331.1
Tyrannidae	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Onchocercidae	—	—
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Onchocercidae	—	—

Em um indivíduo das espécies *Stelgidopteryx ruficollis* (Hiruniidae) e *Sicalis flaveola* (Thraupidae) foi identificado o filarídeo da espécie *Aproctella alessandroi* (Figura 14) descrita por Bain e coloradores (1981) (código de identificação do MNHN: 117YU). Das outras amostras sequenciadas cinco pertencem ao gênero *Aproctella* infectando hospedeiros das espécies *Synallaxis frontalis* (n=1), *Stilpnia cayana* (n=3) e *Turdus amaurochalinus* (n=1); entretanto, não foi possível caracterizar a espécie.

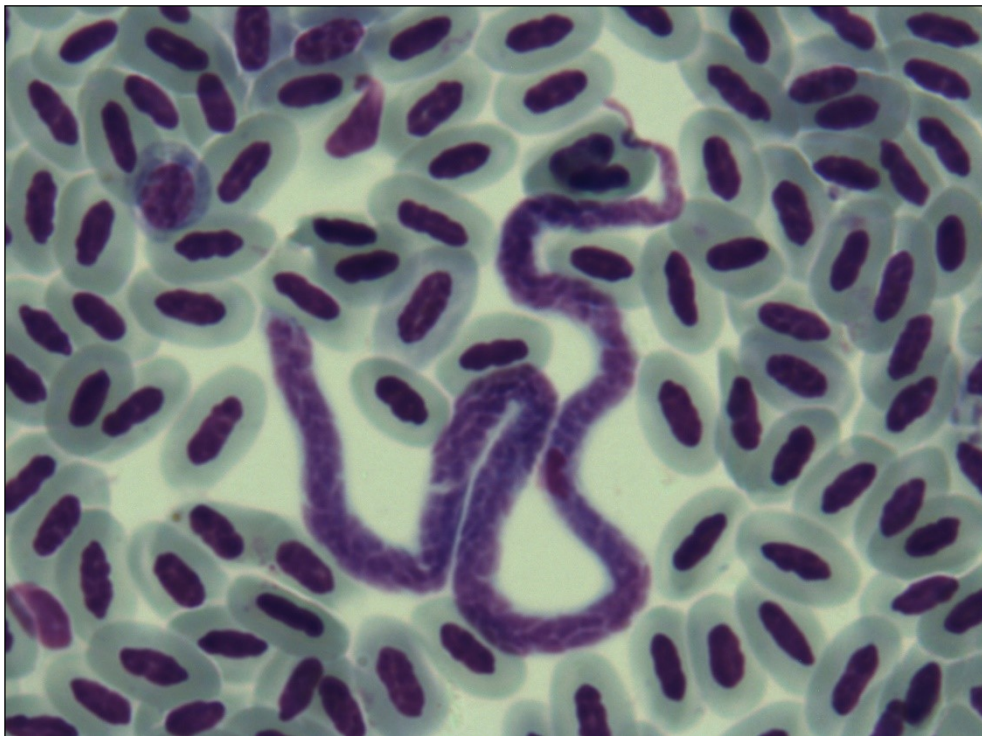


Figura 14 - Microscopia óptica evidenciando um espécime de *Aproctella alessandroi*. Microfilária observada por microscopia, 100X, em esfregaço sanguíneo de um indivíduo da espécie *Stelgidopteryx ruficollis*.

A reconstrução filogética dos filarídeos encontrados em Florestal (Figura 15) possibilitou identificar as duas amostras, como *A. alessandroi*, pois encontram-se agrupadas em um clado monofilético com sequências obtidas do banco de dados do MNHN. Como grupo irmão deste clado, posicionam-se outros indivíduos detectados em Florestal, pertencentes ao gênero

Aproctella sp., formando um grupo monofilético. Também é possível avaliar que este gênero compoe a subfamília Splendidofilariinae, um grupo com padrão polifilético. Essa conformação filogenética é consequência da falta de dados genéticos acerca dos filarídeos prejudicando, assim, o entendimento evolutivo desses organismos.

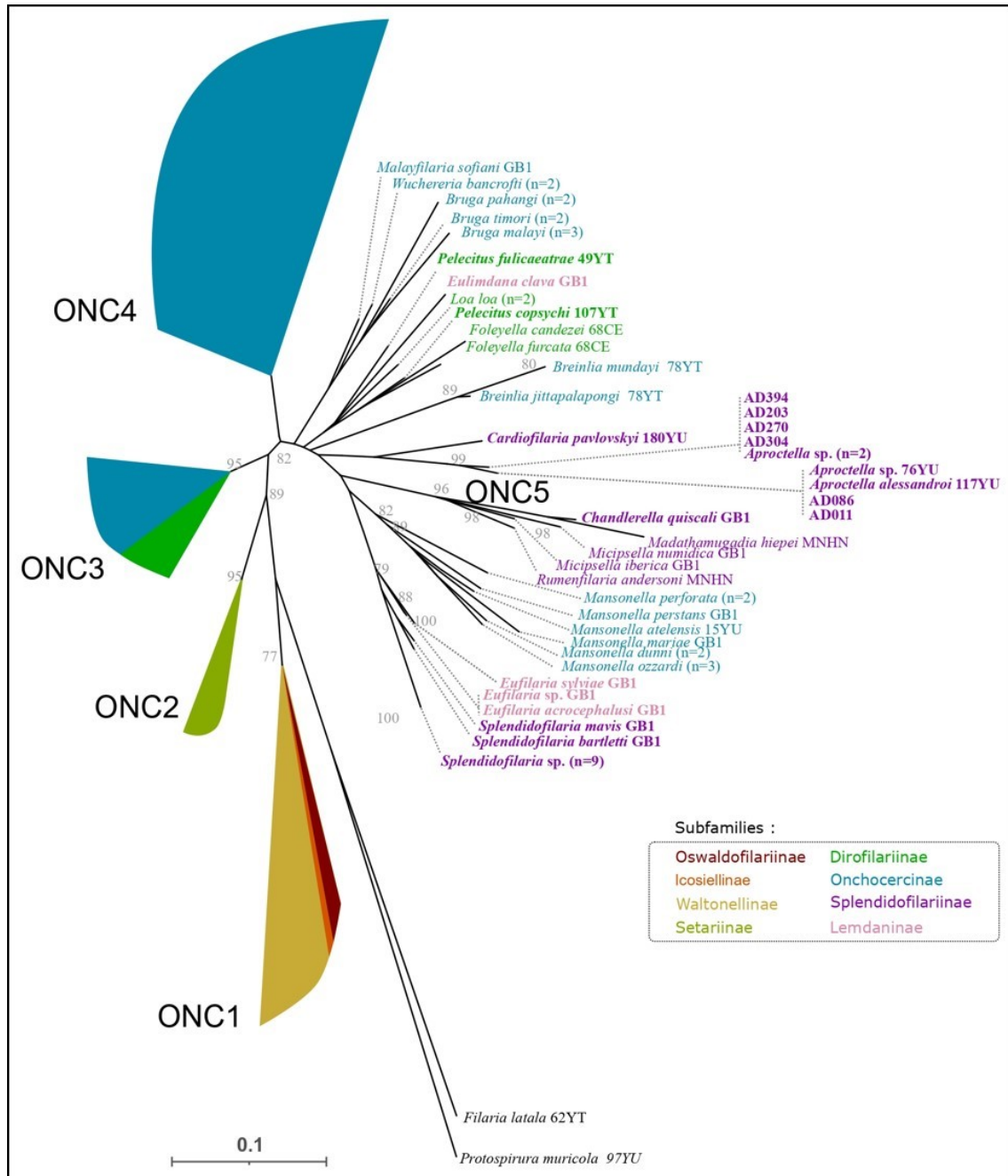


Figura 15 - Filogenia de Onchocercidae. As amostras deste trabalho estão representadas pelos códigos: AD011, AD086, AD203, AD270, AD304 e AD394. Todas formam um grupo monofilético no gênero *Aproctella*.

5.4. Coinfecção entre hemoparasitos

A associação das técnicas de diagnóstico morfológico e molecular permitiu a detecção de seis aves coinfectadas por hemosporídeos e filarídeos, restritas às famílias Thraupidae e Tyrannidae (Tabela 2). Dentre estes hospedeiros, a espécie *S. cayana* (Passeriforme: Thraupidae) apresentou dois espécimes com infecção concomitante por *H. coatneyi* e *Aproctella* sp. Por sua vez, entre as aves da família Tyrannidae as espécies *Pitangus sulphuratus*, *Myiarchus ferox* e *Myiodynastes maculatus* apresentaram-se infectadas por *Aproctella* sp. e *P. cathemerium*.

Tabela 8 - Animais coinfectados por hemosporídeos e filarídeos de acordo com a associação entre os métodos moleculares e/ou microscópicos.

ID	Espécie	P	H	F	HNI
AD082	<i>Columbina talpacoti</i>	-	-	+	+
AD270	<i>Stilpnia cayana</i>	-	+	+	-
AD0304	<i>Stilpnia cayana</i>	-	+	+	-
AD126	<i>Pitangus sulphuratus</i>	+	-	+	-
AD271	<i>Myiarchus ferox</i>	+	-	+	-
AD311	<i>Myiodynastes maculatus</i>	+	-	+	-
AD187	<i>Volatinia jacarina</i>	+	-	-	+
AD208	<i>Volatinia jacarina</i>	+	-	-	+

ID= Identificação da Ave; P = *Plasmodium* spp, H = *Haemoproteus* spp, F = Filarídeo; HNI = hemosporídeo não identificado.

Um espécime de *C. talpacoti* testou positivo em PCR para a presença de oncocercídeos e hemosporídeos, sem exibir formas sanguíneas dos parasitos em esfregaço sanguíneo. Dois indivíduos de *V. jacarina*, cujo sequenciamento de material proveniente de seu sangue indicou infecção única para *P. juxtannucleare* (PADOM11) e *Plasmodium* sp. (nova linhagem), apresentaram em microscopia óptica gametócitos com diferentes morfologias, o que sugere ocorrência de coinfecção (Figura 11); devido à baixa parasitemia não foi possível identificar morfologicamente as espécies de hemosporídeos encontradas.

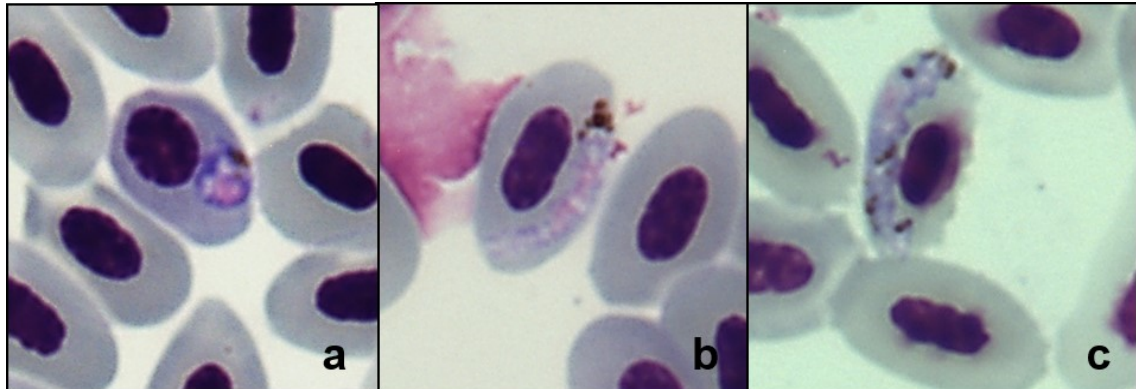


Figura 16 - Esfregaço sanguíneo de um espécime de *V. jacarina* indicando coinfeção por hemosporídeos. Nas figuras a e b observa-se dois gametócitos encontrados em um indivíduo da espécie; na imagem c outra ave da mesma espécie que apresenta gametócito com morfologia não associada à caracterização molecular.

5.5. Variáveis preditoras da ocorrência de hemosporídeos

A análise do GLMM indicou que dentre as variáveis explicativas apenas a ocorrência de muda e placa de incubação são preditores correlacionados à presença de hemosporídeos na comunidade de aves amostrada em Florestal (Tabela 9). Os valores de R^2 ($R^2_m = 0,3231825$ e $R^2_c = 0,5915841$) e $ICC = 0,397$ indicam que as variáveis aleatórias (sexo e espécie) apresentam forte influência na ocorrência de hemosporídeos. As demais variáveis ambientais (estação do ano, pluviosidade e temperatura), comportamentais (hábito migratório e alimentar) e individuais (idade e presença de ectoparasitos) não se associaram à ocorrência de hemosporídeos nessa comunidade.

Tabela 9 – Análise das variáveis-resposta associadas à probabilidade de infecção das aves por hemoparasitos segundo o Modelo linear Generalizado Misto. A presença de muda e placa de incubação são as únicas variáveis explicativas com valores significativos para a presença de hemosporídeos.

Variáveis explicativas	Estimativa	Desvio padrão	Z - Valor	P - Valor
<i>Intercepto</i>	-21.501	0,3877	-5.546	> 0,001***
<i>Presença de muda</i>	0,9913	0,4514	2.196	0,0281*
<i>Sem placa de incubação</i>	257.565	831.161.274	0.000	0,9998
<i>Placa de incubação</i>	11.550	0,5191	2.225	0,0261*
<i>Ectoparasitos</i>	-0,7531	0,4284	-1,758	0,0788

6. Discussão.

A taxonomia integrativa permite a detecção de novas linhagens e espécies de hemoparasitos, gerando conhecimentos que ampliam as informações acerca da prevalência e biodiversidade desse grupo tão amplo. No presente estudo, a associação de análises ecológicas, parasitológicas, evolutivas e moleculares possibilitou detectar hemosporídeos e filarídeos aviários em 38% (32/84) das espécies de aves capturadas em uma área de floresta semidecidual em Minas Gerais. A comunidade de hemoparasitos apresentou baixa prevalência nestas aves, mas a partir dessa abordagem interdisciplinar foram caracterizadas quatro espécies de hemosporídeos previamente descritas e uma nova espécie de *Plasmodium* n. sp. Além disso, foi possível validar novos iniciadores para o diagnóstico molecular de filarídeos e identificar a espécie *Aproctella alessandroi*, a partir de dados genéticos obtidos exclusivamente de microfírias possibilitando determinar a prevalência desses parasitos com maior sensibilidade e sem a eutanásia dos hospedeiros.

No decorrer de um ano, 14% das aves avaliadas apresentaram infecções por hemosporídeos (*Haemoproteus/Plasmodium*); não foram constatadas diferenças significativas na distribuição dos hemosporídeos durante o período de coleta. Das aves positivas para estes parasitos, 61% das infecções foram identificadas em nível de gênero, sendo *Haemoproteus* responsável por 39% das infecções e *Plasmodium* por 22%. A prevalência geral aqui descrita pode ser considerada baixa quando comparada às prevalências descritas em outras pesquisas. Estudos com comunidades aviárias em diferentes regiões da Mata Atlântica brasileira apontam prevalências entre 17% e 23,2%, enquanto dados obtidos da avifauna do Cerrado, apresentam prevalências entre 21% e 49% (Fecchio et al., 2013; Lacorte et al., 2013; Anjos et al., 2021; Fecchio et al., 2021; de Angeli Dutra, 2022). Contrastando com a baixa prevalência reportada neste estudo, LaCorte e colaboradores (2013) avaliaram em Minas Gerais duas áreas de transição entre Cerrado e Mata Atlântica e encontraram mais de 30% das aves amostradas infectadas por hemosporídeos.

Vale a pena ressaltar que durante as análises moleculares de hemosporídeos também foi realizado o diagnóstico para *Leucocytozoon* presente no sangue das aves coletadas em Florestal (dado não apresentado nesta dissertação). A ausência de reações positivas indica que este gênero não está presente na amostragem deste estudo. Acreditava-se que a ausência de *Leucocytozoon* no Brasil seria um indicativo da inexistência de vetores competentes para sua transmissão ou que as condições climáticas não sejam favoráveis para seu desenvolvimento

(Fecchio et al., 2018). Anjos e colaboradores (2021) encontraram na Mata Atlântica brasileira três linhagens de *Leucocytozoon* em *Elaenia albiceps*, passeriforme migratório, mas não observaram gametócitos circulantes, o que pode sugerir a ocorrência de infecções abortivas. Entretanto, Vieira e colaboradores (2023) comprovaram a formação de gametócitos destes parasitos em *Cariama cristata* (Cariamiformes), uma espécie não migratória, agora definida como um hospedeiro competente. Isso comprova que o cerrado brasileiro apresenta condições bióticas e abióticas que possibilitam o desenvolvimento e transmissão de *Leucocytozoon*. A baixa prevalência do gênero pode estar associada à amostragem de hospedeiros vertebrados não competentes para o desenvolvimento do parasito. A maior parte dos trabalhos com hemosporídeos aviários no Brasil avaliam majoritariamente passeriformes, outras ordens como Cariamiformes e Falconiformes, são pouco amostradas por dificuldades na captura. Isso pode resultar em um viés de dados de prevalência de hemoparasitos no país, evidenciando a necessidade de captura de aves pertencentes a ordens que não são facilmente capturadas por redes de neblina (Mukhin et al., 2016).

Dentre as variáveis individuais, comportamentais, temporais e ambientais registradas na avifauna amostrada, o período reprodutivo (indicado pela aparição de placa de incubação) e a ocorrência de mudas da plumagem foram fatores positivamente associados à infecção por *Haemoproteus* e *Plasmodium*. Esses processos fisiológicos são fundamentais para a manutenção do *fitness* das aves e demandam energia, o que pode resultar na realocação de recursos que seriam destinados às respostas imunológicas durante o processo de infecção (Moreno-Rueda, 2010; Zuberogoitia et al., 2017; Penha et al., 2020). A reprodução das aves requer investimento e remanejamento de energia e recursos (“*trade-off*”) do sistema imune para a formação da prole o que torna esses animais mais suscetíveis a infecções por hemoparasitos e outros patógenos (Richner et al., 1995; Rodrigues et al., 2020). Nesse contexto de imunodepressão, Penha e colaboradores (2020) observaram a realocação de carotenoides para a produção de novas penas; esta substância atua no sistema imune como neutralizador de componentes citotóxicos sendo responsável pela coloração de penas. De maneira similar, pode-se sugerir que a produção de muda também favoreça a ocorrência desse *trade-off*. A partir dessas evidências, é interessante que pesquisas futuras avaliem os mecanismos imunológicos envolvidos no “*trade-off*” entre sistema imunológico e outros processos fisiológicos, como troca de plumagem e reprodução. Estudos focados em populações de espécies podem ser ideais para verificação dos fatores individuais atrelados à mudança de plumagem que estejam

correlacionados à imunodepressão das aves, favorecendo o sucesso da infecção por hemosporídeos.

Nas aves amostradas na região de Florestal, fatores como a presença de ectoparasitos, pluviosidade, temperatura, estação do ano, comportamento de migração e hábito alimentar não apresentaram associação favorável à presença de aves infectadas por hemosporídeos. A fim de explorar melhor o papel dessas variáveis na distribuição dos hemosporídeos e outros hemoparasitos, é pertinente o desenvolvimento de estudos longitudinais que avaliem a comunidade e populações específicas de espécies hospedeiras para se investigar variáveis mais específicas em nível de espécie ou indivíduos, conforme já ressaltado por nosso grupo (Rodrigues et al., 2020).

Além dos pontos abordados anteriormente, os estudos sobre os hemosporídeos também apresentam lacunas acerca da integração de dados morfológicos à biologia molecular (Valkiūnas et al., 2008a). A utilização de uma abordagem fundamentada na taxonomia integrativa foi imprescindível para a caracterização das espécies encontradas em Florestal. A partir do sequenciamento do *cyt-b* foram detectadas linhagens previamente conhecidas e novos haplótipos que foram associados às suas morfoespécies. Das 14 linhagens obtidas neste estudo, a maior riqueza encontrada foi para parasitos do gênero *Plasmodium* (71,4%). Entretanto, a maior prevalência de hemosporídeos foi observada para parasitos do gênero *Haemoproteus* (37,5%). Todas as linhagens de *Haemoproteus* recuperadas foram associadas a uma determinada morfoespécie. O mesmo não aconteceu para os cinco haplótipos de *Plasmodium* spp. que, devido à ausência de formas sanguíneas características, não puderam ser associados às suas respectivas morfoespécies.

Aves infectadas por hemosporídeos apresentam uma fase aguda, caracterizada pelo aumento de parasitos na circulação sanguínea; essa fase está comumente associada à presença de sinais clínicos, resultando na redução da movimentação desses animais e, conseqüentemente, diminuindo a probabilidade que sejam capturados em redes de neblina. Por outro lado, após esse período, as aves podem ficar livres da infecção ou alcançar um estado crônico, no qual há uma redução da parasitemia e dos sinais clínicos, sendo esses hospedeiros mais ativos e propícios de serem amostrados pelas armadilhas convencionais (Valkiūnas 2005). Essas condições ocasionam um viés amostral, sendo usualmente avaliadas aves não infectadas ou com baixa parasitemia o que favorece a detecção molecular desses parasitos. A baixa parasitemia ou ausência de formas sanguíneas em esfregaços são barreiras para a identificação morfológica

dos parasitos. Desta forma, cada vez mais se torna fundamental a integração de técnicas morfológicas e moleculares para estudos de prevalência e biodiversidade dos hemosporídeos aviários (Valkiūnas 2008a).

Dentre as linhagens de *Haemoproteus* spp. descritas neste trabalho, THRSAY01 e a nova linhagem apresentaram menos de 3% de diferença genética, sendo 99% semelhantes à linhagem TANIG01 (acesso GENBANK: KF537285) de *H. (H) coatneyi*. Esta espécie encontra-se agrupada no complexo *coatneyi*, composto por outras três espécies morfológicamente semelhantes: *H. (H) coereba*, *H. (H) paruli* e *H. (H) thraupi* (Burry-caines & Bennett, 1992; Valkiūnas 2005; Valkiūnas & Iezhova, 2022). A análise morfológica e as sequências obtidas neste estudo confirmaram que ambas as linhagens são da espécie *H. (H) coatneyi*. Este parasito foi encontrado em três espécies de aves hospedeiras (*Myiarchus ferox*, *S. cayana* e *Thraupis sayaca*) sem variações morfológicas significativas de suas formas sanguíneas. Apenas um espécime de *T. sayaca* apresentou a linhagem THRSAY01, sendo que esse haplótipo já foi descrito previamente infectando a mesma espécie de hospedeiro em Minas Gerais (Oliveira et al., 2020). A identificação morfológica das espécies pertencentes a esse grupo é um procedimento desafiador que nem sempre resulta em sua caracterização. Mesmo com essas dificuldades, dados moleculares associados aos morfológicos subsidiam informações necessárias para confirmar o diagnóstico da espécie, conforme demonstrado neste trabalho.

Duas linhagens do gênero *Haemoproteus*, SoCH4 e COTAL01, foram detectadas em columbiformes; esses haplótipos apresentaram 100% de identidade com as linhagens de *H. (Haemoproteus) paramultipigmentatus* depositadas por Lotta-Arévalo e colaboradores em 2023 (acesso GENBANK: OP087646 e OP701685). A partir da associação destes dados moleculares à morfologia das formas sanguíneas, foi confirmado o diagnóstico da espécie *H. (H) paramultipigmentatus* em Florestal, encontrada exclusivamente em *C. talpacoti* e *C. minuta*. De acordo com Matoso e colaboradores (2021) e os dados deste trabalho, é sugestivo que o *H. (H) paramultipigmentatus* seja específico para esta ordem de aves, o que não é incomum para espécies do gênero *Haemoproteus*.

H. (H) paramultipigmentatus foi descrito primeiramente em columbiformes da espécie *Columbina passerina*, no México (Valkiūnas et al., 2013). A espécie foi encontrada previamente no Brasil em *C. talpacoti* e os registros indicam uma especificidade entre essa espécie de parasito e hospedeiro (Matoso et al., 2021; Lotta-Arévalo et al., 2023). Todos os registros apontam infecções por *H. (H) paramultipigmentatus* em Columbiformes, com exceção

de um registro na Papua-Nova Guiné, onde um espécime de *Ptilinopus pulchellus* foi relatado como infectado por esta espécie (Valkiūnas et al., 2013). Foi observado por de Angeli Dutra e colaboradores (2023) elevada taxa de infecção de *Columbina* spp. por *Haemoproteus* ssp., sugerindo que a presença de populações de aves deste gênero pode influenciar a prevalência de hemosporídeos de uma dada região. Das aves capturadas em Florestal, a ordem Columbiforme representa 30% dos indivíduos positivos para hemosporídeos, sendo observado entre aves do gênero *Columbina*, 80% dos animais infectados.

Dentre as linhagens de *Plasmodium*, foram detectados três haplótipos de *P. cathemerium* (Hartman, 1927) em quatro espécies de hospedeiros, o que aponta para um padrão generalista do parasito (Ferreira-Junior et al., 2017). Esta espécie é cosmopolita e amplamente distribuída no mundo, encontrada em diferentes hospedeiros. A linhagem PADOM09 tem sido detectada com maior frequência no continente americano e foi associada morfológicamente à espécie *P. cathemerium* por Aly e colaboradores (2020). As linhagens MYITYR01 e GEOFOR01, detectadas em Florestal, foram pela primeira vez associadas com a morfoespécie *P. cathemerium*, o que representa uma contribuição para os estudos futuros de taxonomia de hemosporídeos aviários.

A linhagem PADOM11, associada ao *P. juxtannucleare*, foi detectada em dois espécimens de *V. jacarina* e foi possível observar um único gametócito característico da espécie, o que sugere não se tratar de uma infecção abortiva (Valkiūnas et al., 2009). *P. juxtannucleare* é comumente associado às infecções em *Gallus gallus* e outros hospedeiros da ordem Galliformes, tendo sido descrito em meados do século XX (Versiani & Gomes, 1941). Acreditava-se que esse parasito não ocorria naturalmente em aves silvestres, porém foram observadas infecções em pinguins, que resultaram na morte dos hospedeiros (Grim et al., 2003) e em Passeriformes de vida livre, nos quais o parasito desenvolve completamente seu ciclo (Ferreira-Junior et al., 2018). Estes resultados obtidos em Florestal reafirmam a ocorrência de *P. juxtannucleare* em passeriformes de vida livre, indicando a provável troca de hospedeiros. Diferentes fatores podem determinar este “spillover”, mas não se pode negligenciar que *V. jacarina* é uma espécie granívora, podendo se alimentar em pastos compartilhados com galinhas, comportamento este que favorece o contato destes dois grupos distintos de aves com os mesmos parasitos e vetores. *Plasmodium juxtannucleare* pode ser patogênico para aves que não compartilham uma história evolutiva, como no caso de pinguins que apresentam uma resposta imunológica inadequada contra essa infecção (Grim et al., 2003; Murata et al., 2008).

Com isso, investigações futuras são necessárias para avaliar a disseminação dessa espécie em passeriformes de vida livre e os danos causados aos hospedeiros suscetíveis.

Foi detectada em um espécime de *Pyriglena leucoptera* infecção pela linhagem PYLEU01 que até o momento não apresentava associação a nenhum morfotipo (Lacorte et al., 2013). A espécie com maior similaridade genética com esse haplótipo foi o *P. homopolare*, no entanto, suas características morfológicas não se assemelham às formas sanguíneas encontradas nos esfregaços sanguíneos referentes à PYLEU01. Análises morfológicas indicam similaridade deste parasito ao *Plasmodium rouxi*, mas com diferenças marcantes que sugerem se tratar de uma nova espécie (Sergent et al., 1928; Laird, 1962; Valkiūnas, 2005; Chavatte et al., 2009). A amostra detectada em Florestal possui formas sanguíneas com comprimento e largura maiores do que as observadas na descrição original de *P. rouxi* de Sergent e colaboradores (1928). Além disso, os gametócitos alcançam as regiões polares da hemácia, envolvendo o núcleo e, comumente, encostando-se nessa estrutura, deslocando-o lateralmente. Os pigmentos maláricos encontrados nos gametócitos são médios e grandes, com tamanhos superiores a 0,5 μm , o que difere de *P. rouxi* que evidencia pigmentos pequenos ($<0,5 \mu\text{m}$). Apesar de apresentarem em média a mesma quantidade de pigmentos, as formas sanguíneas da linhagem PYLEU01 possuem pigmentos espalhados pelo citoplasma e não nas regiões polares, conforme a descrição original de *P. rouxi*. Estas características sugerem a existência de uma nova espécie e denotam a necessidade de investigação de outras aves infectadas na região de Florestal e também em outras áreas de ocorrência de *P. leucoptera*.

Plasmodium rouxi foi descrito pela primeira vez na Argélia, tendo como hospedeiro a ave *Serinus canaria* (canário-belga), e seu relato foi feito por Sergent e colaboradores (1928). Esta espécie de parasito encontra-se distribuída principalmente em países africanos, entre diferentes famílias de passeriformes (Valkiūnas, 2005). No continente americano, há apenas um registro de *P. rouxi*, no estado de São Paulo, Brasil (Woodworth-Lynas et al., 1989), mas não existem registros de fotomicrografias do parasito ou informações sobre o hospedeiro, impossibilitando a confirmação da espécie envolvida na infecção.

Até o momento, é possível encontrar nos bancos de dados apenas três haplótipos associados à *P. rouxi*: a linhagem AY178904, mas devido à ausência de comprovações científicas não é considerada por malariologistas como um haplótipo que represente a espécie (Valkiūnas et al., 2008b); a sequência HQ453998 (Howe et al., 2012), em que os autores apenas sugerem se tratar da espécie, sem identificação das formas sanguíneas para sua confirmação; e

por fim, a linhagem PADOM16 (acesso GENBANK: HM146901), foi reconhecida como o haplótipo referência da morfoespécie *P. rouxi* (Valkiūnas & Iezhova, 2018).

Estudos em diferentes regiões do mundo encontram morfotipos similares a esta espécie, mas a falta de associações de dados morfológicos aos moleculares desfavorecem a identificação correta dos parasitos. No Brasil, Chagas e colaboradores (2017) observaram, por microscopia óptica, formas sanguíneas semelhantes ao *P. rouxi* em aves do gênero *Ramphastos* que vivem em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Apesar da semelhança morfológica, o sequenciamento deste parasito revelou uma nova linhagem, RAMVIT01 (acesso GENBANK: KX171628), com 94% de similaridade genética com a PADOM16, sendo sugestivo se tratar de uma espécie distinta pertencente a um complexo *P. rouxi*- like (Chagas et al., 2017).

Dentre esse conjunto de linhagens citadas acima, que podem ou não caracterizar o *P. rouxi*, a PYLEU01, encontrada em Florestal, expressa mais de 5% de dissimilaridade genética, permitindo deduzir que sejam espécies diferentes (conforme definição de Perkins, 2000). Filogeneticamente, a linhagem detectada em Florestal encontra-se em um clado diferente das demais linhagens citadas, e sua morfologia se distingue dos outros parasitos registrados. A partir disso, é necessária cautela ao comparar os resultados deste estudo com os dados disponíveis na literatura. Os registros mais recentes de *P. rouxi* não apresentam detalhamento morfológico suficiente para a caracterização da espécie. Com isso, as diferenças genéticas, morfológicas, locais e de hospedeiros indicam que o parasito detectado em Florestal e o *P. rouxi* originalmente descrito sejam espécies distintas. Portanto, com base nos dados apresentados, é possível inferir que a linhagem identificada neste estudo é uma nova espécie pertencente ao gênero *Plasmodium*, subgênero *Novyella*.

Diante dos dados reportados e da discussão apresentada anteriormente, um ponto merece destaque. Com o aumento de estudos acerca dos hemosporídeos, a descrição de novas morfoespécies e linhagens tornaram-se mais frequentes, e com isso surge um dilema sobre a classificação desses organismos que apresentam semelhanças taxonômicas e divergências genéticas. Atualmente, há uma diminuição de taxonomistas capacitados a diferenciar esses parasitos e identificar corretamente as espécies, para que assim seja possível integrar esses dados às informações moleculares (Valkiūnas et al., 2008b). A formação de novos pesquisadores capazes de realizar a caracterização molecular e morfológica de hemosporídeos é fundamental para o sucesso de estudos desta natureza a fim de favorecer o desenvolvimento de estudos interdisciplinares e o levantamento da biodiversidade desse grupo de parasitos.

O diagnóstico de filarídeos aviários também enfrenta gargalos relacionados ao número reduzido de taxonomistas qualificados para identificar e descrever esses parasitos. Entretanto, outra dificuldade do estudo desse grupo está relacionada à necessidade de amostragem dos vermes adultos para a determinação específica desses parasitos, realizada pela avaliação dos adultos presentes nos tecidos e órgãos de seus hospedeiros. A observação das microfilárias, formas sanguíneas amostradas sem necessidade de eutanásia dos hospedeiros, não oferece características morfológicas suficientes para o diagnóstico preciso das espécies. Portanto, a junção de dados moleculares e morfológicos dessas diferentes formas de desenvolvimento permite preencher lacunas acerca da prevalência e identificações desses parasitos (Binkienė et al., 2021).

A avaliação da prevalência e identificação de oncocercídeos foi realizada em parceria com o Museu de História Natural de Paris a partir de dados disponíveis de formas embrionárias presentes no sangue periférico de seus hospedeiros. A inclusão das amostras coletadas em Florestal foi fundamental para a certificação da eficácia de um novo par de *primers* para o diagnóstico panfilarídeo (dado ainda não publicado), a partir da amplificação de um fragmento do gene 28S. Dentre as diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas, a microscopia óptica apresentou menor sensibilidade, sendo necessária aplicação combinada dos métodos de qPCR e dPCR para aferir a prevalência de filarídeos na coorte amostrada. O desenvolvimento desse protocolo evita a eutanásia dos espécimes negativos para infecção; com isso, estes resultados favorecem o estudo da interação filarídeos-aves em animais silvestres, em cativeiro e espécies em risco de extinção, assim como a preservação da vida e do bem-estar dos animais amostrados.

A prevalência de filarídeos detectados na circulação sanguínea de aves silvestres em diferentes biomas brasileiros tem sido registrada entre 2% e 14% (Woodworth-Lynas et al., 1989; Silveira et al., 2010; Sebaio et al., 2012; Silva et al., 2022). Contudo, grande parcela dos trabalhos no Brasil utiliza exclusivamente a microscopia óptica para o diagnóstico das formas sanguíneas. No presente estudo, a associação de técnicas moleculares e microscopia óptica revelaram 5,6% de prevalência para oncocercídeos e menos da metade das amostras positivas apresentaram microfilárias em esfregaços sanguíneos. Os novos *primers* utilizados neste estudo contribuíram de forma considerável para uma apuração rigorosa da frequência de filarídeos aviários.

Com base no sequenciamento seguido da análise da filogenia foi possível identificar, em Florestal, filarídeos da família Onchocercidae pertencentes ao gênero *Aproctella*. A espécie

A. alessandroi foi identificada em hospedeiros das famílias Hirundinidae e Thraupidae. Dados moleculares e morfológicos obtidos para as microfilárias evidenciaram correspondência com espécimes previamente depositados no banco de dados do MNHN. A segunda espécie de *Aproctella* sp., encontrada em aves das ordens Funariidae, Thraupidae e Turdidae, não apresentou compatibilidade com as amostras armazenadas, de modo que não foi possível identificá-la em nível de espécie.

No Brasil, há registro de apenas três espécies do gênero *Aproctella*, detectados em hospedeiros da família Thraupidae: *A. alessandroi*, *A. carinii* e *A. stoddardii* (Vicente, 1995; Bartlett, 2009). As características morfológicas da microfilária e a área de registro sugerem que a espécie reportada acima seja *A. carinii*; o MNHN possui material dessa espécie coletado em Juiz de Fora, Minas Gerais. Experimentos complementares serão necessários para comparar as duas amostras e avaliar se o filarídeo encontrado em Florestal se trata da espécie em questão. A identificação desses parasitos e a associação de formas embrionárias aos seus respectivos adultos, não é um processo trivial. Com essa perspectiva, é fundamental ressaltar a importância de taxonomistas capacitados a caracterizar espécies de filarídeos, assim como a importância de depositar esses exemplares em museus para investigações futuras acerca destes organismos.

Embora o gênero *Aproctella* forme um clado monofilético, a filogenia deste estudo não revelou suporte para monofilia das subfamílias Onchocercinae, Dirofilarinae, Lemdaninae e Splendidofilarinae, que compõem o clado ONC5. Para tornar mais robusta a resolução filogenética deste grupo, é necessária a associação da taxonomia molecular à tradicional caracterização morfológica, que busque caracteres de outras formas de desenvolvimento além dos adultos (Lefoulon et al., 2015). A fim de elucidar parte da história evolutiva dos oncocercídeos, é fundamental a coleta de novas amostras que englobem maior variedade de hospedeiros, para obtenção de diversas espécies desses parasitos.

A prevalência total de hemoparasitos encontrados neste estudo não variou entre as estações chuvosa e seca, de modo que a distribuição de hemosporídeos e filarídeos não parece sofrer influência das estações. Diferenças na distribuição sazonal de hemoparasitos estão comumente associadas à distribuição de vetores competentes para a transmissão dos mesmos (Fecchio et al., 2019). A cidade de Florestal possui lagoas e corpos d'água no período de seca, que fomentam ambientes adequados para a manutenção dos vetores, do mesmo modo que em estações chuvosas esses nichos também são encontrados. Com isso, durante todo o ano de amostragem foram observados ambientes propícios para o crescimento desses vetores. De

acordo com Pulgarín-R e colaboradores (2018), as condições climáticas e disponibilidade de espécies de hospedeiros determinam a maior diversidade e prevalência de parasitos e não necessariamente a disponibilidade de água. É necessário a elaboração de pesquisas focadas na coleta desses invertebrados para confirmar se a acessibilidade a corpos d'água e condições climáticas de Florestal favorecem igualmente o desenvolvimento desses insetos durante os períodos secos e chuvosos.

Em estudos com animais silvestres, além das relações entre parasitos, hospedeiros e ambiente, é comum a ocorrência de coinfeções, e a interação parasito-parasito deve ser levada em consideração para o sucesso das infecções. Em Florestal foi detectada a coocorrência de oncocercídeos e hemosporídeos infectando o mesmo hospedeiro, ambos com formas presentes na circulação sanguínea. Adicionalmente, foram observadas, em esfregaços sanguíneos, formas tripomastigotas de *Trypanosoma* em diferentes indivíduos infectados concomitantemente por *Plasmodium* (dados ainda em análise). Traupídeos foram encontrados coinfectados por *Aproctella* sp. e *Haemoproteus coatneyi* e tiranídeos com *Aproctella* sp. e *Plasmodium cathemerium*.

Nesse contexto, surgem importantes questões relacionadas à coinfeção por hemosporídeos e filarídeos: a modulação da resposta imune de um hospedeiro em resposta a um parasito será benéfica, prejudicial ou indiferente para uma infecção secundária? Mesmo com o estabelecimento de dois ou mais parasitos, eles se desenvolverão de forma similar a hospedeiros que apresentam infecção por apenas um desses parasitos? Quais as consequências para os hospedeiros? A partir dos resultados encontrados em Florestal, será que o sucesso da coinfeção de *Aproctella* sp./*Haemoproteus*, em traupídeos, e *Aproctella* sp./*Plasmodium* em Tyrannidae, está associado exclusivamente às infecções concomitantes dessas espécies de parasitos a essas famílias de aves? Elucidar essas, e outras, perguntas com base na ecologia parasitária de animais silvestres é um processo complexo, em decorrência de diversas variáveis bióticas e abióticas que não conseguimos regular no ambiente natural (Clark et al., 2016). Estudos futuros devem direcionar esforços a fim de integrar diferentes conhecimentos, para que essas e outras perguntas possam ser desvendadas.

7. Conclusões

- 1) Com base na taxonomia integrativa, foram identificados, morfológica e molecularmente, hemosporídeos das espécies *Haemoproteus* (*H*) *paramultipigmentatus*, *H. (H) coatneyi*, *Plasmodium cathemerium*, *P. juxtannucleare*, e uma nova espécie *Plasmodium* n. sp.
- 2) Espécies de filarídeos do gênero *Aproctella* ocorrem em uma área de floresta semidecidual, sendo possível identificar molecularmente a espécie *A. alessandroi*.
- 3) A riqueza de espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* é maior que a riqueza de parasitos do gênero *Haemoproteus*, confirmando dados anteriores de nosso grupo em áreas de floresta semidecidual no estado de Minas Gerais.
- 4) Casos de coinfeção entre hemosporídeos e filarídeos ocorrem na região estudada, denotando a necessidade de estudos futuros sobre as possíveis consequências desta interação.
- 5) A presença de placa de incubação e a muda podem indicar *trade-off* entre o sistema imunológico e os processos fisiológicos de reprodução e crescimento, resultando na susceptibilidade das aves a infecções por hemosporídeos.
- 6) Um novo método diagnóstico para detecção de filarídeos, sensível e sem necessidade de eutanásia dos hospedeiros para busca das formas adultas, é proposto neste trabalho.
- 7) A ocorrência de um novo caso de “spill-over” da espécie *P. juxtannucleare*, infectando passeriformes da espécie *V. jacarina* reforça o desenvolvimento deste parasito em aves silvestres e não apenas em galiformes como anteriormente proposto.
- 8) *P. cathemerium* e parasitos do gênero *Aproctella* apresentam baixa especificidade de hospedeiro enquanto a espécie *H. paramultipigmentatus* apresentou-se altamente específica para o gênero *Columbina*.

8. Referências.

1. ALY, M. Z., MOHAMED, I. I., SEBAK, S. I., & VANSTREELS, R. E. (2020). Morphological and molecular characterization of *Plasmodium cathemerium* (lineage PADOM02) from the sparrow *Passer domesticus* with complete sporogony in *Culex pipiens* complex. *Parasitology*, 147(9), 985-993.
2. ANDERSON, P. K. (2010). Human–bird interactions. *The welfare of domestic fowl and other captive birds*, 17-51.
3. ANDERSON RC. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. New York, Wallingford: CABI; 2000.
4. ANJOS, C. C., CHAGAS, C. R., FECCHIO, A., SCHUNCK, F., COSTA-NASCIMENTO, M. J., MONTEIRO, E. F., ... & KIRCHGATTER, K. (2021). Avian malaria and related parasites from resident and migratory birds in the Brazilian Atlantic Forest, with description of a new *Haemoproteus* species. *Pathogens*, 10(2), 103.
5. APANIUS, V. (1991). Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. *Parasitology Today*, 7(4), 87-90.
6. ARAÚJO, S. G., & DE SÁ, J. G. (2021). História e cultura do povo Kantaruré. *Letra Indígena*, 19(1).
7. ARONSON, M. F. J.; LA SORTE, F. A.; NILON, C. H.; KATTI, M.; GODDARD, M. A.; LEPCZYK, C. A.; WARREN, P. S.; WILLIAMS, N. S. G.; CILLIERS, S.; CLARKSON, B.; DOBBS, C.; DOLAN, R.; HEDBLUM, M.; KLOTZ, S.; KOOIJMANS, J. L.; KÜNH, I.; MACGREGOR-FORS, I.; MCDONNELL, M.; MÖRTBERG, U.; PYSEK, P.; SIEBERT, S.; SUSHINSKY, J.; WERNER, P.; Winter, M. A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers. *The Royal Society Publishing*, v. 281, n. 1780, p. 1 – 8, 2017. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.3330>
8. ATKINSON, CT., & LAPOINTE, DA. (2009). Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23(1), 53-63.
9. ATKINSON, CT., THOMAS, NJ., & HUNTER, DB. (Eds.). (2009). *Parasitic diseases of wild birds*. John Wiley & Sons.

10. BAIN, O., PETIT, G., KOZEK, W. J., & CHABAUD, A. G. (1981). Sur les filaires Splendidofilariinae du genre Aprostella. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 56(1), 95-105.
11. BAIN, O. (2002). Evolutionary Relationships Among Filarial Nematodes. In: The Filaria. World Class Parasites, vol 5. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-306-47661-4_3
12. BAIN, O., & BABAYAN, S. (2003). Behaviour of filariae: morphological and anatomical signatures of their life style within the arthropod and vertebrate hosts. *Filaria journal*, 2(1), 16.
13. BAIN, O., CASIRAGHI, M., MARTIN, C., & UNI, S. (2008). The Nematoda Filarioidea: critical analysis linking molecular and traditional approaches. *Parasite*, 15(3), 342-348.
14. BAKER, JR (1976). Biology of the trypanosomes of birds. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London/New York/ San Francisco, pp. 131–174
15. BARTLETT, C. M. Filarioid Nematodes. In: ATKINSON, CT., THOMAS, NJ., & HUNTER, DB. (Eds.). (2009). *Parasitic diseases of wild birds*. John Wiley & Sons.
16. BATES D., MAECHLER M., BOLKER B. & WALKER S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67: 1–48. doi.org/10.18637/jss.v067.i01
17. BEGON, MICHAEL. *Ecology : from individuals to ecosystems* / Michael Begon, Colin R. Townsend, John L. Harper.—4th ed. p. cm. Includes bibliographical references and index. ISBN-13: 978-1-4051-1117-1 (hard cover: alk. paper) ISBN-10: 1-4051-1117-8 (hard cover : alk. paper) 1. Ecology. I. Townsend, Colin R. II. Harper, John L. III. Title. QH54.B416 2005 577—dc22
18. BENEDIKT, V., BARUS, V., CAPEK, M., HAVLICEK, M., & LITERAK, I. (2009). Blood parasites (*Haemoproteus* and microfilariae) in birds from the Caribbean slope of Costa Rica. *Acta Parasitologica*, 54(3), 197-204.
19. BENNETT GF. 1987. Hematozoa. In: (Ed. E.W. Burr) *Companion Bird Medicine*. Iowa State University Press, Ames, 120–134
20. BENSCH S, STJERNMAN M, HASSELQUIST D, ÖRJAN Ö, HANSSON B, WESTERDAHL H, PINHEIRO RT, (2000) Host specificity in avian blood parasites: a

- study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc Biol Sci* 267:1583–1589.
21. BENSCH S, PÉREZ-TRIS J, WALDENSTRÖM J, HELLGREN O (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* (N Y) 58:1617–1621. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01742.x
 22. BEZERRA, D. M. M., DE ARAUJO, H. F. P., ALVES, Â. G. C., & ALVES, R. R. N. (2013). Birds and people in semiarid northeastern Brazil: symbolic and medicinal relationships. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(1), 1-11.
 23. BINKIENĖ, R., CHAGAS, C. R. F., BERNOTIENĖ, R., & VALKIŪNAS, G. (2021). Molecular and morphological characterization of three new species of avian Onchocercidae (Nematoda) with emphasis on circulating microfilariae. *Parasites & vectors*, 14(1), 1-19.
 24. BURRY-CAINES, J. R., & BENNETT, G. F. (1992). The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporina) of the avian families Fringillidae and Emberizidae sl. *Canadian Journal of Zoology*, 70(6), 1149-1160.
 25. CALERO-RIESTRA M, GARCÍA JT (2016) Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. *Malar J* 15:1–11. doi: 10.1186/s12936-016-1220-y
 26. CARLSON, C. J., DALLAS, T. A., ALEXANDER, L. W., PHELAN, A. L., & PHILLIPS, A. J. (2020). What would it take to describe the global diversity of parasites?. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1939), 20201841.
 27. CARVALHO, A. M., FERREIRA, F. C., ARAÚJO, A. C., HIRANO, L. Q. L., PALUDO, G. R., & BRAGA, É. M. (2022). Molecular detection of *Leucocytozoon* in red-legged seriemas (*Cariama cristata*), a non-migratory bird species in the Brazilian Cerrado. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 31, 100652.
 28. CASIRAGHI, M., ANDERSON, T. J. C., BANDI, C., BAZZOCCHI, C., & GENCHI, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122(1), 93-103.
 29. CHABAUD, A. G., & MOHAMMAD, M. K. (1989). Le genre *Filaria* Gmelin, 1790. Description de quatre espèces nouvelles. *Bull Mus Nat Hist Nat*, 11, 47-59.

30. CHABAUD, A. G., & BAIN, O. (1994). The evolutionary expansion of the Spirurida. *International journal for parasitology*, 24(8), 1179-1201.
31. CHAGAS, CRF., BINKIENĖ, R., & VALKIŪNAS, G. (2021). Description and molecular characterization of two species of avian blood parasites, with remarks on circadian rhythms of avian haematozoa infections. *Animals*, 11(12), 3490.
32. CHASAR A, LOISEAU C, VALKIŪNAS G, ET AL (2009) Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol Ecol* 18:4121–4133. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04346.x
33. CLARK, NJ., WELLS, K., DIMITROV, D., & CLEGG, SM. (2016). Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. *Journal of Animal Ecology*, 85(6), 1461–1470. doi:10.1111/1365-2656.12578
34. CLARK, P., BOARDMAN, W., & RAIDAL, S. (2009). *Atlas of clinical avian hematology*. John Wiley & Sons.
35. COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO): Lista de Aves do Brasil.; 2023. <http://www.cbro.org.br>
36. COSGROVE, CL., WOOD, MJ., DAY, KP., & SHELDON, BC. (2008). Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology*, 77(3), 540-548.
37. COX, F.E., (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* 3, 5
38. DA SILVA, B. R., VANSTREELS, R. E. T., SERAFINI, P. P., FONTANA, C. S., DA SILVA, T. W., CHIARANI, E., ... & LOCATELLI-DITTRICH, R. (2022). Blood parasites of passerines in the Brazilian Pampas and their implications for a potential population supplementation program for the endangered Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*). *Parasitology Research*, 121(11), 3203-3215.
39. DANILEWSKY B, (1889). *La Parasitologie Comparée du Sang. Nouvelles Recherches sur les Parasites du Sang des Oiseaux: Kharkoff*.
40. DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., & POSADA jModelTest, D. 2: More models, new heuristics and parallel computing., 2012, 9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth>, 2109, 772.
41. DE ANGELI DUTRA, D., FILION, A., FECCHIO, A., BRAGA, ÉM., & POULIN, R. (2021). Migrant birds disperse haemosporidian parasites and affect their transmission in avian communities. *Oikos*, 130(6), 979-988.

42. DE ANGELI DUTRA, D., BELO, N., & BRAGA, E. M. (2022). Prevalence and richness of malaria and malaria-like parasites in wild birds from different biomes in South America. *PeerJ*, 10, e13485.
43. DE LA TORRE, G. M., FREITAS, F. F., FRATONI, R. D. O., GUARALDO, A. D. C., DUTRA, D. D. A., BRAGA, M., & MANICA, L. T. (2020). Hemoparasites and their relation to body condition and plumage coloration of the White-necked thrush (*Turdus albicollis*). *Ethology Ecology & Evolution*, 32(6), 509-526.
44. DE PIACENTINI, V. Q., ALEIXO, A., AGNE, C. E., MAURÍCIO, G. N., PACHECO, J. F., BRAVO, G. A., ... & CESARI, E. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23, 91-298
45. DEVELEY, P. F. (2021). Bird conservation in Brazil: challenges and practical solutions for a key megadiverse country. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 19(2), 171-178.
46. DOBSON, A., LAFFERTY, K. D., KURIS, A. M., HECHINGER, R. F., & JETZ, W. (2008). Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11482-11489.
47. FALLON ASM, RICKLEFS RE, SWANSON BL, BERMINGHAM E (2003) Detecting avian malaria: an improved Polymerase Chain Reaction diagnostic. *J Parasitol* 89:1044–1047. doi: 10.1645/GE-3157
48. FECCHIO, A., LIMA, M. R., SVENSSON-COELHO, M., MARINI, M. A., & RICKLEFS, R. E. (2013). Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology*, 140(2), 181-192.
49. FECCHIO, A., SILVEIRA, P., WECKSTEIN, J. D., DISPOTO, J. H., ANCIÃES, M., BOSHOLN, M., ... & BELL, J. A. (2018). First record of *Leucocytozoon* (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: evidence for rarity in Neotropical lowlands or lack of sampling for this parasite genus?. *The Journal of Parasitology*, 104(2), 168-172.
50. FECCHIO, A., CHAGAS, CR., BELL, JA., & KIRCHGATTER, K. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta tropica*, 204, 105364.

51. FECCHIO, A., LIMA, M. R., BELL, J. A., SCHUNCK, F., CORRÊA, A. H., BECO, R., ... & GABRIEL, M. (2021). Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. *International Journal for Parasitology*, 51(9), 719-728.
52. FERREIRA JUNIOR, F. C., RODRIGUES, R. A., ELLIS, V. A., LEITE, L. O., BORGES, M. A., & BRAGA, E. M. (2017). Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. *PLoS One*, 12(6), e0178791.
53. FERREIRA-JUNIOR, F. C., DE ANGELI DUTRA, D., SILVEIRA, P., PACHECO, R. C., WITTER, R., DE SOUZA RAMOS, D. G., ... & BRAGA, É. M. (2018). A new pathogen spillover from domestic to wild animals: Plasmodium juxtannucleare infects free-living passerines in Brazil. *Parasitology*, 145(14), 1949-1958.
54. FERRI, E., BARBUTO, M., BAIN, O., GALIMBERTI, A., UNI, S., GUERRERO, R., & CASIRAGHI, M. (2009). Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in zoology*, 6(1), 1-12.
55. FILIPEK, S. (2023). The King of Birds and the Bird of Kings: About the Symbolism of the Eagle in Culture, Beliefs and Art. *Asian Journal of Social Science Studies*, 8(2), 17.
56. GARNHAM, PCC. (1966). Malaria parasites and other Haemosporidia. *Malaria Parasites and other Haemosporidia*.
57. GEDOELST, L. (1916). Le faune parasitaire du Congo Belge. *Revue Zoologique Africaine*, 5, 1-90.
58. GRIM, K. C., VAN DER MERWE, E., SULLIVAN, M., PARSONS, N., MCCUTCHAN, T. F., & CRANFIELD, M. (2003). Plasmodium juxtannucleare associated with mortality in black-footed penguins (Spheniscus demersus) admitted to a rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(3), 250-255.
59. GOATER, C. P., & HOLMES, J. C. (1997). Parasite-mediated natural selection. *Host-parasite evolution: general principles and avian models.*, 9-29.
60. GODFREY JR, R. D., FEDYNICH, A. M., & PENCE, D. B. (1987). Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of wildlife diseases*, 23(4), 558-565.
61. HALL, J. (2018). *Illustrated dictionary of symbols in Eastern and Western art*. Routledge.

62. HARTMAN, E. (1927). Three Species of Bird Malaria, *Plasmodium praecox*, *P. cathemerium* n. sp., and *P. inconstans* n. sp. *Arch. Protistenkunde*, 60(1).
63. HELLGREN, O., WALDENSTRÖM, J., & BENSCH, S. (2004). A new pcr assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, AND *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90(4), 797–802. doi:10.1645/ge-184r1
64. HERNANDES-CORDOBA, OD., & BRAGA, EM. (2019). Chigger mites and microfilaria in the ground lizard *Tropidurus torquatus*. *Herpetological Conservation and Biology*, 14(2), 402-410.
65. HOWE, L., CASTRO, I. C., SCHOENER, E. R., HUNTER, S., BARRACLOUGH, R. K., & ALLEY, M. R. (2012). Malaria parasites (*Plasmodium* spp.) infecting introduced, native and endemic New Zealand birds. *Parasitology research*, 110, 913-923.
66. ISHTIAQ, F., CLEGG, S. M., PHILLIMORE, A. B., BLACK, R. A., OWENS, I. P., & SHELDON, B. C. (2010). Biogeographical patterns of blood parasite lineage diversity in avian hosts from southern Melanesian islands. *Journal of Biogeography*, 37(1), 120-132.
67. JENKINS, T., & OWENS, I. P. (2011). Biogeography of avian blood parasites (*Leucocytozoon* spp.) in two resident hosts across Europe: phylogeographic structuring or the abundance–occupancy relationship?. *Molecular Ecology*, 20(18), 3910-3920.
68. JIMÉNEZ-PEÑUELA, J., FERRAGUTI, M., MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J., SORIGUER, R. C., & FIGUEROLA, J. (2021). Urbanization effects on temporal variations of avian haemosporidian infections. *Environmental Research*, 199, 111234.
69. KATOH, K. (2002). MAFFT : A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
70. KATOH, K., & TOH, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 286-298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>
71. KRASNOV, B. R., STANKO, M., & MORAND, S. (2007). *Host community structure and infestation by ixodid ticks: repeatability, dilution effect and ecological specialization*. *Oecologia*, 154, 185-194.
72. LACORTE, G. A., FELIX, G. M., PINHEIRO, R. R., CHAVES, A. V., ALMEIDA-NETO, G., NEVES, F. S., ... & BRAGA, E. M. (2013). Exploring the diversity and

- distribution of neotropical avian malaria parasites—a molecular survey from Southeast Brazil. *PloS one*, 8(3), e57770.
73. LEFOULON, E., BAIN, O., BOURRET, J., JUNKER, K., GUERRERO, R., CAÑIZALES, I., ... & MARTIN, C. (2015). Shaking the tree: multi-locus sequence typing usurps current onchocercid (filarial nematode) phylogeny. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(11), e0004233.
 74. LEO NETO, N. A., BROOKS, S. E., & ALVES, R. R. (2009). From Eshu to Obatala: animals used in sacrificial rituals at Candomblé "terreiros" in Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5, 1-10.
 75. LEVIN, I. I., VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., O'BRIEN, S. L., & PARKER, P. G. (2012). Novel Haemoproteus Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the Swallow-Tailed Gull (Lariidae), with Remarks On the Host Range of Hippoboscids-Transmitted Avian Hemoproteids. *Journal of Parasitology*, 98(4), 847–854. doi:10.1645/ge-3007.1
 76. LEVINE, ND., 1988. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
 77. LOPES, L. E., & MARÇAL, B. D. F. (2016). Avifauna do Campus Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Atual Ornitol*, 193, 41-56.
 78. LOTTA-ARÉVALO, I. A., GONZÁLEZ, A. D., GAMBOA-SUÁREZ, B. A., PACHECO, M. A., ESCALANTE, A. A., MORENO, C., ... & MATTA, N. E. (2023). Haemosporidians in non-passerine birds of Colombia: an overview of the last 20 years of research. *Diversity*, 15(1), 57.
 79. LUTZ, H. (2016). *Ecology And Evolution Of Malarial Parasites In Vertebrate Hosts*.
 80. MARZAL, A., LOPE, FD., NAVARRO, C., & MØLLER, AP. (2005). Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, 142(4), 541-545.
 81. MARZLUFF, J. M. (2001). Worldwide urbanization and its effects on birds. *Avian ecology and conservation in an urbanizing world*, 19-47.
 82. MATOSO, R. V., CEDROLA, F., BARINO, G. T. M., DIAS, R. J. P., ROSSI, M. F., & D'AGOSTO, M. (2021). New morphological and molecular data for *Haemoproteus* (H.) *paramultipigmentatus* in the Atlantic Forest of Brazil. *Parasitology International*, 84, 102375.

83. MCKEAND, JB. (1999). Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitology*, 117(7), 87-96.
84. MCKINNEY, M. L. Urbanization, biodiversity and conservation. *BioScience*, v. 52, n. 10, p 883 – 890, 2002. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0883:UBAC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0883:UBAC]2.0.CO;2)
85. MELLOR PS, BOORMAN J, BAYLIS M. (2000). Culicoides biting midges : their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307–340.
86. MOHAMMED, A. H. (1958). Systematic and Experimental Studies on Protozoal Blood Parasites of Egyptian Birds. Vols. I. & II. Systematic and Experimental Studies on Protozoal Blood Parasites of Egyptian Birds. Vols. I. & II.
87. MØLLER, AP. (2010). Host–parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change. *Global Change Biology*, 16(4), 1158-11
88. MOLYNEUX, DH., 1977. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 15, 1–82.
89. MORENO-RUEDA, G. (2010). Experimental test of a trade-off between moult and immune response in house sparrows *Passer domesticus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(10), 2229-2237.
90. MUKHIN, A., PALINAUSKAS, V., PLATONOVA, E., KOBYLKOVA, D., VAKOLIUK, I., & VALKIŪNAS, G. (2016). The strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioural changes in parasitized birds. *PLoS One*, 11(7), e0159216.
91. MURATA, K., NII, R., SASAKI, E., ISHIKAWA, S., SATO, Y., SAWABE, K., ... & UEDA, M. (2008). Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare infection in a captive white eared-pheasant (*Crossoptilon crossoptilon*) at a Japanese zoo. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(2), 203-205.
92. NAKAGAWA, S., SCHIELZETH, H. (2013). A general and simple method for obtaining R^2 from Generalized Linear Mixed-effects Models. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 133–142
93. OLIVEIRA, L. D., BARINO, G. T. M., ROSSI, M. F., D'AGOSTO, M., DIAS, R. J. P., & SANTOS, H. A. (2020). Caracterização morfológica e molecular de *Haemoproteus coatneyi* e *Haemoproteus erythrogravidus* (Haemosporida: Haemoproteidae) em Passeriformes da Mata Atlântica, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29.

94. ORTEGO J, CORDERO PJ, APARICIO JM, CALABUIG G (2008) Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *J Ornithol* 149:337–343. doi: 10.1007/s10336-008- 0287-9
95. OUTLAW DC, RICKLEFS RE (2014) Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): How to move forward in the molecular era. *Parasitology* 141:1223–1232. doi: 10.1017/S0031182014000560
96. PACHECO, M. A., & ESCALANTE, A. A. (2023). Origin and diversity of malaria parasites and other Haemosporida. *Trends in Parasitology*.
97. PENHA, V. A., RODRIGUES, R., QUAGLIA, A. I., HOEPERS, P. G., DEL-CLARO, K., & SOARES, L. (2020). Plumage coloration predicts haemosporidian infection occurrence in birds. *Ardea*, 108(1), 39-48.
98. PERKINS, SL., OSGOOD, SM., & SCHALL, JJ. (1998). Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria: implications for epizootiology. *Molecular Ecology*, 7(11), 1587-1590.
99. PERKINS, S. L. (2000). Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of Plasmodium. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1459), 2345-2350.
100. POSADA D, CRANDALL KA (1998) MODELTEST : testing the model of DNA substitution. *Bioinforma Appl NOTE* 14:817–818.
101. POULIN R (1996) Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *Am Nat* 147:287–295.
102. POULIN R, MORAND S (2000) The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75:277–293
103. POULIN, R., & DE ANGELI DUTRA, D. (2021). Animal migrations and parasitism: reciprocal effects within a unified framework. *Biological Reviews*, 96(4), 1331-1348.
104. POULIN, R. (2021). The rise of ecological parasitology: twelve landmark advances that changed its history. *International Journal for Parasitology*, 51(13-14), 1073-1084.
105. QUESADA, J.; MACGREGORS-FORS, I. Avian community responses to the establishment of small garden allotments within a Mediterranean habitat mosaic. *Animal Biodiversity and Conservation*, v. 33, n. 1, p. 53 - 61, 2010.

106. RICHNER, H., CHRISTE, P., & OPPLIGER, A. (1995). Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(4), 1192-1194.
107. RODRIGUES, R. A., MASSARA, R. L., BAILEY, L. L., PICHORIM, M., MOREIRA, P. A., & BRAGA, É. M. (2020). Using a multistate occupancy approach to determine molecular diagnostic accuracy and factors affecting avian haemosporidian infections. *Scientific reports*, 10(1), 8480.
108. RODRIGUES, R. A., FELIX, G. M., PICHORIM, M., MOREIRA, P. A., & BRAGA, E. M. (2021). Host migration and environmental temperature influence avian haemosporidians prevalence: a molecular survey in a Brazilian Atlantic rainforest. *PeerJ*, 9, e11555.
109. RONQUIST F, HUELSENBECK JP (2003) MrBayes 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinforma Appl Note* 19:1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
110. ROSS, R. I. M. S. (1898). Report on the Cultivation of Proteosoma, Labbé, in Grey Mosquitos. *The Indian Medical Gazette*, 33(11), 401-408.
111. SANGUINETTI CJ, NETO ED, SIMPSON AJG (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 17: 915-919
112. SAMBROOK J, RUSSELL DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
113. SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
114. SANTIAGO-ALARCON, D., PALINAUSKAS, V., & SCHAEFER, HM. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, 87(4), 928–964. doi:10.1111/j.1469-185x.2012.00234.x
115. SANTIAGO-ALARCON, D., & MARZAL, A. (2020). Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics. *Ecology, Evolution and Systematics*, Springer.
116. SEBAIO, F., BRAGA, É. M., BRANQUINHO, F., FECCHIO, A., & MARINI, M. Â. (2012). Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 7-15.

117. SEHGAL, RNM., JONES, HI. & SMITH, TB. (2001) Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: A molecular approach. *Molecular Ecology*, 10, 2319–2327. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01339.x>
118. SEHGAL, R. N., JONES, H. I., & SMITH, T. B. (2005). Molecular evidence for host specificity of parasitic nematode microfilariae in some African rainforest birds. *Molecular Ecology*, 14(13), 3977-3988.
119. SEHGAL, R. N. (2015). Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 421-430.
120. SEHGAL, R.N., IEZHOVA, T.A., MARZEC, T., VALKIŪNAS, G., (2015). *Trypanosoma naviformis* sp. nov. (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) from widespread African songbirds, the Olive sunbird (*Cyanomitra olivacea*) and Yellow-whiskered greenbul (*Andropadus latirostris*). *Zootaxa* 4034, 342–350
121. SERGENT, E., SERGENT, E., & CATANEI, A. (1928). A New Malaria Parasite of Birds. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*, 186(12), 809-811.
122. SILVEIRA, P., BELO, N. O., RODELLO, D., PINHEIRO, R. T., & BRAGA, É. M. (2010). Microfilariae infection in wild birds from the Brazilian Cerrado. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1305-1309.
123. SIMPSON, V. R., MACKENZIE, G., & HARRIS, E. A. (1996). Fatal microfilarial infection in red billed blue magpies (*Urocissa erythrorhynchus*). *The Veterinary Record*, 138(21), 522-523.
124. TELFORD SR. The hemoparasites of the reptilian. Boca Raton: CRC; 2009.
125. TOBIAS, J. A., SHEARD, C., PIGOT, A. L., DEVENISH, A. J., YANG, J., SAYOL, F., ... & SCHLEUNING, M. (2022). AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters*, 25(3), 581-597.
126. VALKIUNAS, G. (2005). *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporida*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA
127. VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., KRIŽANAUSKIENĖ, A., PALINAUSKAS, V., SEHGAL, R. N., & BENSCH, S. (2008a). A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, 94(6), 1395-1401.

128. VALKIŪNAS, G., ATKINSON, C. T., BENSCH, S., SEHGAL, R. N., & RICKLEFS, R. E. (2008b). Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number. *Trends in parasitology*, 24(6), 247-248.
129. VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., LOISEAU, C., & SEHGAL, R. N. (2009). Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology*, 95(6), 1512-1515.
130. VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, TA., CARLSON, JS., SEHGAL, RNM., 2011. Two new *Trypanosoma* species from African birds, with notes on the taxonomy of avian trypanosomes. *J. Parasitol.* 97, 924–930.
131. VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., EVANS, E., CARLSON, J. S., MARTÍNEZ-GÓMEZ, J. E., & SEHGAL, R. N. (2013). Two new Haemoproteus species (Haemosporida: Haemoproteidae) from columbiform birds. *The Journal of Parasitology*, 99(3), 513-521.
132. VALKIŪNAS, G., & IEZHOVA, TA. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malaria Journal*, 17(1), 1-24.
133. VALKIŪNAS, G., & IEZHOVA, T. A. (2022). Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). *Malaria journal*, 21(1), 269.
134. VAN RIPER III, C., VAN RIPER, SG., GOFF, ML., & LAIRD, M. (1986). The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological monographs*, 56(4), 327-344.
135. VERSIANI, V. & GOMES, B.F. (1941) Sobre um novo hematozoario da galinha, Plasmodium juxtannucleare n. sp. (Nota previa). *Revista Brasileira de Biologia* 1, 231–233.
136. VICENTE, J. J., RODRIGUES, H. D. O., GOMES, D. C., & PINTO, R. M. (1995). *Nematóides do Brasil. Parte IV: nematóides de aves. Revista Brasileira de Zoologia*, 12, 1-273.
137. VIEIRA, L., PEREIRA, P., VILELA, D., LANDAU, I., PACHECO, M., ESCALANTE, A., . . . BRAGA, É. (2023). Leucocytozoon cariamae n. sp. and Haemoproteus pulcher coinfection in Cariama cristata (Aves: Cariamiformes): First mitochondrial genome analysis and morphological description of a leucocytozoid in Brazil. *Parasitology*, 1-11. doi:10.1017/S0031182023000811

138. VOTÝPKA, J., OBORNIK, M., VOLF, P., SVOBODOVÁ, M., & LUKE, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125(3), 253-263.
139. WARNER, R. E. (1968). The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *The Condor*, 70(2), 101-120.
140. WHELAN, C. J., ŞEKERCIOĞLU, Ç. H., & WENNY, D. G. (2015). Why birds matter: from economic ornithology to ecosystem services. *Journal of Ornithology*, 156, 227-238.
141. White, E. M., Greiner, E. C., Bennett, G. F., & Herman, C. M. (1978). Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. *Revista de Biologia Tropical*, 26(1), 43-102.
142. WOODWORTH-LYNAS, C. B., CAINES, J. R., & BENNETT, G. F. (1989). Prevalence of avian haematozoa in São Paulo state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 515-526.
143. WU S, CRESPI CM, WONG WK (2012). Comparison #of methods for estimating the intraclass correlation coefficient for binary responses in cancer prevention cluster randomized trials. *Contemporary Clinical Trials* 869-880 (10.1016/j.cct.2012.05.004)
144. ZUBEROGOITIA, I., ZABALA, J., & MARTÍNEZ, J. E. (2018). Moulting in birds of prey: a review of current knowledge and future challenges for research. *Ardeola*, 65(2), 183-207.

Apêndice

APÊNDICE A – Número de indivíduos capturados por gênero, família e ordem das aves.

Gêneros	Família	Ordem	Indivíduos
Amazilia	Trochilidae	Apodiforme	4
Antilophia	Pipridae	Passeriformes	4
<i>Arremon</i>	Passerellidae	Passeriformes	4
Arundinicola	Tyrannidae	Passeriformes	1
Basileuterus	Parulidae	Passeriformes	1
Camptostoma	Tyrannidae	Passeriformes	9
Certhiaxis	Furnariidae	Passeriformes	3
Chloroceryle	Alcedinidae	Coraciiformes	5
Chrysomus	Icteridae	Passeriformes	11
<i>Cnemotriccus</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1
Coereba	Thraupidae	Passeriformes	5
Columbina	Columbidae	Columbiformes	26
Conopophaga	Conopophagidae	Passeriformes	1
Coryphospingus	Thraupidae	Passeriformes	7
Corythopsis	Rhynchocyclidae	Passeriformes	8
Crotophaga	Cuculidae	Cuculiformes	1
Donacobius	Donacobiidae	Passeriformes	1
Drymophila	Thamnophilidae	Passeriformes	1
Dysithamnus	Thamnophilidae	Passeriformes	4
Elaenia	Tyrannidae	Passeriformes	7
Estrilda	Estrildidae	Passeriformes	1
Eucometis	Thraupidae	Passeriformes	1
Euphonia	Fringillidae	Passeriformes	1
Fluvicola	Tyrannidae	Passeriformes	4
Formicivora	Thamnophilidae	Passeriformes	3
Forpus	Psittacidae	Psittaciformes	1
Furnarius	Furnariidae	Passeriformes	7
Galbula	Galbulidae	Galbuliformes	2
Geothlypis	Parulidae	Passeriformes	3

Heliomaster	Tyrannidae	Passeriformes	1
Ilicura	Pipridae	Passeriformes	1
Lathrotriccus	Tyrannidae	Passeriformes	10
Leptopogon	Rhynchocyclidae	Passeriformes	1
Leptotila	Columbidae	Columbiformes	2
Manacus	Pipridae	Passeriformes	25
Molothrus	Icteridae	Passeriformes	1
Myiarchus	Tyrannidae	Passeriformes	8
Myiodynastes	Tyrannidae	Passeriformes	2
Myiophobus	Tyrannidae	Passeriformes	2
Myiothlypis	Parulidae	Passeriformes	21
Myiozetetes	Tyrannidae	Passeriformes	2
<i>Nemosia</i>	Thraupidae	Passeriformes	1
Neopelma	Pipridae	Passeriformes	1
Passer	Passeridae	Passeriformes	2
Patagioenas	Columbidae	Columbiformes	1
Phaethornis	Trochilidae	Apodiforme	2
Pitangus	Tyrannidae	Passeriformes	2
Platyrinchus	Platyrinchidae	Passeriformes	2
Pseudoleistes	Icteridae	Passeriformes	3
Pygochelidon	Hirundinidae	Passeriformes	2
Pyriglena	Thamnophilidae	Passeriformes	2
Pyrocephalus	Tyrannidae	Passeriformes	1
Satrapa	Tyrannidae	Passeriformes	2
Sicalis	Thraupidae	Passeriformes	88
Sporophila	Thraupidae	Passeriformes	45
Stelgidopteryx	Hirundinidae	Passeriformes	2
Stilpnia	Thraupidae	Passeriformes	5
Synallaxis	Furnariidae	Passeriformes	8
Tachyphonus	Thraupidae	Passeriformes	2
Thalurania	Trochilidae	Apodiforme	7
Thamnophilus	Thamnophilidae	Passeriformes	4

	Thraupis	Thraupidae	Passeriformes	6
	Todirostrum	Rhynchocyclidae	Passeriformes	1
	Tolmomyias	Rhynchocyclidae	Passeriformes	1
	Troglodytes	Troglodytidae	Passeriformes	6
	Turdus	Turdidae	Passeriformes	2
	Volatinia	Thraupidae	Passeriformes	66
Total	67	24	7	467

APÊNDICE B – Relação de espécies por comportamento de migração e alimentar.

Espécies	Migratória ou residente	Guilda Alimentar
<i>Amazilia lactea</i>	Não	Nectarívoro
<i>Antilophia galeata</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro
<i>Arremon flavirostris</i>	Não	Insetívoro
<i>Arundinicola leucocephala</i>	Não	Insetívoro
<i>Basileuterus culicivorus</i>	Não	Insetívoro
<i>Camptostoma obsoletum</i>	Não	Insetívoro
<i>Certhiaxis cinnamomeus</i>	Não	Insetívoro
<i>Chloroceryle amazona</i>	Não	Onívoro
<i>Chloroceryle americana</i>	Não	Onívoro
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Sim	Frugívoro e Insetívoro
<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Não	Insetívoro
<i>Coereba flaveola</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro
<i>Columbina minuta</i>	Não	Granívoro
<i>Columbina talpacoti</i>	Não	Granívoro
<i>Conopophaga lineata</i>	Não	Insetívoro
<i>Coryphospingus pileatus</i>	Não	Granívoro
<i>Corythopsis delalandi</i>	Não	Insetívoro
<i>Crotophaga ani</i>	Não	Carnívoro
<i>Donacobius atricapilla</i>	Não	Insetívoro
<i>Drymophila ochropyga</i>	Não	Insetívoro
<i>Dysithamnus mentalis</i>	Não	Insetívoro
<i>Elaenia flavogaster</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro

<i>Elaenia spectabilis</i>	Sim	Frugívoro e Insetívoro
<i>Estrilda astrild</i>	Não	Granívoro
<i>Eucometis penicillata</i>	Não	Insetívoro
<i>Euphonia chlorotica</i>	Não	Frugívoro
<i>Fluvicola nengeta</i>	Não	Insetívoro
<i>Formicivora rufa</i>	Não	Insetívoro
<i>Formicivora serrana</i>	Não	Insetívoro
<i>Forpus xanthopterygius</i>	Não	Frugívoro
<i>Furnarius figulus</i>	Não	Insetívoro
<i>Furnarius leucopus</i>	Não	Insetívoro
<i>Furnarius rufus</i>	Não	Insetívoro
<i>Galbula ruficauda</i>	Não	Insetívoro
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	Não	Insetívoro
<i>Heliomaster squamosus</i>	Não	Herbívoro
<i>Ilicura militaris</i>	Não	Frugívoro
<i>Lathrotriccus euleri</i>	Não	Insetívoro
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Não	Insetívoro
<i>Leptotila verreauxi</i>	Não	Frugívoro e Granívoro
<i>Manacus manacus</i>	Não	Frugívoro
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	Não	Insetívoro
<i>Myiarchus ferox</i>	Não	Insetívoro
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Não	Insetívoro
<i>Myiodynastes maculatus</i>	Sim	Insetívoro
<i>Myiophobus fasciatus</i>	Sim	Insetívoro
<i>Myiothlypis flaveola</i>	Não	Insetívoro
<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro
<i>Myiozetetes similis</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro
<i>Nemosia pileata</i>	Não	Insetívoro
<i>Neopelma pallescens</i>	Não	Insetívoro
<i>Passer domesticus</i>	Não	Onívoro
<i>Patagioenas picazuro</i>	Não	Frugívoro e Granívoro
<i>Phaethornis pretrei</i>	Não	Nectarívoro

<i>Phaethornis ruber</i>	Não	Nectarívoro
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Não	Onívoro
<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Não	Insetívoro
<i>Pseudoleistes guirahuro</i>	Não	Granívoro
<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Não	Insetívoro
<i>Pyriglena leucoptera</i>	Não	Insetívoro
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Sim	Insetívoro
<i>Satrapa icterophrys</i>	Sim	Insetívoro
<i>Sicalis flaveola</i>	Não	Granívoro
<i>Sporophila ardesiaca</i>	Não	Granívoro
<i>Sporophila caerulescens</i>	Não	Granívoro
<i>Sporophila leucoptera</i>	Não	Granívoro
<i>Sporophila lineola</i>	Sim	Granívoro
<i>Sporophila nigricollis</i>	Não	Granívoro
<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Não	Insetívoro
<i>Stilpnia cayana</i>	Não	Frugívoro e Insetívoro
<i>Synallaxis albescens</i>	Não	Insetívoro
<i>Synallaxis frontalis</i>	Não	Insetívoro
<i>Synallaxis hypospodia</i>	Não	Insetívoro
<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Não	Insetívoro
<i>Tachyphonus coronatus</i>	Não	Frugívoro, Granívoro e Insetívoro
<i>Thalurania furcata</i>	Não	Nectarívoro
<i>Thalurania glaucopis</i>	Não	Nectarívoro
<i>Thamnophilus caerulescens</i>	Não	Insetívoro
<i>Thraupis sayaca</i>	Não	Frugívoro
<i>Todirostrum cinereum</i>	Não	Insetívoro
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Não	Insetívoro
<i>Troglodytes musculus</i>	Não	Insetívoro
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sim	Insetívoro
<i>Volatinia jacarina</i>	Não	Granívoro