

**NAYARA DE OLIVEIRA BELO**

**Prevalência e Diversidade de Haemosporida em  
aves silvestres de diferentes habitats no Brasil e  
na Venezuela.**

Belo Horizonte

2011

**Nayara de Oliveira Belo**

**Prevalência e Diversidade de Haemosporida em  
aves silvestres de diferentes habitats no Brasil e  
na Venezuela.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

**Orientadora: Érika Martins Braga**

(Depto.Parasitologia - ICB/UFMG)

**Co-Orientadora: Teofânia Vidigal**

(Depto. Zoologia – ICB/UFMG)

Belo Horizonte

2011

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.  
Por isso cante, chore, ria e viva intensamente  
antes que a cortina se feche  
e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

**Ao meu esposo Mário,  
aos meus pais e às minhas irmãs.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e presença em todos os momentos da minha vida.

Ao Mário, meu amor, agradeço por estar sempre presente, pelo carinho, pela compreensão, por entender meus períodos de estresse, por me apoiar nas minhas viagens de coleta em Tocantins, por me incentivar e me acompanhar na viagem para os Estados Unidos durante o doutorado sanduiche.

Aos meus pais, Nelson e Valmisia, pelo incentivo e amor. Às minhas irmãs, Najara e Naiana, pela amizade, carinho e conselhos sempre muito importantes.

À professora e orientadora Érika Martins Braga por me orientar de forma dedicada, por ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de pesquisa, pela disposição em contribuir para a melhor realização do trabalho, como viajar para coleta no campo (com milhares de mosquitos, rãs e outros bichinhos que nos acompanhavam!), viajar para workshop onde encontramos os melhores pesquisadores da área, afim de mostrar-lhes que também existe alguém que estuda malária aviária no Brasil!

As amigas do Laboratório de Malária, Lilian, Cris, Pati e Luiza pela amizade, cumplicidade e pelos ótimos momentos que passamos juntas. Ao Gabriel e Rafael pelo bom convívio.

À Camila, Julinha e Mêrces agradeço pela amizade e por estarem sempre presentes desde a iniciação científica, durante todo o meu mestrado e agora o doutorado, uma longa jornada juntas.

Ao Renato Torres Pinheiro e Déborah Rodello pela colaboração nas coletas de aves silvestres, agradeço pelos ensinamentos sobre ornitologia, desde a montar uma rede de neblina até a identificar e anilhar as aves silvestres. Agradeço a Vaninha pela ajuda nas análises de diversidade.

Agradeço a Prof. Dra. Teofânia pela co-orientação e pela ajuda na parte da biologia molecular.

Ao Dr. Robert Ricklefs, “Bob”, agradeço pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na University of Missouri (UMSL), durante os 10 meses que passei em seu laboratório aprendi como é importante pensar de forma simples. Agradeço pelas grandes idéias, pelo incentivo e pela enorme ajuda no processamento das sequências e, principalmente, pela ajuda nas análises e por ter cedido as amostras da Venezuela.

Agradeço aos companheiros de Laboratório da UMSL, Alan Fecchio, Maria Pil, Leticia Gutierrez, Matt Medeiros e principalmente a Maria Svensson pela ajuda com os softwares de análise genética. Adriana Rodriguez-Ferraro pela coleta das amostras das aves venezuelanas.

Agradeço a Márcia pela ajuda no exame dos esfregaços sanguíneos.

Ao professor Dr. Paulo Pimenta do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou por ter cedido às amostras de sangue infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. Ao professor Dr. Nelson Rodrigo por ter cedido as amostras de sangue dos pintinhos, meu controle negativo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de realização desta Tese de Doutorado.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche, a Fapemig pelo apoio financeiro.



## RESUMO

Alterações ambientais, tais como a perda e degradação do habitat, influenciam a distribuição de espécies silvestres o que pode ser um fator importante de mudança na ecologia de transmissão de patógenos e conseqüentemente ocasionar o aparecimento e proliferação de doenças. O Cerrado brasileiro vem sofrendo um intenso e rápido processo de fragmentação e degradação graças às atividades de agricultura e urbanização. A fim de compreender melhor como diferentes tipos de habitats impactados ou não influenciam a prevalência de doenças infecciosas no ambiente silvestre, três áreas no estado do Tocantins, com diferentes características ambientais foram estudadas com relação à prevalência e diversidade genética de hemosporídeos, *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. Desta forma, 676 aves silvestres de três diferentes ambientes (Cerrado alterado, Cerrado intacto e área de transição Amazônia-Cerrado) foram analisadas. Foi observada uma elevada prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. nos três ambientes estudados, com uma prevalência total de infecção de 46%, sendo 54,7% das aves infectadas oriundas do cerrado alterado, 41,4% do cerrado preservado e 50,2% da área de transição. Vários aspectos relacionados à prevalência de parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foram analisados, como os efeitos do habitat, estação chuvosa ou seca, presença de espécies migratórias, muda de penas, guildas tróficas, sendo observado uma alta prevalência de parasitos em aves capturadas na mata (56%) e naquelas aves florestais que frequentam áreas abertas (54,5%). Alta prevalência também foi observada em aves capturadas no período chuvoso (38,7%), entre aves migratórias (44%) e entre aves onívoras (59,2%). Vinte e uma linhagens de parasitos foram definidas a partir de sequências mitocondriais, incluindo 11 linhagens de *Plasmodium* e 10 linhagens de *Haemoproteus*. A prevalência e a diversidade de infecções por *Plasmodium* spp. ou *Haemoproteus* spp. foram similares entre os três habitats estudados. Entretanto, maior prevalência de parasitos pôde ser detectada em aves da área de Cerrado alterado quando comparada àquelas oriundas da área de Cerrado intacto. Quinze das linhagens de hemoparasitos são primeiramente descritas em nosso trabalho e podem ser restritas à esses habitats ou à esta região específica no Brasil central. Seis linhagens de haemosporídeos foram previamente descritas em outras regiões, especialmente na Bacia do Caribe. Assim, determinou-se também, de forma comparativa, a prevalência e diversidade de parasitos em aves oriundas de uma zona árida da Venezuela. Alta prevalência de hemoparasitos (41%) foi detectada para esta região sendo que nove novas linhagens foram primeiramente descritas.

Cinco linhagens brasileiras foram compartilhadas com cinco linhagens da Venezuela, sendo seis linhagens de *Plasmodium* e quatro linhagens de *Haemoproteus*. Estas linhagens compartilhadas entre o Brasil e Venezuela não estão restritas a um determinado hospedeiro e ocorrem frequentemente em diferentes regiões do mundo. Possivelmente estas linhagens são linhagens generalistas.

Este é o primeiro estudo de malária aviária realizado em habitat urbano, habitat de transição Cerrado-Amazônia e em habitat árido, é importante relatar a alta prevalência e diversidade dos parasitos encontrados nestas áreas. A fim de compreender melhor as relações entre a paisagem e os parasitos causadores da malária aviária é necessário realizar mais estudos em diferentes tipos de habitats que compõem os ecossistemas da região brasileira e venezuelana.

Palavras-chave: *Plasmodium*, Reação em cadeia de polimerase, Microscopia óptica, Haemosporida, Protozoologia.

## ABSTRACT

Environmental changes such as loss and habitat degradation influence the distribution of wild species, which may be an important factor for change in the ecology of pathogen transmission therefore lead to the emergence and proliferation diseases. Brazil has been suffering from an intense and rapid process fragmentation and degradation due to agricultural activities and urbanization. In order to better understand how different types of impacted habitats or not influence the prevalence of infectious diseases in a wild environment, three areas in the Tocantins State, with different environmental characteristics were studied with respect to prevalence and genetic diversity of haemosporidian, *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. Therefore, 676 wild birds from three different environments (intact Cerrado, disturbed Cerrado and transition area Amazonian rainforest-Cerrado) were analyzed. We observed a high prevalence of *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. in the three environments, with an overall infection prevalence of 46%, being 54.7% of infected birds originated from the disturbed Cerrado, 41.4% of intact Cerrado, 50.2% of transition area. Several aspects related to the prevalence of parasitism by *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. were analyzed, such as the effects of type and habitat preferences, rainy or dry season, the presence of migratory species, molting and feeding guilds. We observed a high prevalence of parasites in birds caught in the woods (56%), and those in birds that attend the open forest (54.5%). A high prevalence also was observed in birds caught in the rainy season (38.7%) among migratory birds (44%) and omnivorous birds (59.2%). Twenty-one parasite lineages were defined from mitochondrial sequences, including 11 *Plasmodium* lineages and 10 *Haemoproteus* lineages. The prevalence and diversity of *Plasmodium* spp. or *Haemoproteus* spp. were similar among the three habitats studied. However, higher parasite prevalence was detected in birds of the disturbed Cerrado area when compared to those derived from the intact Cerrado area. Fifteen of the parasite lineages had not been previously described and might be restricted to these habitats or to the Tocantins region. Six haemosporidian lineages previously known from other regions, particularly the Caribbean Basin, comprised 50-80% of infections in each of the samples, indicating a regional relationship between distribution and parasite abundance. Thus, it was also determined by comparative analysis, the parasite prevalence and diversity in birds from an arid zone of Venezuela. High prevalence of haemoparasites (41%) was detected for this region and nine new lineages were first described. Five Brazilian lineages were shared with five Venezuela lineages, being six *Plasmodium*

lineages and four *Haemoproteus* lineages. These lineages shared between Brazil and Venezuela are not restricted to a particular host and often occur in different regions of the world. Possibly these lineages are generalist lineages.

In order to better understand the relationship between landscape and avian malaria parasites it is necessary to perform more studies in different habitat types that comprise the ecosystems of Brazilian and Venezuelan regions.

Keywords: *Plasmodium*, Polymerase Chain Reaction, Microscopy, Haemosporida, Protozoology.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1. MALÁRIA AVIÁRIA.....	2
1.1.1. <i>Plasmodium</i> spp.....	3
1.1.1.2. Ciclo Biológico.....	6
1.1.1.3. Aspectos patológicos da infecção por plasmódios em aves .....	7
1.1.2. <i>Haemoproteus</i> spp.....	8
1.1.2.1. Ciclo biológico.....	10
1.1.2.2. Aspectos patológicos da infecção por <i>Haemoproteus</i> em aves.....	10
1.2. DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA AVIÁRIA E SUAS LIMITAÇÕES.....	11
1.2.1. Microscopia óptica .....	11
1.2.2. Técnicas moleculares de detecção de parasito .....	12
1.3. RELAÇÃO ENTRE <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp., FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS .....	14
1.4. RELAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE HABITATS NATURAIS E A INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp.....	15
1.5. DIVERSIDADE DOS PARASITOS DA MALÁRIA AVIÁRIA .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. ÁREAS DE ESTUDO NO BRASIL.....	26
3.2. ÁREAS DE ESTUDO NA VENEZUELA .....	29
3.3. CAPTURA E MARCAÇÃO DAS AVES .....	30
3.4. COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE.....	31
3.5. DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp.....	33
3.5.1. Esfregaço sanguíneo .....	33
3.6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp.....	33
3.6.1. Extração de DNA .....	33
3.6.2. Amplificação do gene estrutural 18S rRNA.....	34
3.6.3. Amplificação do gene SSU rRNA mitocondrial .....	35
3.7. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp. ....	36
3.7.1. Sequenciamento da região do gene mitocondrial citocromo b.....	37
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE AVES SILVESTRES ANALISADAS.....	40

4.2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp. NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS.....	40
4.2.1. Detecção de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos.....	40
4.2.2. Detecção da infecção por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. utilizando PCR.....	41
4.2.3. Detecção de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. a partir da associação de PCRs.....	42
4.2.4. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. obtida pela correlação entre a microscopia óptica e PCRs.....	42
4.2.4.1. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. por espécie de hospedeiro.....	43
4.2.4.2. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. nas três diferentes áreas estudadas.....	43
4.2.4.3. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. de acordo com o tipo de habitat.....	45
4.2.4.4. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. em função do habitat.....	47
4.2.4.5. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. de acordo com o período chuvoso ou período da seca.....	48
4.2.4.6. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. em função do status migratório.....	50
4.2.4.7. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. em função da muda das penas.....	50
4.2.4.8. Prevalência total de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. entre guildas tróficas.....	51
4.3. RIQUEZA DE DIVERSIDADE DE LINHAGENS DE <i>PLASMODIUM/HAEMOPROTEUS</i> NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS.....	52
4.3.1. Prevalência de linhagens de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. de acordo com as características dos habitats.....	57
4.3.2. Prevalência de linhagens de <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> X status migratório e residente.....	59
4.4. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE AVES SILVESTRES DA VENEZUELA ANALISADAS.....	60
4.5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp./ <i>HAEMOPROTEUS</i> spp. NAS AMOSTRAS DA VENEZUELA.....	60
4.6. DIVERSIDADE DE <i>PLASMODIUM/HAEMOPROTEUS</i> NAS AMOSTRAS DA VENEZUELA.....	61
4.7. RELAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS BRASILEIROS E VENEZUELANOS.....	64
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do parasito <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Número I e II representa a merogonia exo-eritrocítica primária, III ciclo eritrocítico (merogonia eritrocítica) e IV merogonia exo-eritrocítica secundária.....	7
Figura 2: Esfregaço sanguíneo evidenciando um meronte jovem (A), trofozoíto jovem (B), meronte maduro (C), gametócitos de <i>Plasmodium</i> spp. (D) e gametócitos de <i>Haemoproteus</i> spp. (E); (a) grânulos de hemozoína, (b) membrana do gametócito (c) citoplasma do gametócito (aumento 1000X).....	9
Figura 3: Ciclo biológico do parasito <i>Haemoproteus</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	10
Figura 4: Mapa do Brasil evidenciando a localização das áreas de estudo no estado do Tocantins .....	27
Figura 5: Área Urbana de Palmas-TO, Cerrado alterado, Brasil.....	28
Figura 6: Parque Estadual do Lajeado, Cerrado bem preservado, Brasil.....	28
Figura 7: Parque Estadual do Cantão, área de transição Amazônia-Cerrado, Brasil .....	28
Figura 8: Localização de zonas áridas (sombreado) no norte da Venezuela. Áreas de estudo da região Oeste (PP = Península Paraguaná, FL = Falcón, LL = Lara e MP = Macanao Península) e região Leste (CP = Clarines-Piritu, AP = Araya Península) .....	30
Figura 9: Contenção da ave silvestre para coleta de sangue.....	32
Figura 10: Obtenção de amostra de sangue para confecção de esfregaços sanguíneos e para extração de DNA. ....	32
Figura 11: Prevalência de aves parasitadas por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. no Parque Estadual do Cantão (n=305), Parque Estadual do Lajeado (n=181) e Área Urbana de Palmas (n=190), estado do Tocantins .....	44
Figura 12: Prevalência de aves infectadas por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. nos períodos de 2006/2007 e 2008/2009. ....	45
Figura 13: Prevalência total de aves parasitadas por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. no estado do Tocantins, em relação ao habitat onde foram capturadas: Cerrado, mata e capoeira (as figuras A, B e C representam, respectivamente, a prevalência para as áreas AUP, PEL e PEC). ....	46
Figura 14: Prevalência total de aves parasitadas por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. de acordo com o habitat (F1-espécies estritamente florestais, F2- espécies florestais que também usam áreas abertas, C1- espécies estritamente campestres e C2- espécies campestres que também usam áreas florestais) .....	47
Figura 15: Prevalência sazonal total de aves parasitadas por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. na estação seca (maio a outubro) e chuvosa (novembro a abril). Prevalência sazonal em cada uma das localidades estudadas (A- AUP; B- PEL; C- PEC ).....	49

- Figura 16: Prevalência total de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com as guildas tróficas. .... 51
- Figura 17: Linhagens de hemoparasitos e número de infecções encontradas nas áreas preservadas e no Cerrado alterado (AUP- cerrado alterado, PEL- cerrado intacto e PEC- área de transição). .... 54
- Figura 18: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizadas no Estado do Tocantins em três áreas estudadas (■AUP, ▲PEL e ●PEC). Relação filogenética de 31 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados) (AUP- cerrado alterado, PEL- cerrado intacto e PEC- área de transição). .... 56
- Figura 19: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizada na região urbana de Palmas (AUP). Relação filogenética de 12 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados). .... 57
- Figura 20: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizada na região do Parque Estadual do Lajeado (PEL). Relação filogenética de 13 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados). .... 58
- Figura 21: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. de aves silvestres localizada na região do Parque Estadual do Cantão (PEC). Relação filogenética de 11 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados). .... 58
- Figura 22: Filograma de 13 linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em três espécies de aves silvestres pertencentes a duas famílias com status migratório (Tyrannidae) e residente (Pipridae)(*bootstrap* de 1000 réplicas). .... 59
- Figura 23: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em uma comunidade de aves silvestres. As relações filogenéticas das 17 linhagens de Haemosporida encontradas em duas regiões diferentes, baseados em sequências do cit b. Os números localizados nos nós indicam apoio ao *bootstrap* ML (100 repetições, apenas valores acima de 50% são exibidos). A presença de cada linhagem do parasito nas duas áreas estudadas é indicado por: região Oeste (O) e a região Leste (□). Linhagens dos parasitos relacionados em outros estudos (\*). .... 62
- Figura 24: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em comunidades de aves silvestres pertencentes ao Brasil e a Venezuela, baseados em sequências do citocromo b. Os números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (100 réplicas). A presença de linhagens semelhantes entre os dois países é indicado por: ● ..... 65

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Fatores morfológicos de cinco subgêneros de *Plasmodium* aviário. .... 5
- Tabela 2: Números de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. obtidas pela PCR que amplifica o gene 18S rRNA e pela PCR que amplifica o gene SSU mitocondrial para 676 aves analisadas ..... 42



Tabela 3: Números de amostras positivas e negativas para <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. obtidos pela M.O. e PCR (simples e <i>nested</i> ) para 651 aves analisadas.....	43
Tabela 4: Diversidade de parasitos da malária aviária no Estado do Tocantins.....	53
Tabela 5: Relação de linhagens de parasitos já relatadas em outros estudos .....	55
Tabela 6: Riqueza de diversidade de linhagens estimada pelo índice de Chao1 (S) na área urbana (AU), Cerrado natural (PEL) e área de transição (PEC). SD – Desvio padrão, CI: Intervalo de confiança. S% - Porcentagem riqueza total estimada em cada área. ....	55
Tabela 7: Prevalência (%) de <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. de acordo com as regiões estudadas (leste e oeste) e o sexo em duas espécies de aves silvestres. ....	61
Tabela 8: Relação de linhagens de parasitos já relatados em outros estudos.....	63
Tabela 9: Diversidade de parasitos da malária aviária na região norte da Venezuela.....	63
Tabela 10: Tamanho das amostras e o índice de diversidade de Shannon (H'), para as linhagens de parasitos detectados nas regiões do Brasil e Venezuela.....	66

## ANEXOS

ANEXO 1: Famílias e espécies de aves dos indivíduos examinados e infectados por <i>Plasmodium</i> spp., prevalência de infecção, <i>status</i> (migratório), tipos de habitat e guildas tróficas de aves capturadas no Parque Estadual do Cantão, Parque Estadual do Lajeado e área urbana de Palmas, estado do Tocantins.....	98
ANEXO 2: Famílias e espécies de aves dos indivíduos examinados e infectados por <i>Plasmodium</i> spp./ <i>Haemoproteus</i> spp. e prevalência de infecção de aves capturadas na região norte da Venezuela.....	102
ANEXO 3: Alinhamento múltiplo entre as sequências de DNA do gene citocromo b de <i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i> realizado a partir do programa Clustal X.....	103
ANEXO 4: Artigo: Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. Nayara O. Belo, Renato T. Pinheiro, Elivania S. Reis, Robert E. Ricklefs, Erika M. Braga. PlosOne, Published March 8, 2011.	
ANEXO 5: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), número 205/2006.	

## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 1.1. MALÁRIA AVIÁRIA

Nos últimos anos, pesquisadores têm discutido quais são os parasitos que causam malária aviária. Uma definição baseada em aspectos evolutivos dos parasitos da malária (o grupo monofilético formado por *Plasmodium* e *Haemoproteus*) é apoiada por dados moleculares recentes, embora seja incongruente com a definição convencional da malária baseada na história de vida que é exclusiva para parasitos do gênero *Plasmodium*. Para obter a definição sobre quais são os verdadeiros parasitos causadores da malária aviária podemos observar alguns aspectos clínicos que se restringem às espécies de parasitos para as quais os sintomas da malária aviária são diretamente identificados. Alguns sintomas da malária aviária, tais como a deposição de hemozoína e anemia são compartilhados por espécies dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* (CHEN et al, 2001; SCHRENZEL et al., 2003). Ambos os gêneros incluem espécies que causam um nível substancial de morbidade e mortalidade nas populações naturais.

Durante um século, parasitologistas que estudam a sistemática de parasitos classificaram os parasitos da malária em gêneros com base na morfologia e variações no ciclo de vida (incluindo o tipo de células do hospedeiro que o parasito usa para merogonia (reprodução assexuada que resulta na formação de merozoítos), o número de merozoítos produzidos e presença ou ausência de pigmento hemozoína) de vertebrados e insetos. O termo "parasito da malária" é sugerido para ser utilizado em espécies com restrita reprodução assexuada no sangue de vertebrados (*Plasmodium*) (VALKIŪNAS et al., 2005). É importante notar que o gênero *Plasmodium* é o único Haemosporida aviário que completa a merogonia dentro de eritrócitos (GARNHAM, 1966, VALKIŪNAS, 2005).

Parasitologistas descreveram mais de 200 espécies de hemosporídeos de centenas de espécies de aves e de 16 gêneros de insetos, e as colocaram em três gêneros distintos, *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (VALKIŪNAS, 2005). Características que foram utilizadas para definir esses gêneros e essas espécies dentro de cada gênero de parasito, incluem morfologia analisada em microscopia óptica, ultraestrutura, o curso e os detalhes do ciclo de vida, e na gama de hospedeiros (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Algumas espécies são diferenciadas com base apenas na espécie hospedeira ou características morfológicas. A sua identificação, a partir da observação microscópica, é baseada principalmente em características das fases intra-eritrocítica, fases assexuadas e

gametogônicas, além de grânulos de hemozoína (TELFORD, 1988).

Dados sobre as sequências do gene do parasito começaram a desafiar a sistemática clássica na classificação dos parasitos da malária, bem como as relações entre os gêneros reconhecidos atualmente. As análises filogenéticas baseadas no DNA mitocondrial e nuclear têm mostrado que traços morfológicos e da história de vida do parasito não indicam necessariamente parentesco entre os parasitos hemosporídeos (PERKINS & SCHALL, 2002; RICKLEFS et al., 2004; BENSCH et al., 2004). Foi proposto que o clado monofilético que inclui *Hepatocystis* + *Plasmodium* + *Haemoproteus* pode ser considerado dentro da categoria dos parasitos da malária aviária (PEREZ-TRIS et al., 2005; MARTISSEN et al., 2008). Entretanto, ainda é necessário realizar mais estudos a fim de definir quais são realmente os parasitos da malária aviária. Neste trabalho, nós consideramos os parasitos causadores da malária aviária como sendo *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

O status taxonômico do gênero *Hepatocystis* foi altamente instável ao longo dos anos. Primeiro foi classificado como "*Haemamoeba*" por LAVERAN (1899), como todos os parasitos da malária na época. Posteriormente, foi transferido para o *Plasmodium* (embora seja possível que esta reclassificação tenha sido resultado de uma infecção mista por *Plasmodium gonderi*) e, em seguida, para *Haemoproteus* quando parasitologistas não conseguiam encontrar evidências de replicação assexuada do parasito no sangue. A característica mais distintiva destes parasitos são os enormes esquizontes (visíveis a olho nu) no fígado. A partir disso, GARNHAM (1948) classificou esses parasitos como um gênero próprio.

### **1.1.1. *Plasmodium* spp.**

Os plasmódios são encontrados entre diferentes hospedeiros, incluindo aves, répteis e mamíferos. Estes parasitos pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Haemosporida, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*, sendo agrupados em 15 subgêneros, assim distribuídos: sete subgêneros ocorrem em répteis (TELFORD, 1988), três subgêneros em mamíferos, cinco subgêneros em aves (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 1997). Os subgêneros são divididos com base nas características morfológicas e biológicas dos estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos.

Os cinco subgêneros de *Plasmodium* que infectam aves são *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia* e estão apresentados na Tabela 1.

O subgênero *Haemamoeba* compreende espécies com esquizontes eritrocíticos grandes e arredondados, gametócitos arredondados e merogonia exo-eritrocítica no sistema fagocítico mononuclear (GARNHAM, 1966).

O subgênero *Huffia* é facilmente reconhecido por suas diferenças na merogonia exo-eritrocítica, apresenta esquizontes eritrocíticos relativamente pequenos, com dez ou menos merozoítos, gametócitos alongados e merogonia exo-eritrocítica profusa e contínua nas células do sistema hematopoiético, particularmente nas células precursoras dos eritrócitos (GARNHAM, 1966).

O subgênero *Giovannolaia* compreende parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanhos moderados a grandes, gametócitos alongados e a merogonia exo-eritrocítica que ocorre no sistema fagocítico mononuclear. A forma alongada dos gametócitos permite a diferenciação entre os subgêneros *Giovannolaia* e *Haemamoeba* (GARNHAM, 1966).

O subgênero *Novyella* inclui espécies com esquizontes pequenos com no máximo oito merozoítos e gametócitos alongados e os estágios assexuados possuem pouco citoplasma. As espécies podem ser divididas de acordo com seus hospedeiros vertebrados (GARNHAM, 1966).

O subgênero *Bennettinia*, sugerido recentemente por VALKIŪNAS (1997), é caracterizado por possuir esquizontes pequenos e arredondados e com citoplasma escasso. Ocupando posição próxima ao núcleo do eritrócito. Os gametócitos são variáveis, mas, frequentemente ovalados ou alongados.

Tabela 1: Fatores morfológicos de cinco subgêneros de *Plasmodium* aviário.

Subgênero	Merontes	Gametócitos	Espécies
Haemamoeba (Grassi & Feletti, 1890)	Grande e arredondado, desloca o núcleo da célula do hospedeiro.	Arredondado, oval ou forma irregular, o tamanho marcadamente excede o tamanho do núcleo do eritrócito infectado.	<i>P. relictum</i> , <i>P. cathemerium</i> , <i>P. matutinum</i> , <i>P. gallinaceum</i> <i>P. giovannolai</i> , <i>P. lutzi</i> , <i>P. subpraecox</i> , <i>P. griffithsi</i> , <i>P. tejerai</i> , <i>P. coturnixi</i>
Huffia (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Tamanho e forma variável, com dez ou menos merozoítos	Alongados	<i>P. elongatum</i> <i>P. hermani</i> <i>P. huffi</i>
Giovannolaia (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Tamanho moderado a grande. Geralmente encontrado em eritrócitos imaturos.	Alongados	<i>P. lophurae</i> , <i>P. circumflexum</i> , <i>P. polare</i> <i>P. gundersi</i> , <i>P. octamerium</i> , <i>P. pinottii</i> , <i>P. pedioecetae</i> , <i>P. formosanum</i> , <i>P. durae</i> , <i>P. hegneri</i> , <i>P. anasum</i> , <i>P. leanucleus</i> , <i>P. fallax</i> <i>P. garnhami</i>
Novyella (Corradetti, Garnham & Laird, 1963)	Pequeno com pouco citoplasma, com o máximo de oito merozoítos	Alongados	<i>P. vaughni</i> , <i>P. rouxi</i> , <i>P. hexamerium</i> , <i>P. nucleophilum</i> <i>P. dissanaikiei</i> , <i>P. bertii</i> , <i>P. columbae</i> , <i>P. paranucleophilum</i> , <i>P. kempfi</i> ,
Bennettinia (Valkiunas, 1997)	Pequeno, arredondado com pouco citoplasma, dois a seis merozoítos.	Variável, mas geralmente arredondado e Alongados	<i>P. juxtannucleare</i>

### **1.1.1.2. Ciclo Biológico**

O ciclo biológico do *Plasmodium* é heteroxeno, sendo composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Figura 1).

O desenvolvimento do parasito nas aves pode ser dividido em merogonia exo-eritrocítica, merogonia eritrocítica e formação de gametócitos.

A merogonia exo-eritrocítica é dividida em primária (pré-eritrocítica) e secundária (pós-eritrocítica). A merogonia pré-eritrocítica consiste de duas gerações de merontes, os quais são chamados de criptozoítos e metacriptozoítos, respectivamente. A merogonia pós-eritrocítica inclui a maioria das gerações de merontes, chamados de phanerozoítos (VALKIUNAS, 2005).

A transmissão ocorre quando o vetor se alimenta de uma ave infectada e ingere formas sexuadas denominadas gametócitos que irão formar, no estômago do vetor, o oocisto. Após a esporogonia, os esporozoítos, desenvolvidos nos oocistos, são liberados na cavidade celomática em direção às glândulas salivares, sendo o hospedeiro vertebrado infectado com esta forma quando picado pelo vetor. Os esporozoítos penetram nas células do retículo endotelial e nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) presentes no local da picada infectante e, posteriormente, nas células do SFM fixas à camada endotelial dos capilares sanguíneos cerebrais, do baço, fígado, rins e de outros órgãos (PARAENSE, 1945). Os esporozoítos dão origem a primeira geração de merontes primários exo-eritrocíticos (criptozoítos). Eles se desenvolvem predominantemente nas células reticulares de muitos órgãos e tecidos, incluindo a pele. Frequentemente os criptozoítos são encontrados no baço (formando cerca de 100 merozoítos). Eles são incapazes de infectar células sanguíneas. Os merozoítos desenvolvidos em criptozoítos induzem a segunda geração de merozoítos exo-eritrocíticos (metacriptozoítos), o qual se desenvolvem em macrófagos presentes em muitos órgãos. Os metacriptozoítos contêm um maior número de merozoítos do que os criptozoítos. Os merozoítos formados dos metacriptozoítos são capazes de infectar as células eritrocíticas. Uma parte dos merozoítos desenvolvidos nos metacriptozoítos induz a próxima geração de metacriptozoítos e phanerozoítos, enquanto a outra parte invade os eritrócitos, dando origem aos gametócitos. Neste estágio de desenvolvimento, o número de parasitos nas células do sangue ainda não é grande. Alguns

metacriptozoítos que penetram em eritrócitos jovens e/ou maduros, originam formas do parasito chamadas de trofozoítos.

Uma parte dos merozoítos formados em merontes eritrocíticos induz o próximo ciclo de merogonia eritrocítica e originam os gametócitos enquanto as outras partes penetram nas células endoteliais dos capilares de muitos órgãos incluindo o cérebro.

A maturação da primeira geração de phanerozoítos geralmente coincide com o aumento da parasitemia. Os phanerozoítos juntos com os merozoítos eritrocíticos mantêm a parasitemia durante os estágios crônicos da infecção. Em adição, os phanerozoítos são responsáveis pelas recaídas da infecção.

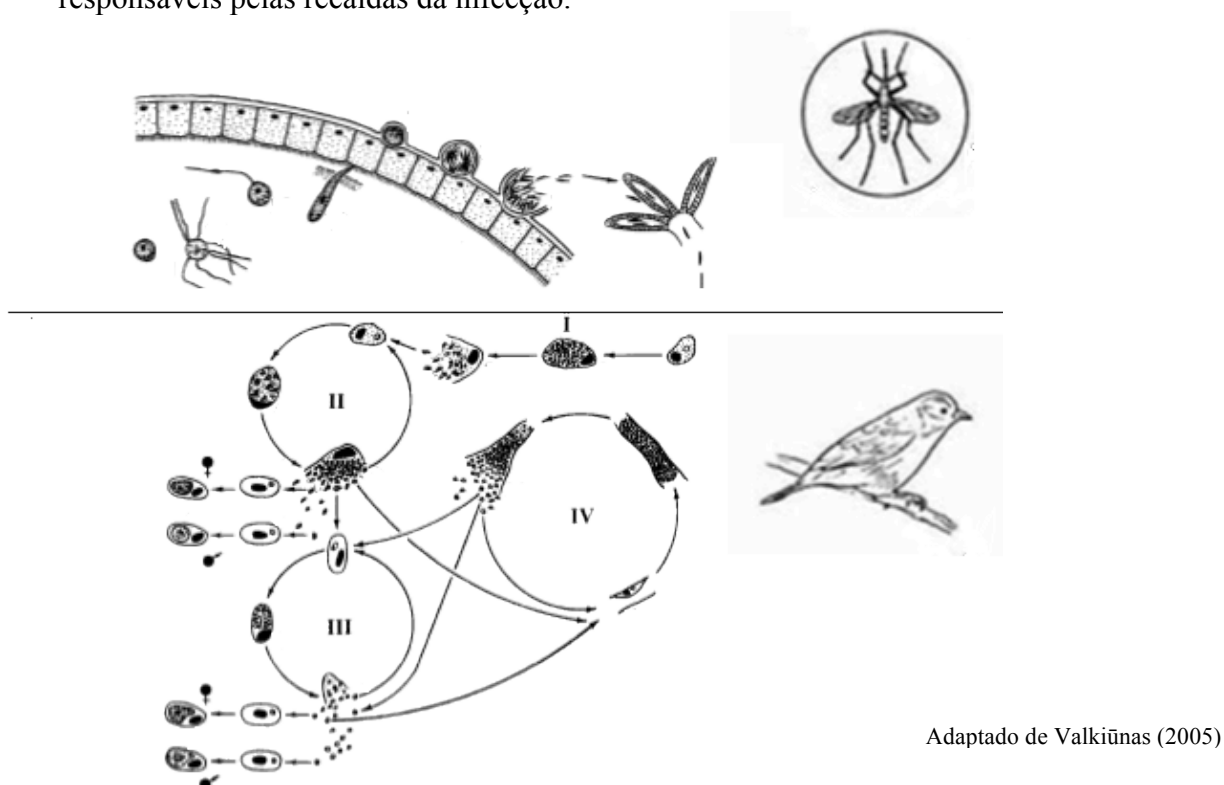


Figura 1: Ciclo biológico do parasito *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Número I e II representa a merogonia exo-eritrocítica primária, III ciclo eritrocítico (merogonia eritrocítica) e IV merogonia exo-eritrocítica secundária.

### 1.1.1.3. Aspectos patológicos da infecção por plasmódios em aves

A patogenia da infecção por hemoparasitos é bastante variável, apresentando desde expressão assintomática a casos de óbito. Essa variação pode estar relacionada a diversos



fatores que influenciam o organismo da ave infectada e que levam a um quadro de imunodepressão (CUBAS, 2007). Observa-se ainda que a gravidade da doença está diretamente envolvida com o grau de parasitemia (GARNHAM, 1966). Entretanto, a maioria das aves infectadas permanece ativa, não exibindo sinais de dor (CASTLE & CHRISTENSEN, 1990).

Aves infectadas por *Plasmodium* spp. podem apresentar uma fase crônica ou latente de infecção, na qual a resposta imune reduz a parasitemia a níveis bastante baixos e as aves sobreviventes apresentam, portanto, pouco ou nenhum sinal de infecção. Assim, as aves podem permanecer infectadas por toda a vida, resistindo a recaídas periódicas que são controladas por interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o estresse fisiológico (ATKINSON & van RIPER, 1991). Essas infecções crônicas que acometem a grande maioria das aves são difíceis de serem detectadas por meio do exame de esfregaços sanguíneos até que ocorra uma reativação por atividade hormonal ou estresse fisiológico e ambiental (ATKINSON & van RIPER, 1991).

A infecção causada por este parasito é subclínica, na maioria dos casos, porém recaídas podem ocorrer em condições de estresse ou na prevalência de infecções concomitantes com outros agentes de doença (GRACZYK et al., 1994; WALDENSTRÖM et al., 2002). O aparecimento de sinais clínicos está associado a infecções agudas com a expressão muito rápida dos sintomas, as aves infectadas podem se apresentar letárgicas, rejeitarem a bebida e comida, manifestar sinais de dor, além de penas eriçadas, cabeças decaídas e olhos fechados. Em casos mais graves pode ocorrer palidez das mucosas, dispneia, inapetência, regurgitação, e morte (ATKINSON et al., 1995).

### **1.1.2. *Haemoproteus* spp.**

*Haemoproteus* é um gênero de protozoários que são parasitos de aves, répteis e anfíbios.

O gênero é dividido em dois subgêneros (*Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*), o subgênero *Haemoproteus* pertence a parasitos que infectam aves pertencentes a ordem dos Columbiformes. O subgênero *Parahaemoproteus* infecta aves pertencentes a outras ordens, exceto a ordem dos Columbiformes. Neste gênero há três espécies que infectam anfíbios, 25 espécies que infectam répteis e 132 espécies que infectam aves (VALKIŪNAS, 2005).

*Haemoproteus* spp. é encontrado parasitando várias espécies de aves silvestres e parece ser específico em relação aos seus hospedeiros (BENNETT et al., 1972; BENNETT & PEIRCE, 1988; SAVAGE & GREINER, 2004; SAVAGE & BERMINGHAM, 2004; PEIRCE & ADLARD, 2005). Entretanto, alguns autores já evidenciaram um menor grau de especificidade de algumas linhagens de *Haemoproteus* spp. em relação a seus hospedeiros vertebrados (FALLON et al., 2003, 2005).

A diferenciação entre as espécies de *Haemoproteus* pode ser realizada a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos. Os gametócitos são as únicas formas evolutivas do parasito que são visualizadas no sangue das aves infectadas (Figura 2). Esta característica permite a diferenciação entre espécies do gênero *Haemoproteus* e aquelas pertencentes ao gênero *Plasmodium*. O sequenciamento de genes do parasito a partir de DNA também permite a identificação de espécies e tem ganhado destaque nos últimos anos.

Os vetores para as espécies de *Haemoproteus* são artrópodes hematófagos como os simulídeos, mosquitos hippoboscídeos, e moscas ceratopogonídeos (gênero Culicídeos) (DESSER & BENNETT, 1993) que completam parte do seu ciclo em água ou ambiente úmido (MELLOR et al., 2000).

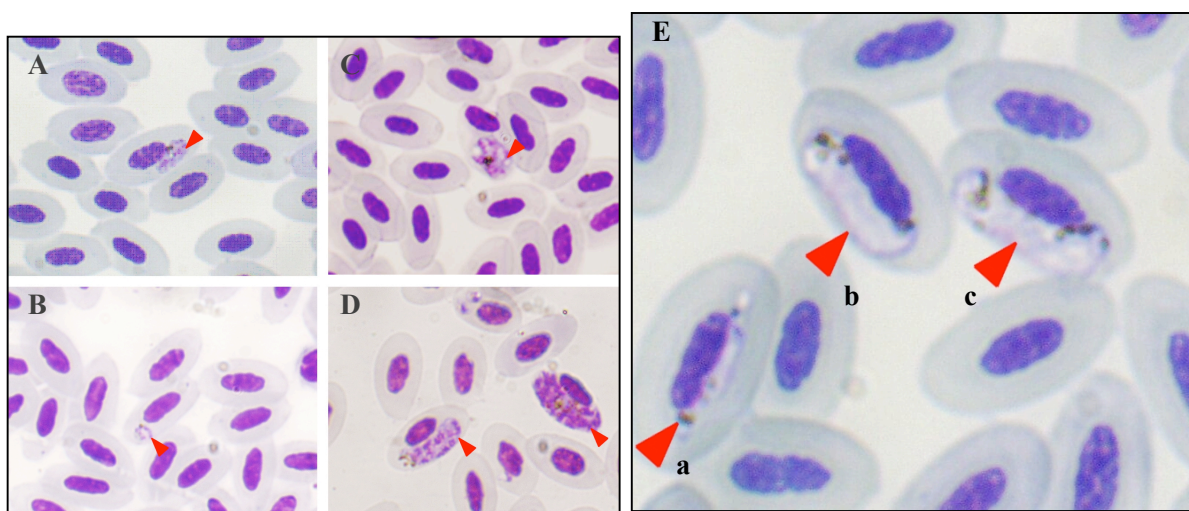
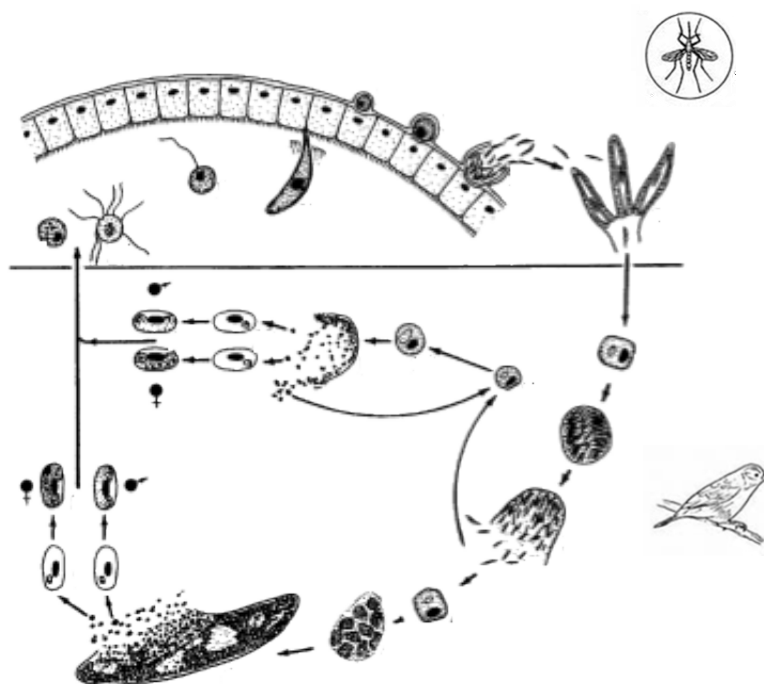


Figura 2: Esfregaço sanguíneo evidenciando um meronte jovem (A), trofozoíto jovem (B), meronte maduro (C), gametócitos de *Plasmodium* spp. (D) e gametócitos de *Haemoproteus* spp. (E); (a) grânulos de hemozoína, (b) membrana do gametócito (c) citoplasma do gametócito (aumento 1000X) (Fonte: Braga et al., 2010).

### 1.1.2.1. Ciclo biológico

O ciclo biológico do *Haemoproteus* se inicia quando os esporozoítos presentes na glândula salivar do inseto são inoculados no hospedeiro vertebrado e entram na circulação. Em seguida, ocorre a merogonia exo-eritrócítica no endotélio vascular de diferentes tecidos como pulmões, rins, fígado, baço e musculatura esquelética. Os merozoítos formados dentro dos esquizontes possuem formas e tamanhos variáveis. Após duas gerações de merogonia exo-eritrócítica, os merozoítos desenvolvidos penetram em eritrócitos dando origem aos gametócitos (Figura 3). Somente os gametócitos se desenvolvem em eritrócitos, sendo as únicas formas evolutivas visualizadas em esfregaço sanguíneo (VALKIŪNAS, 2005).



Adaptado de Valkiūnas (2005)

Figura 3: Ciclo biológico do parasito *Haemoproteus* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

### 1.1.2.2. Aspectos patológicos da infecção por *Haemoproteus* em aves

A patogenicidade do *Haemoproteus* em seus hospedeiros aviários ainda é muito discutida. Alguns estudos sugerem que o parasito exerça importantes efeitos patogênicos

em seus hospedeiros (ATKINSON & VAN RIPER, 1991). Além disso, a patogenicidade parece depender da abundância de parasitos em seus hospedeiros o que ocasionaria uma diminuição da eficiência do transporte de oxigênio para diferentes órgãos (SOL et al., 2003). Entretanto, a grande maioria dos estudos mostra que aves de vida livre não apresentam complicações clínicas relacionadas à infecção por *Haemoproteus* spp. (VALKIŪNAS, 2005).

## **1.2. DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA AVIÁRIA E SUAS LIMITAÇÕES**

### **1.2.1. Microscopia óptica**

A identificação de hemosporídeos, realizada a partir da observação microscópica, é baseada nas características dos estágios intra-eritrocíticos assexuados e dos estágios gametogônicos dos parasitos, além da presença de grânulos de hemozoína (TELFORD, 1988) (Figura 2). Este método busca quantificar os hemoparasitos pela distribuição dos eritrócitos não infectados e dos parasitados com a observação de um determinado número de campos microscópicos e/ou período de tempo gasto no exame de esfregaços sanguíneos fornecendo uma estimativa do número de parasitos (van RIPER III et al., 1986).

A análise de esfregaços sanguíneos para se estimar o número de eritrócitos não fornece determinação precisa do número de eritrócitos contados ou da intensidade de parasitos presentes. Além disso, o período preestabelecido de tempo para o exame dos esfregaços pode não ser considerada uma estimativa confiável do número total de eritrócitos examinados (GODFREY et al., 1987).

A identificação dos parasitos por meio da análise morfológica em esfregaços sanguíneos realizada por microscopia óptica permite a classificação dos plasmódios em subgêneros. A identificação dos subgêneros não é uma tarefa fácil durante as fases crônicas ou latentes, que correspondem à situação da maioria das aves infectadas devido à inexistência dos estágios sexuais e de outros estágios intra-eritrocíticos além dos trofozoítos, impossibilitando a classificação em subgênero (ATKINSON & van RIPER III, 1991).

Um obstáculo no diagnóstico microscópico é a identificação precisa das espécies de plasmódio, pois somente se consegue diagnosticar a espécie de *Plasmodium* diante da

visualização de todas as formas do parasito, de preferência usando amostras de sangue com infecções agudas (VALKIŪNAS, 2005). Outro fator que dificulta a identificação correta é a possibilidade de uma mesma espécie de *Plasmodium* se desenvolver em aves pertencentes a várias famílias, não ocorrendo especificidade em relação ao hospedeiro na maioria das espécies do parasito (IEZHOVA et al., 2005; KRIŽANAUSKIENÉ et al., 2006; PALINAUSKAS et al., 2009; PALINAUSKAS et al., 2011). Por exemplo, a linhagem P-SGS1 de *Plasmodium relictum* é generalista e tem sido encontrada em mais de 30 espécies de aves dentro de oito famílias de Passeriformes.

Outro fator complicador de identificação por microscopia óptica é a possível presença de infecções mistas das espécies de *Plasmodium* spp. no mesmo hospedeiro.

A identificação microscópica do parasito *Haemoproteus* é mais simples quando comparada à realizada para o gênero *Plasmodium*, isso porque somente são observados no esfregaço sanguíneo os gametócitos infectando as células sanguíneas. Portanto, a morfologia dos gametócitos e as características das alterações causadas nos eritrócitos pela presença do parasito é a base para a identificação das espécies de *Haemoproteus*. Outra maneira de identificação das espécies de *Haemoproteus* é a partir do pigmento malárico (hemozoína) que é formado em gametócitos na forma de grânulos de coloração marrom ou preta (Figura 1). O número, forma e a posição dos grânulos de hemozoína nos gametócitos são usados para a identificação das espécies. As outras formas do parasito, como os merontes, são encontrados nos pulmões, e menos frequentemente no fígado, baço, rins, coração, musculatura esquelética e outros órgãos (VALKIŪNAS, 2005).

Apesar do esfregaço sanguíneo ser um método muito trabalhoso, que requer técnicos treinados capazes de examinar um número elevado de esfregaços por dia (BARKER et al., 1992), ele ainda é considerado essencial para a detecção dos parasitos na ave, sendo utilizado extensivamente como método de diagnóstico padrão.

### **1.2.2. Técnicas moleculares de detecção de parasito**

As pesquisas têm demonstrado que a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica mais sensível do que o exame microscópico de esfregaços sanguíneos para a detecção de *Plasmodium* spp. no sangue de mamíferos, répteis e aves (FELDMAN et al., 1995; PERKINS et al., 1998; RIBEIRO et al., 2005). Alguns protocolos de PCR são

sensíveis para detectar infecções com concentrações de DNA do parasito correspondentes a um eritrócito infectado em 100.000 não infectados (FALLON et al., 2003).

A técnica de PCR pode ser utilizada na caracterização dos diferentes populações de *Plasmodium* em aves naturalmente infectadas. Além disso, pode fornecer o diagnóstico rápido e confiável, mesmo quando o hospedeiro mostra baixos níveis de parasitismo ou se está infectado por mais de uma espécie de parasito (RICHARD et al., 2002).

Nos últimos 10 anos, inúmeros protocolos para o diagnóstico molecular de infecções por *Plasmodium/Haemoproteus* vêm sendo desenvolvidos, entretanto, ainda existe uma grande dificuldade em diagnosticar infecções mistas pelos dois parasitos em um mesmo hospedeiro. De acordo com VALKIŪNAS e colaboradores (2006), ensaios baseados na PCR podem subestimar a prevalência de infecções mistas de hemoparasitos em aves naturalmente infectadas, sendo a amplificação do DNA do parasito pela PCR frequentemente menor durante as infecções mistas (*Haemoproteus* e *Plasmodium*). PERÉZ-TRIS & BENSCH (2005) desenvolveram métodos moleculares que buscam detectar infecção mista por *Plasmodium* e *Haemoproteus* e também observaram que a eficiência do diagnóstico pode variar de acordo com a combinação de linhagens e da intensidade de infecção de determinado parasito, ocorrendo assim um aumento da prevalência de falso-negativos. Estudos baseados na utilização da PCR como técnica de diagnóstico de hemoparasitos, relatam que a construção de iniciadores de regiões altamente conservadas do DNA do parasito é necessária para amplificar todas as espécies de *Haemoproteus* e *Plasmodium* igualmente (RICKLEFS et al., 2004; WALDENSTRÖM et al., 2004). Desta forma, a utilização de tais iniciadores eliminaria a grande dificuldade em diagnosticar amostras que estejam com infecção mista.

GARAMSZEGI e colaboradores (2010) realizaram um estudo comparativo entre as técnicas de diagnóstico de malária aviária por PCR e microscopia óptica (M.O.). Esses autores mostraram que os métodos moleculares baseados na PCR geralmente fornecem estimativas de prevalência de *Plasmodium* spp. mais elevadas que aquelas obtidas por observações microscópicas. Outros estudos demonstraram que o diagnóstico da malária aviária apresenta melhores resultados a partir da associação da PCR e M.O. RIBEIRO e colaboradores (2005) descreveram a prevalência de parasitismo por *Plasmodium* spp. em 275 aves silvestres de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais utilizando a microscopia e a amplificação específica da região altamente conservada por meio da PCR. O par de

iniciadores do gene estrutural 18S rRNA, utilizado pela primeira vez para amplificar DNA de plasmódios aviários, mostrou ser gênero específico, não amplificando DNA de *Haemoproteus*, parasito frequentemente confundido com *Plasmodium* em exames microscópicos. Este mesmo protocolo de PCR foi utilizado para a investigação de parasitismo por *Plasmodium* entre psitacídeos mantidos em condições de cativeiro em três localidades diferentes no Brasil localizados nos estados de Minas Gerais e Ceará (BELO, 2007; BELO et al., 2009). BELO e colaboradores (2009) relataram a alta prevalência de infecção por plasmódios (36%) reforçando a necessidade da associação PCR e M.O. para obter o melhor diagnóstico dos parasitos causadores da malária aviária.

### **1.3. RELAÇÃO ENTRE *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp., FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS**

Os parasitos são considerados uma importante força seletiva que influencia potencialmente todos os aspectos da vida de seu hospedeiro (CLAYTON & MOORE, 1997).

É crescente a constatação de que as doenças infecciosas exercem um papel fundamental na dinâmica de muitas populações naturais e comunidades (HOLMES, 1996). Geralmente, indivíduos estressados são mais susceptíveis à infecção, uma vez que, o sistema imunológico desses animais pode não ter energia suficiente para exercer uma defesa efetiva (RIGBY & MORET, 2000). O estresse pode afetar de diversas maneiras o hospedeiro e sua relação com parasitos, aumentando sua susceptibilidade à doença ao mesmo tempo em que diminui as taxas vitais básicas, como a reprodução. As constantes mudanças ambientais que temos vivenciado têm causado estresse nos sistemas biológicos e nos organismos. Dentro deste panorama, é de relevante importância avaliar a inter-relação entre os impactos advindos do estresse ambiental e as doenças infecciosas (LAFFERTY & HOLT, 2003).

A gama heterogênea de efeitos potenciais do estresse sobre as doenças infecciosas torna pouco claro como um efeito estressante poderia afetar o curso de uma epidemia em uma população hospedeira ou os níveis de endemismo de uma doença. Ainda que indivíduos estressados possam ser mais susceptíveis à infecção quando expostos a ela, o efeito estressante pode simultaneamente, reduzir as oportunidades de infecção uma vez que

a taxa de contatos entre indivíduos infectados e não infectados irá diminuir à medida que o estresse reduz a população hospedeira. Além disso, deve-se considerar que determinadas populações de parasitos podem não ser capazes de sobreviver após exposição a um efeito estressante (LAFFERTY & HOLT, 2003).

O contexto ecológico das interações parasito-hospedeiro pode influenciar na transmissão e persistência de doenças. Fatores abióticos, como mudanças climáticas e ambientais, e fatores bióticos como a idade do hospedeiro, o sexo e a densidade populacional podem influenciar a transmissão dos parasitos e assim a prevalência da infecção (COMBES, 2001; WILSON et al., 2001).

A prevalência pode aumentar com a idade devido ao acúmulo de novas infecções, e na medida em que indivíduos suscetíveis morrem e os indivíduos resistentes ficam imunes (WILSON et al., 2001). As aves do sexo masculino tendem a ter uma prevalência de infecção mais alta do que as fêmeas (POULIN, 1996; SCHALK & FORBES, 1997; McCURDY et al., 1998). A densidade da população também pode influenciar o risco de infecção, dependendo do meio de transmissão do parasito (KEYMER & ANDERSON, 1979). No caso da malária, o risco de infecção vetor-hospedeiro aumenta na medida em que mosquitos infectados buscam áreas com densidade populacional alta (RIBEIRO et al., 1996). Desta forma, é relevante os estudos que buscam compreender a interação entre os fatores bióticos, abióticos e a malária aviária (PÉREZ-TRIS et al., 2005; VALKIŪNAS et al., 2005).

#### **1.4. RELAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE HABITATS NATURAIS E A INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp.**

De acordo com LAFFERTY (1997), existem diversas maneiras pelas quais as mudanças ambientais afetam a relação parasito-hospedeiro. Em alguns casos, a presença de parasitos pode reduzir a resistência imunológica do hospedeiro e aumentar os níveis de parasitemia ou mesmo aumentar a densidade de hospedeiros intermediários ou definitivos no ambiente.

À medida que o contato entre espécies selvagens e entre estas e os seres humanos aumenta em função das alterações de habitat, eleva-se o risco de infecções. As alterações dos padrões do comportamento humano que levam às alterações ambientais podem afetar



de duas maneiras o surgimento de doenças infecciosas. A primeira delas decorre do fato de haver um aumento da oportunidade de contatos entre animais e entre estes com os seres humanos. A segunda se deve à possibilidade de transmissão de patógenos a partir de um indivíduo infectado (WEISS & McMICHAEL, 2004).

Além disso, a destruição de habitats naturais ou sua fragmentação potencializa o contato de espécies que vivem no ambiente fragmentado com aquelas de áreas adjacentes, incluindo espécies exóticas, o que pode interferir nas relações entre hospedeiros e parasitos, aumentando a possibilidade de espécies de ambientes fechados serem parasitadas (LOYE & CARROLL, 1995). Diversos estudos têm mostrado que a fragmentação de habitats florestais exerce um impacto negativo nas espécies florestais e favorecem aquelas espécies de borda ou de áreas abertas (MARINI & COUTO, 1997; RIBON, 1998).

Em uma análise recente, WOOD & COSGROVE (2006) relataram que mecanismos ecológicos relacionados à dispersão de parasitos são pouco conhecidos e que a emergência de novas doenças infecciosas torna este tema particularmente importante. Esses autores sugerem que um dos temas prioritários a ser abordado no estudo destes parasitos se relacione aos efeitos da degradação do habitat na ecologia da comunidade de parasitos. Como as alterações de habitat influenciam a dispersão dos parasitos bem como o surgimento de doenças infecciosas são questões que permanecem amplamente desconhecidas, uma vez que a degradação do meio ambiente pode aumentar ou diminuir a prevalência do parasito, na medida em que pode alterar a proporção de hospedeiros intermediários ou definitivos.

O conhecimento dos efeitos das alterações ambientais sobre as interações parasito-hospedeiro em uma determinada população local também é de grande importância para a conservação da biodiversidade. A prevalência da malária em populações naturais de aves e mamíferos apresenta associações complexas com o ambiente, incluindo a escala espacial (WOOD et al., 2007; CONTTOTAİL et al., 2008; CHASAR et al., 2009) e a influência da degradação do habitat sob os vetores e as doenças (GRATZ, 1991).

O Brasil destaca-se entre os países que apresentam maior biodiversidade e entre seus biomas o Cerrado é considerado mundialmente prioritário para a conservação (MYERS et al., 2000). Nove dos dez países que representam mais de 80 por cento da área florestal primária do mundo perde pelo menos 1 por cento da sua área de floresta por ano, sendo que o Brasil perde 4 % a cada ano (FAO-Estado das Florestas do Mundo, 2007).

Entre os ambientes não-florestais, o Cerrado brasileiro, que é considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000), é também um dos ecossistemas mais ameaçados no Brasil, uma vez que sua área está se reduzindo rapidamente devido à expansão agrícola e urbanização.

O impacto das atividades humanas sobre a Floresta Amazônica e Cerrado são ampliados em áreas de transição entre os dois tipos de biomas, devido à importância dos ecótonos para a manutenção das populações de animais silvestres (KOTZE & SAMWAYS, 2001). Populações de aves diferem morfológicamente entre a floresta e ecótono, apesar do alto fluxo gênico, com diferenças morfológicas entre os habitats sendo tão grandes como aquelas encontradas entre as espécies de aves relacionadas (SEHGAL et al., 2005). Além disso, os ecótonos podem ser uma fonte evolutiva, assim, deve ser dada atenção à sua conservação, a fim de preservar os processos que podem ser importantes para manter a diversidade florestal (SMITH et al., 1997).

Apesar de numerosos estudos terem sido realizados sobre hematozoários de aves na região Neotropical (WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; YOUNG et al., 1993; VALKIŪ- NAS, 1997; MATTA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005; DURRANT et al., 2006; FECCHIO et al., 2007; BELO et al., 2009; SEBAIO et al., 2010), algumas regiões da América do Sul permanecem insuficientemente estudadas. Além de poucos estudos realizados no Brasil, na Venezuela há poucos relatos sobre a prevalência de parasitos do sangue em aves silvestres. Da mesma forma, estudos sobre os parasitos do sangue em aves silvestres pertencentes a zonas áridas também são escassos. É importante entender como se comportam hemoparasitos em diferentes tipos de habitats. Isto porque a compreensão da influência da ecologia da paisagem na interação parasito-hospedeiro nas populações naturais é de particular relevância em um mundo que sofre grandes mudanças ambientais.

### **1.5. DIVERSIDADE DOS PARASITOS DA MALÁRIA AVIÁRIA**

A utilização de métodos moleculares e análises filogenéticas permite relacionar molecularmente as várias espécies de plasmódios que infectam mamíferos, aves e répteis. Recentemente, vários estudos baseados na análise molecular dos parasitos causadores da malária aviária, revelaram uma riqueza de diversidade genética entre as linhagens do parasito que não são aparentes em sua morfologia (BENSCH et al., 2000; RICKLEFS &

FALLON, 2002). Além disso, através do sequenciamento de DNA é possível analisar a variabilidade genética, proporcionando tanto a obtenção de dados de diversidade e estrutura genética quanto à possibilidade de inferir relações evolutivas entre os alelos (AVISE, 1989).

Existem poucos genes e marcadores moleculares caracterizados para as espécies de plasmódios aviários. Os genes mais utilizados em estudos de filogenia e diversidade genética são os mitocondriais e marcadores ribossomais. Os marcadores ribossomais são utilizados para identificar gênero, devido ao seu alto grau de conservação, constituindo-se de uma ferramenta molecular para diagnóstico (FELDMAN et al., 1995). Caso o objetivo de um estudo seja avaliar a variabilidade molecular intra-específica, a utilização de marcadores mitocondriais é a mais adequada. Os genomas mitocondriais fornecem importantes marcadores para a genética de populações, sendo utilizados em estudos de variabilidade genética devido ao seu alto grau de mutações e à sua herança materna (GRAY et al., 1999).

O DNA mitocondrial do *Plasmodium* que infecta as aves, consiste de uma molécula linear organizada de 6 kb (FEAGIN, 1994; GRAY et al., 1999). OMORI e colaboradores (2007) caracterizaram o genoma mitocondrial das espécies de *Plasmodium gallinaceum* e *Plasmodium juxtannucleare* estimando em 6002 e 6014 pb de comprimento, respectivamente. O fato do citocromo b ser universalmente encontrado no gene mitocondrial o torna adequado para estudos filogenéticos de *Plasmodium* spp. e outros Apicomplexa (ESCALANTE et al., 1998).

O desenvolvimento de técnicas moleculares para o estudo de parasitos sanguíneos de aves tem revelado muitos aspectos sobre a sua ecologia, incluindo a alta diversidade da interação parasito-hospedeiro. Muitos estudos sobre malária em aves tratam as populações de plasmódios como fonte única de infecção com respeito à probabilidade de transmissão de malária. Porém, um estudo realizado por WOOD e colaboradores (2007) revelaram a relação entre a heterogeneidade do ambiente e a existência de diferentes linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus*. Desta forma, é possível correlacionar o genótipo do parasito com as características ambientais, do hospedeiro e suas interações. Este estudo relaciona a variação da prevalência e distribuição das linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus* com relação aos fatores ambientais, dos hospedeiros e suas interações em uma única população de ave (*Cyanistes caeruleus*). WOOD e colaboradores (2007) relatam a prevalência de 11

linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus* em 997 indivíduos estudados, as três linhagens mais frequentes foram: pSGS1, pTURDUS1 e pBT7. O estudo dos autores mencionados mostraram uma variação da prevalência do parasito com respeito aos fatores ambientais, às características do hospedeiro e ao genótipo do parasito. Observou-se que a infecção por determinada linhagem variou significativamente de acordo com o ano de coleta, ocorrendo um aumento da infecção por esta linhagem em fêmeas o mesmo não ocorrendo nos machos. Além disso, WOOD e colaboradores (2007) relatam que a probabilidade da infecção por *Plasmodium/Haemoproteus* pode depender de alguns fatores como o local de nascimento da ave (se a infecção ocorreu no início da sua vida) e do grau de dispersão pós-natal. A transmissão das linhagens de malária aviária pode variar em relação à atividade sazonal de vetores, podendo alguns parasitos serem transmitidos durante o período reprodutivo, sugerindo que o ambiente de nascimento também pode ser um fator que contribui para o estado de infecção quando adulto. Duas linhagens (pSGS1, pTURDUS1) mostraram uma maior semelhança em suas associações com o ambiente e com os fatores do hospedeiro do que a terceira linhagem (pBT7). Isto pode refletir semelhanças na ecologia de vetor ou exigências de transmissão e sugere que pode haver extensão considerável para estudos comparativos das exigências de transmissão de linhagens de malária aviária (PÉREZ-TRIS & BENSCH, 2005; WOOD & COSGROVE, 2006).

Observa-se que o *Plasmodium* além de ser globalmente distribuído (VALKIŪNAS, 2005; BEADELL et al., 2004) é capaz de infectar diferentes famílias e espécies de aves silvestres. Assim a necessidade de compreender a sua diversidade e ecologia a partir da utilização de técnicas moleculares aumentou nos últimos anos. Por exemplo, a estimativa sobre a diversidade de espécies de plasmódios era da ordem de 200 espécies baseada na microscopia. A partir do uso de técnicas moleculares, hoje se sugere que existam cerca de 10.000 espécies baseando-se em comparações entre o gene nuclear e mitocondrial (BENSCH et al., 2004). Porém, a maioria dos estudos ecológicos de malária aviária não considera esta diversidade como fonte importante de variação da interação parasito-hospedeiro. Estudos têm revelado que a virulência do parasito pode variar entre as suas linhagens e que a prevalência e a distribuição dessas linhagens, por sua vez variam conforme as características do ambiente (READ & TAYLOR, 2001). ZEHTINDJIEV e colaboradores (2008) demonstraram que distintas linhagens de *Plasmodium* diferem substancialmente em várias características, como o período pré-patente e a dinâmica da

parasitemia. Desta maneira, o hospedeiro responde `a infecção de acordo com a linhagem do parasito que o infecta.

Dados obtidos por meio de marcadores genéticos podem revelar muitas informações acerca da presença de diferentes populações de *Plasmodium* presentes em diferentes ambientes.

Recentemente, CHASAR e colaboradores (2009) estudaram a diversidade, a prevalência e distribuição dos parasitos da malária aviária em dois locais (habitat com distúrbio e sem distúrbio) no sudeste de Camarões, África, a partir da análise de duas espécies de aves silvestres africanas generalistas (*Andropadus latirostris*, Pycnonotidae e *Cyanomitra olivacea*, Nectariniidae). Esses autores mostraram que as mudanças antrópicas no habitat podem afetar o sistema parasito-hospedeiro e influenciar a prevalência de linhagens de parasitos causadores da malária aviária em populações de aves silvestres.

Nos últimos anos, sequências de DNA de várias espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus* foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), um recurso inestimável para o estudo destes parasitos. No entanto, a maioria das sequências de DNA no GenBank foram identificadas apenas ao nível de gênero (VALKIŪNAS et al., 2008). É muito baixo o número de espécies nomeadas e isto se deve a não haver ligação entre as sequências de DNA e identificação baseada em métodos tradicionais, como a microscopia óptica, para a identificação morfológica das espécies. Assim, é importante realizar um amplo trabalho de comparação de morfoespécies de organismos e suas linhagens de DNA com o auxílio de taxonomistas experientes para evitar erros de identificação de espécies de parasitos no banco de dados do GenBank.

**2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

Cada mudança ambiental, ocorrendo como fenômeno natural ou pela intervenção humana, altera o balanço ecológico e o contexto sob os quais os hospedeiros ou os vetores e parasitos se alimentam, se desenvolvem e transmitem doenças (PATZ et al., 2000). A introdução de uma infecção ou doença de uma população resistente em uma população susceptível pode ter consequências desastrosas (DOBSON & MAY, 1986). Inúmeros trabalhos sobre hemoparasitos, em sua maioria, tratam da sua prevalência e incidência (BENNET et al., 1982, 1991). Do ponto de vista ecológico, a presença de parasitos sanguíneos afeta a estrutura, dinâmica temporal e espacial da comunidade (HOLMES & PRICE, 1986), além de influenciar na coloração da plumagem de aves o que interfere diretamente no processo de seleção sexual (HAMILTON & ZUK, 1982; PRUETT-JONES et al., 1990; KIRKPATRICK & RYAN, 1991). Apesar de serem muito importantes para a biologia da conservação, os hemoparasitos raramente são analisados sobre esta ótica. Entretanto, deve-se ressaltar que alguns estudos já confirmaram o papel dos parasitos como reguladores do tamanho de populações de hospedeiros bem como causadores de extinção de determinadas espécies (van RIPER III et al., 1994; McCALLUM & DOBSON, 1995).

É importante analisarmos a relação parasito-hospedeiro-ambiente, principalmente devido a crescente interferência do ser humano em ambientes naturais, particularmente nas últimas décadas. Há poucos estudos sobre hemoparasitos de aves silvestres realizados na América do Sul. No Brasil, as atividades humanas estão cada vez mais disseminadas e intensas em diferentes ambientes incluindo as áreas de Cerrado e de transição. Sabe-se que os ecótonos ou áreas de transição possuem um papel fundamental para a manutenção das populações de animais selvagens e das populações de parasitos, contudo esta relação parasito- ambiente ainda é pouco compreendida.

No presente estudo, analisamos a riqueza de prevalência e da linhagem de parasitos que infectam aves silvestres em três ambientes brasileiros: habitat de Cerrado natural, habitat de Cerrado urbanizado, e habitat de Cerrado associado com área de Floresta Amazônica em uma zona de transição natural, e em uma zona árida localizada na região norte da Venezuela. Comparações entre esses locais forneceram uma primeira indicação das influências de perturbações antropogênicas no Cerrado sobre os parasitos presentes em uma comunidade de aves silvestres.

Este trabalho apresenta caráter interdisciplinar envolvendo diferentes áreas do conhecimento (Ecologia, Parasitologia e Biologia Molecular) bem como diferentes

colaboradores (Dr. Renato Torres Pinheiro e Dr. Robert Ricklefs). Dos resultados até então obtidos surge à possibilidade de ampliarmos nossas observações para outras áreas e estabelecer possíveis associações do parasitismo por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em diferentes habitats. Além disso, o estudo da variabilidade genética em populações de *Plasmodium* e *Haemoproteus* circulantes em aves silvestres pertencentes a ambientes com características diferentes poderá apoiar programas de conservação e manejo de espécies silvestres, além de oferecer ferramentas para diferentes estudos ecológicos, conservacionistas, comportamentais e evolutivos que definem o sistema parasito-hospedeiro.

Este trabalho teve como objetivo principal estabelecer possíveis associações entre o parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em aves silvestres e diferentes características ambientais, como a urbanização, áreas de transição e áreas áridas.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Analisar, comparativamente, o parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em aves de área urbana (Cerrado alterado) e parques estaduais (Cerrado intacto e áreas de transição Amazônia-Cerrado no estado de Tocantins).
- b) Determinar a prevalência de parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em aves silvestres a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa e da amplificação específica do gene 18S rRNA e do SSU rRNA mitocondrial.
- c) Avaliar, comparativamente, as prevalências de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. utilizando as PCRs para amplificação do gene 18 S rRNA e do SSU rRNA mitocondrial.
- d) Correlacionar a prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. às características biológicas das aves (grupo taxonômico, muda de penas, tipo de dieta) e a características do meio ambiente.
- e) Caracterizar, molecularmente, as diferentes amostras de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. que infectam naturalmente aves silvestres por meio do



sequenciamento do gene citocromo b dos parasitos e comparar com as sequências já depositadas no GenBank.

f) Correlacionar à variabilidade dos isolados de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. ao efeito ambiental, incluindo área antropizada, áreas de transição e às características biológicas associadas às aves analisadas.

g) Obter informações sobre a presença e distribuição de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. na zona árida do norte da Venezuela.

h) Comparar a diversidade dos isolados brasileiros com isolados de outras áreas da América Latina.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1. ÁREAS DE ESTUDO NO BRASIL

Foram selecionadas três áreas de estudo de maneira a atender aos objetivos da pesquisa, permitindo a captura de indivíduos de diversas espécies e com diferentes exigências ecológicas (Figura 4).

1) Área Urbana de Palmas – TO (AUP): Localizada em uma região de Cerrado na área central do estado, 10°12'46" de latitude sul e 48°21'37" de longitude oeste, à margem direita do Rio Tocantins, encontra-se a cidade de Palmas, fundada há 18 anos . Demograficamente é a menor capital do Brasil, com 178.386 habitantes e uma das mais elevadas taxas de crescimento urbano do país.

O processo de degradação ambiental é acelerado sendo um ótimo laboratório para estudar os efeitos da urbanização sobre as comunidades naturais (TOCANTINS, 1997) (Figura 5).

2) Parque Estadual do Lajeado (PEL): Localizado na Serra do Lajeado a 25 km da cidade de Palmas, foi criado em 2001 e conta com 9 mil 931 hectares de cerrado *sensu stricto*. A região do Parque Estadual do Lajeado se localiza na região centro-oeste do Estado do Tocantins, 10° 00'00'' de latitude sul e 48°15'27'' de longitude oeste . A sua criação foi datada em 11 de maio de 2001 pela Lei nº 1.224. Foram registradas 159 espécies da herpetofauna. Dentre os anfíbios, 27 espécies foram encontradas em formações florestais, 21 em cerrado *sensu stricto* e 30 em lagos. Nesse local foram registradas 219 espécies de aves, 41 espécies de mamíferos, destas, seis ameaçadas de extinção.

Este Parque mostra-se como alternativa em forma de reserva que possibilita a dinamização de ações e processos promovendo preservação do patrimônio natural. A área de preservação ambiental da Serra do Lajeado (APA), incluindo a área propriamente dita do Parque Estadual da Serra do Lajeado, proporciona uma estratégia para o estudo sobre a relação parasito-hospedeiro em ambiente de Cerrado bem preservado (TOCANTINS, 1997) (Figura 6).

3) Parque Estadual do Cantão (PEC): Localizado na região de ecótono entre a Amazônia e Cerrado, às margens do rio Araguaia, (9°20'13'' S e 50°10'36'' W). O

parque possui diversos ecossistemas em função da sua localização e do regime de enchentes, com área definida de aproximadamente 90 mil hectares abrangendo os municípios de Caseara e Pium, abriga um dos grandes espetáculos da Amazônia.

Em suas ilhas, lagoas, canais e matas alagadas de várzea, encontram-se animais e plantas da Floresta Amazônica, do Cerrado e dos Pantanaís do Araguaia. Sendo assim, um ecossistema único, com uma vasta planície no coração do Brasil, no ponto exato onde o rio e floresta, Cerrado e Amazônia se encontram e se mesclam regidos pelo grande ciclo anual das enchentes (Figura 7).

Mais de 500 espécies de aves podem ser encontradas no Parque e seu entorno. Sendo também uma área importante para diversas aves migratórias (<http://cantao.to.gov.br>).

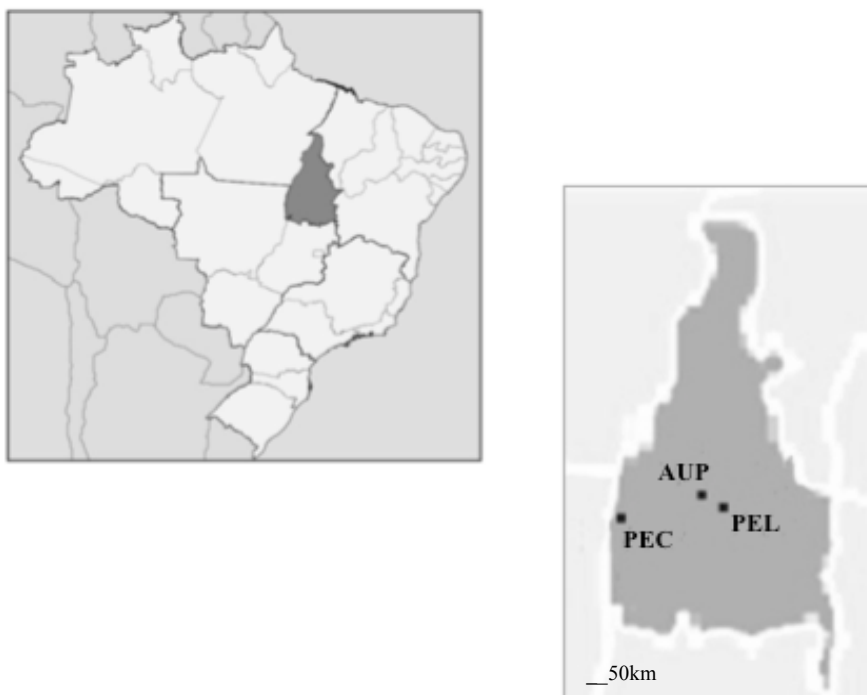


Figura 4: Mapa do Brasil evidenciando a localização das áreas de estudo no estado do Tocantins.

AUP: Capital-Palmas; PEL: Parque Estadual do lajeado;

PEC: Parque Estadual do Cantão.

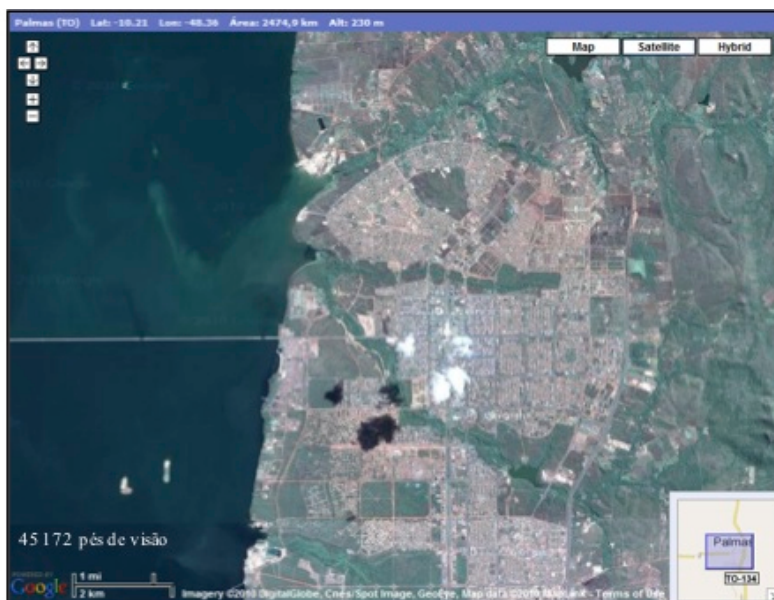


Figura 5: Área Urbana de Palmas-TO, Cerrado alterado

Fonte: <http://earth.google.com>



Figura 6: Parque Estadual do Lajeado, Cerrado bem preservado

Fonte: <http://earth.google.com>



Figura 7: Parque Estadual do Cantão, área de transição Amazônia-Cerrado

Fonte: <http://earth.google.com>

### 3.2. ÁREAS DE ESTUDO NA VENEZUELA

O estudo no norte da Venezuela foi realizado na zona árida, que é caracterizado pela presença de matagais de espinho (SARMIENTO, 1972).

A temperatura média anual é de 28 °C, e a precipitação anual varia entre 300 mm e 700 mm, com a presença de uma temporada longa e severa seca (janeiro-junho e setembro-novembro) com dois breves picos de chuva em julho-agosto e dezembro (SARMIENTO, 1976).

Áreas de estudo abrangeram seis regiões áridas no norte da Venezuela (Figura 8), que diferem em tamanho:

- 1) Península de Paraguaná (PP) localizada no noroeste da Venezuela. É uma ilha localizada no Plioceno e estende-se por 2500 Km<sup>2</sup>.
- 2) Falcon (FL) e Lara (LL) representam as mais extensas planícies áridas na Venezuela, na região Oeste, entre os Andes e a montanha Range, com uma área aproximada de 16000 Km<sup>2</sup>.
- 3) A região Clarines-Piritu (CP) se estende por cerca de 4.500 km<sup>2</sup> na região nordeste da Venezuela e abrange a depressão de Unare, entre as porções central e oriental da Serra da Faixa Costeira.
- 4) Península de Araya (AP), que ocupa 900 Km<sup>2</sup> no nordeste da Venezuela e compreende as planícies do norte da costa leste da montanha Range.
- 5) Macanao Península (MP), com cerca de 300 Km<sup>2</sup>, constitui a maior parte oeste da Ilha Margarita.

Dividimos este estudo em região Oeste (PP, FL, áreas LL e MP, região oeste da Ilha de Margarita) e região leste (áreas CP e AP).

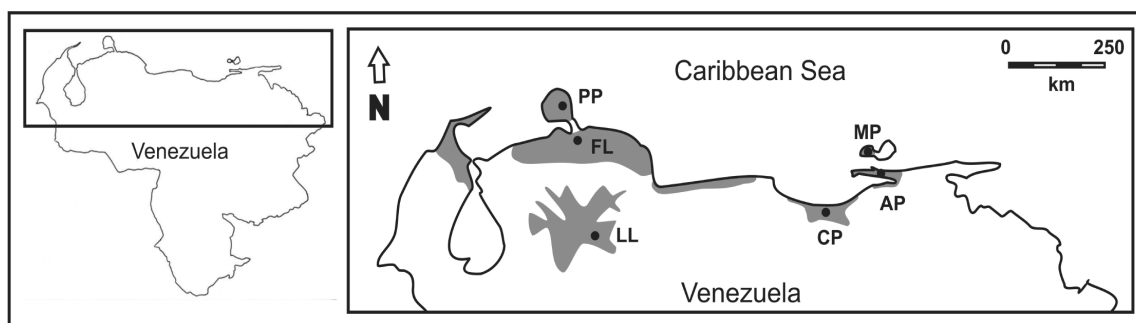


Figura 8. Localização de zonas áridas (sombreado) no norte da Venezuela e as áreas amostradas. Áreas de estudo da região Oeste são as seguintes: PP = Península Paraguaná, FL = Falcón, LL = Lara e MP = Macanao Península. Áreas estudadas da região Leste: CP = Clarines-Piritu, AP = Araya Península. (Fonte: RODRÍGUEZ-FERRARO & BLAKE, 2008).

### 3.3. CAPTURA E MARCAÇÃO DAS AVES

As aves no Brasil foram capturadas com redes de neblina de 12 m de comprimento por 2,5 de altura e malha de 35 mm. As redes foram vistoriadas a intervalos de 30 a 45 minutos para retirada das aves. As aves capturadas foram acondicionadas em sacos de pano e os indivíduos identificados com o auxílio de guias de campo (SICK, 1997; RIDGELY & TUDOR, 1989), recebendo uma anilha metálica fornecida pelo CEMAVE/IBAMA. Dados referentes ao peso e biométricos (comprimento da asa, cauda e tarso) foram coletados. Após estes procedimentos as aves foram liberadas próximo ao local de captura. Esta etapa foi desenvolvida em colaboração com o Dr. Renato Torres Pinheiro da Universidade Federal de Tocantins que vem desenvolvendo um intenso trabalho de coleta e captura de aves silvestres em diferentes localidades naquele estado, três coletas foram realizadas com o meu auxílio, as outras coletas realizadas pela equipe do Dr. Renato Torres foram realizadas por pessoas previamente treinadas.

Em cada localidade (área urbana e parques estaduais), foram amostrados três ambientes: mata ciliar, cerrado e capoeira. As capturas foram realizadas de acordo com o método do esforço constante onde o número, o tempo de operação e a localização das redes, bem como o intervalo de tempo entre capturas foram padronizados. Desta maneira, cada área foi amostrada com uma frequência bimensal e em cada ambiente foram dispostas 10 redes, as quais ficaram expostas por 12 horas. As coletas nas três áreas amostradas foram realizadas durante três anos consecutivos, doze saídas de campo para o Parque

Estadual do Lajeado (PEL), dez saídas para o Parque Estadual do Cantão (PEC) e 12 saídas para a região urbana de Palmas (AUP), foram realizadas entre junho de 2006 a junho de 2009, abrangendo as fases de muda de penas, fases de reprodução e não reprodução. Este método nos permite obter um índice sobre as mudanças estacionais na população, a condição físico-fisiológicas dos indivíduos recapturados, dados sobre a produtividade e sobrevivência das espécies que podem estar correlacionados com a prevalência do parasito.

Todas as atividades de coleta e obtenção das amostras estiveram em conformidade com as regras estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sendo o projeto aprovado por este Comitê no ano de 2006 sob o número de registro 205/2006 (Anexo 5). Autorização do IBAMA/SISBIO para captura, coleta e marcação das aves (N°15109-1).

As aves pertencentes à região da Venezuela foram capturadas entre setembro de 2004 e agosto de 2005 com a colaboração da pesquisadora Adriana Rodriguez-Ferraro colaboradora do Laboratório do Dr. Robert Ricklefs na University of Missouri/USA. As aves foram capturadas usando 10 redes de neblina que operavam por 12 horas por dia, três dias consecutivos, a cada dois meses, sendo realizadas seis coletas em cada área de estudo, as coletas foram realizadas pela pesquisadora Adriana Rodriguez-Ferraro.

### **3.4. COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE**

Para a obtenção de sangue foi utilizada agulha estéril descartável (BD 30x3) para a punção da veia metatarsiana medial localizada no metatarso esquerdo ou da veia braquial localizada na asa das aves (Figuras 9-10). A quantidade de sangue coletada dependeu do peso individual das aves, sendo coletados aproximadamente 0,5-1% do seu peso corporal total (ARCTANDER, 1988). Cerca de 15  $\mu$ L de sangue foram coletados, com o auxílio de uma micropipeta automática, para a confecção de esfregaços sanguíneos. Foram coletados aproximadamente 20  $\mu$ L de sangue periférico, que foram armazenados em tubos de microcentrífuga contendo 300  $\mu$ L de solução de lise celular (Promega®, MA, EUA) sendo armazenada a temperatura ambiente para posterior extração de DNA. Cerca de 10  $\mu$ L de sangue também foram coletados em papel filtro para posterior extração de DNA.



Na Venezuela, só foi coletado sangue para o diagnóstico molecular, não sendo confeccionados esfregaços sanguíneos das aves silvestres pertencentes a esta região.



Figura 9: Contenção da ave silvestre para coleta de sangue  
(Fonte: Braga et al., 2010)



Figura 10: Obtenção de amostra de sangue para confecção  
de esfregaço sanguíneo e para extração de DNA.  
(Fonte: Braga et al., 2010)

### **3.5. DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp.**

#### **3.5.1. Esfregaço sanguíneo**

Três esfregaços sanguíneos por ave analisada no Brasil foram confeccionados em campo. Os esfregaços sanguíneos foram secos ao ar, fixados com metanol e então foram corados com uma solução de GIEMSA em água tamponada (pH 7,2 - 7,4) a uma diluição de 1:10. Duzentos campos microscópicos (aumento de 1000X, objetiva de imersão) foram examinados para investigação da presença de parasitos no sangue das aves capturadas.

### **3.6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM/HAEMOPROTEUS***

#### **3.6.1. Extração de DNA**

A extração do DNA a partir de sangue coletado em papel filtro foi realizada segundo o protocolo descrito por SCOPEL e colaboradores (2004) utilizando proteinase K seguida de extração por fenol-clorofórmio.

A extração de DNA a partir de sangue armazenado em solução de lise foi realizada de acordo com o Kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup> MA, EUA). Aos microtubos contendo 20 µL de sangue armazenados em 300 µL de solução de lise celular foi adicionado 1,5 µL de solução de Rnase A (4 mg/ml), em seguida foram incubados a 37°C em banho-maria por 15 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína.

As amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e centrifugadas a 13.000g - 16.000g por 3 minutos `a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 300 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente até o aparecimento do DNA e centrifugados por 1 minuto a 13.000 -16.000 g `a temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de etanol 70% para a lavagem do sedimento e remoção de traços de sal. Os tubos foram novamente centrifugados por mais 1 minuto a 13.000 -16.000 g, o

líquido presente no tubo foi desprezado e escorrido em papel absorvente. Um volume de 50 µl de solução de re-hidratação de DNA (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) foi adicionado por tubo para ressuspensão do DNA. O DNA foi armazenado a 4°C até o momento da amplificação.

As amostras de DNA da Venezuela foram obtidas a partir da extração de DNA sanguíneo seguindo o protocolo de acordo com o fabricante (GENTRA SYSTEMS®, Minneapolis, MN, USA).

### 3.6.2. Amplificação do gene estrutural 18S rRNA

A amostras do DNA das aves pertencentes ao Brasil foram processadas por *nested* PCR (nPCR) para amplificação de 240 pb do gene estrutural 18S rRNA executada de acordo com RIBEIRO e colaboradores (2005). Na primeira reação de amplificação, foram utilizados iniciadores *Plasmodium* - específico (rPLU 1 e rPLU 5), sendo o produto desta reação utilizado como “DNA - molde” para uma segunda reação de amplificação, com iniciadores também gênero-específico (rPLU 3 e rPLU4).

As sequências dos iniciadores utilizados foram:

rPLU1 → 5' - TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA - 3'

rPLU5 → 5' - CCTGTTGTT GCCTTAAACTCC - 3'

rPLU3 → 5' - TTT TTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT - 3'

rPLU4 → 5' - TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC - 3'

Na primeira reação de amplificação, cada tubo recebeu 5 µl do “DNA -molde” e 20 µl de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; 4mM MgCl<sub>2</sub> (PHONEUTRIA®); 200 µM de dNTP; 2,5 U de Taq DNA polimerase; 15 pm/µl de cada iniciador e água ultra pura estéril.

O programa da primeira amplificação consistiu de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 min. A desnaturação inicial ocorre a 94°C por 4 min. E a extensão final a 72°C por 4 min., finalizando com temperatura de 4°C.

Na segunda reação de amplificação, cada tubo recebeu a mesma composição descrita anteriormente modificando apenas a temperatura de anelamento que foi de 62°C.

### 3.6.3. Amplificação do gene SSU rRNA mitochondrial

As amostras do DNA das aves silvestres pertencentes ao Brasil e Venezuela foram processadas por PCR simples com a amplificação da região altamente conservada do gene SSU rRNA mitocondrial., executada de acordo com FALLON e colaboradores (2003).

As seqüências dos iniciadores utilizados:

343F → 5' – GCTCACGCATCGCTTCT - 3'

496R → 5' - GACCGGTCATTTTCTTTG - 3'

Na reação de amplificação, cada tubo recebeu 2 µl do “DNA -molde” e 13 µl de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; (PHONEUTRIA®); 2.0-2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP; 0.5 U Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA®); 0.4mM de cada iniciador e água ultra pura estéril.

O programa da amplificação consiste de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A desnaturação inicial ocorre a 94°C por 2 minutos. E a extensão final a 72°C por 3 min., finalizando com temperatura de 4°C.

Os controles positivos utilizados nas reações de PCR compreenderam de DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* obtidos de pintinhos infectados experimentalmente e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR, Belo Horizonte. Os controles negativos foram amostras de DNA obtidas de pintinhos mantidos livres de infecção, gentilmente cedido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6%, não desnaturante, em tampão TBE 1X. Os géis de poliacrilamida foram fixados em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corados em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA de 154 pb evidenciados quando em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (SANGUINETTI et al., 1994).

Os dados obtidos por PCR foram comparados àqueles obtidos por observação microscópica de esfregaços sanguíneos. Amostras que apresentaram discordância de resultados foram reavaliadas pelos dois métodos.

## 1.1. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp.

As amostras positivas pelas PCRs de diagnóstico foram processadas por *nested* PCR por meio da amplificação dos genes citocromo b de *Plasmodium* e *Haemoproteus*. A análise da diversidade genética foi realizada durante o doutorado sanduiche no Laboratório do Dr. Robert Ricklefs na University of Missouri/USA. Na primeira reação de amplificação, executada segundo PERKINS e colaboradores (2002), foram utilizados os iniciadores 3932F e DW4R que amplificam um fragmento de 791 bp. Para a segunda reação foram utilizados iniciadores que amplificam a região do gene citocromo b de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, desenvolvidos por RICKLEFS e colaboradores (2005). Os iniciadores 413F e 926R foram usados para amplificar um fragmento interno de 591bp.

As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

3932F → 5' - GGG TTA TGT ATT ACC TTG GGG TC - 3'

DW4R → 5' - TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG - 3'

413F → 5' - TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG - 3'

926R → 5' - GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG - 3'

Na primeira reação de amplificação, cada tubo recebeu aproximadamente 50 ng do DNA genômico total e 10 µL de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl (PHONEUTRA<sup>®</sup>), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 0.4 mM de cada iniciador e água ultra pura estéril.

O programa da primeira amplificação consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, seguida de anelamento a 49°C por 10 segundos e extensão a 68°C por 45 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 4 min. e a extensão final a 68°C por 3 minutos, finalizando com temperatura de 4°C.

Na segunda reação de amplificação, cada tubo recebeu 0.5 µL do produto da primeira reação. O programa da segunda amplificação consistiu de 28 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, seguida de anelamento a 52°C por 10 segundos e extensão a 68°C por 50 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 1 min. e a extensão final a 68°C por 7 minutos, finalizando com temperatura de 4°C.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de ágarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz UV.

Os produtos de PCR amplificados foram selecionados para o sequenciamento da região do gene citocromo b de *Plasmodium*.

### **1.1.1. Sequenciamento da região do gene mitocondrial citocromo b**

Os produtos de PCR positivos foram purificados a partir do Kit ExoSAP-IT (USB Corporation) seguindo as instruções do fabricante.

Fragmentos de DNA purificados foram sequenciados usando o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems®) pertencente a University of Missouri/USA.

As amostras foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL com um volume final de 10 µL contendo 0,2 µM do iniciador 413 direto (5'- TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG -3') ou 926 reverso (5'- GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG -3') a 1 µM, 50 a 100 ng de DNA, usando para sequenciamento o *BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®) e água ultra pura suficiente para completar o volume. O programa da amplificação consistiu de 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 4 minutos. Posteriormente, a amostra submetida a reação de sequenciamento passou por um processo de purificação. Foram adicionados 2 µl em cada reação na proporção de 1:1 contendo 3 M de NaOAc (pH4,6) e 0,125M de EDTA. Em seguida, 25µl de Etanol 95% foram adicionados às amostras e acondicionados a 4°C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 4.000 rpm. Em seguida, 35 µl de etanol 70% foram adicionados e posteriormente centrifugados a 4.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma centrifugação invertida por 45 segundos a 4.000 rpm foi realizada. Em seguida foi adicionado 20 µl de HiDi formamida em cada amostra. As amostras foram colocadas na termocicladora por 3 minutos a 96°C, em seguida, colocadas em gelo. O próximo passo foi colocar as amostras no sequenciador.

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas usando o programa CLUSTALX (THOMPSON et al., 1997) e editadas usando Seq Man II (DNASTAR Inc.; SWINDELL & PLASTERER, 1997). As sequências editadas foram submetidas à busca por similaridade de bases com sequências já publicadas e depositadas no GenBank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>), e com sequências não publicadas a partir da pesquisa local no laboratório do Dr. R. E. Ricklefs. Foram executadas análises filogenéticas usando o método de máxima verossimilhança implementado pelo programa RaxML

(STAMATAxis, 2006) com o modelo GTR + gamma de evolução de nucleotídeos e 1000 réplicas para *bootstrap*. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas usando o programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Esta etapa foi desenvolvida no Laboratório do Dr. Robert Ricklefs (Department of Biology, University of Missouri-St. Louis, USA) dentro do Programa Doutorado sanduíche (Bolsa CNPq com duração de 10 meses).

## 1.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Por causa do tamanho das amostras de hospedeiros serem desbalanceadas em cada área, nós usamos tabelas de contingência nas análises para detectar interações entre localização ambiental e prevalência do parasito. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPrism 5 (CA, USA). O teste de Qui-quadrado com correção de Yates foi realizado para a análise e comparação das prevalências do parasito nas aves do Parque Estadual do Cantão, Parque Estadual do Lajeado, do município de Palmas e da zona árida da Venezuela. Este teste também foi utilizado para investigar diferenças entre as prevalências de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com o habitat, processo de muda de penas, os períodos da seca e chuva, status migratório e guilda trófica. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foi usado o programa Stata 9.07 para construir as tabelas e para calcular a concordância entre os métodos de diagnóstico molecular e microscopia, para o qual o teste de Youden's *index* ( $Y = \text{Sensibilidade} + \text{Especificidade} - 1$ ) (YOU DEN, 1950) foi utilizado. O estimador não paramétrico Chao1 (CHAO, et al., 2006) foi utilizado para estimar a riqueza de espécies de hospedeiros e a riqueza de linhagem do parasito em cada local de estudo na região do Tocantins. Além disso, o índice de diversidade de Shannon foi calculado para estimar a diversidade de parasitos amostrados nas regiões do Brasil e Venezuela. Os dois testes (Chao 1 e Shannon) foram realizados utilizando o programa EstimateS versão 8.2 (COLWELL, 2008).

**2. RESULTADOS**

---



#### **4.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE AVES SILVESTRES ANALISADAS**

Durante os três anos de estudo foi capturado um total de 676 indivíduos, sendo 181 obtidos no PEL, 305 no PEC e 190 na AUP. Das aves capturadas, 27 foram recapturadas, mas foram analisadas somente uma única vez, sendo cinco indivíduos do PEL, 19 do PEC e três da AUP, as aves recapturadas só foram contabilizadas uma única vez.

Foi capturado um total de 29 famílias e 126 espécies, sendo 99,2% de aves adultas, 18,6% de machos, 26,6% de fêmeas e 54,8% de sexo indeterminado por não apresentarem dimorfismo sexual.

As famílias com maior número de espécies amostradas foram Tyrannidae (38 espécies.), Thraupidae (14 espécies), Thamnophilidae (11 espécies), Dendrocolaptidae (7 espécies), Emberizidae (6 espécies) e Pipridae (4 espécies). As espécies com maior número de indivíduos amostrados foram respectivamente *Pipra fasciicauda* (n=112), *Elaenia chiriquensis* (n=28), *Elaenia cristata* (n=27), *Coereba flaveola* (n=27) e *Volatinia jacarina* (n=25). Informações detalhadas sobre as espécies, preferência alimentar e do habitat encontram-se no Anexo 1.

#### **4.2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp. NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS**

##### **4.2.1. Detecção da infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos**

Determinou-se a prevalência geral de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com a presença de formas eritrocíticas do parasito detectadas por microscopia óptica (M.O.) de esfregaços sanguíneos. Do total de 676 esfregaços sanguíneos examinados, 165 apresentaram parasitos do gênero *Plasmodium* ou *Haemoproteus*, perfazendo, assim uma prevalência total de 24,4%. Não houve diferença significativa na prevalência de infecção por Haemosporida para cada uma das localidades estudadas (22,7% para PEL, 23,9% para PEC e 26,8 % para AUP) ( $X^2=3,778$  ;  $p=0,1512$ ).

É importante mencionar que o nível de parasitos detectado nos exames microscópicos foi baixo (1-7 parasitos/200 campos microscópicos) sendo frequentemente

encontradas poucas formas evolutivas dos parasitos (trofozoítos em sua maioria) no caso de *Plasmodium*, impossibilitando a identificação específica de acordo com as características morfológicas dos mesmos. A identificação das espécies de *Haemoproteus* também não foi possível devido aos poucos gametócitos encontrados nos esfregaços sanguíneos.

Dos 165 esfregaços sanguíneos infectados, foi registrada uma prevalência de 91,5% (151 amostras) de aves infectadas por *Plasmodium* spp. e 8.5% (14 amostras) infectadas por *Haemoproteus* spp.

As espécies com maior intensidade de parasitemia por 200 campos analisados foram *Sakesphorus luctuosus* (n=32 indivíduos), *Camptostoma obsoletum* (n=20 indivíduos), *Dacnis cayana* (n=18 indivíduos), *Tachyphonus rufus* (n=15 indivíduos) e *Leptopogon amaurocephalus* (n=14 indivíduos). Não foi possível correlacionar a parasitemia aos aspectos ambientais devido à baixa intensidade de infecção observada nos esfregaços sanguíneos, conforme mencionado anteriormente.

#### **4.2.2. Detecção da infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. utilizando PCR**

O diagnóstico molecular foi realizado a partir da amplificação de dois genes, o gene 18SSU rRNA ribossomal (nPCR) e o gene SSU rRNA mitocondrial (PCR simples).

A prevalência total (PEL, PEC e AUP) observada a partir da amplificação do gene ribossomal foi de 212 (31,4%) de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. A amplificação do gene mitocondrial detectou 254 (37,6%) aves infectadas. Não foi observada diferença estatística entre os resultados obtidos pelos dois marcadores ( $p=0,67$ ).

Foi registrada por meio da amplificação do gene ribossomal a presença de 29,8% (54/181) de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. no PEL, 35% (107/305) de aves infectadas no PEC e 26,8% (51/190) na AUP. Utilizando a amplificação do gene SSU rRNA mitocondrial para o diagnóstico de malária aviária foi encontrado 29,3% (53/181) de aves infectadas no PEL, 41,3% (126/305) de aves infectadas no PEC e 39,5% (75/190) em AUP.

#### 4.2.3. Detecção da infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. a partir da associação das duas PCRs.

Utilizando-se a associação das duas PCRs (18s rRNA ribossomal e SSU rRNA mitocondrial) foi encontrado que 44,7% (302/676) dos indivíduos, 86,2% (25/29) das famílias e 69% (87/126) das espécies estavam parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. A partir da análise das duas PCRs em conjunto, foi encontrada uma sensibilidade de 65% (95% CI:58–70%) e uma especificidade de 88% (95% CI: 85–91%). A concordância (95% CI) das PCRs estimada pelo teste de Youden foi de 0,53 (0,46–0,60) (Tabela 2).

Tabela 2: Amostras positivas e negativas para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. obtidos pela PCR que amplifica o gene 18S rRNA e pela PCR que amplifica o gene SSU mitocondrial para 676 aves analisadas.

		18S rRNA		
		Positivo	Negativo	Total
SSU rRNA mitochondrial	<b>Positivo</b>	<b>164</b> (24,3%)	<b>90</b> (13,3%)	<b>254</b> (37,6%)
	<b>Negativo</b>	<b>48</b> (7,1%)	<b>374</b> (55,3%)	<b>422</b> (62,4%)
	<b>Total</b>	<b>212</b> (31,4%)	<b>464</b> (68,6%)	<b>676</b>

#### 4.2.4. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. obtida pela correlação entre a Microscopia Óptica e PCRs

Considerando um total de 676 aves analisadas, a correlação dos resultados obtidos pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos e pela análise por nPCR (18S rRNA) e PCR simples (SSU rRNA mitocondrial) revelou uma prevalência total de 47,8 % (323/676) de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. A partir da análise das duas PCRs em associação à M.O. detectou-se uma sensibilidade de 81% (95% CI:74–87%) e uma especificidade de 67% (95% CI: 62–71%). A concordância (95% CI) das PCRs estimada pelo teste de Youden foi de 0,48 (0,41–0,55).

A associação da técnica molecular com a microscopia óptica revelou uma maior sensibilidade para o diagnóstico da malária aviária (Tabela 3). Baseando-se neste fato, todas as análises abaixo foram processadas seguindo o critério de associação do método

molecular (PCR) e de observação dos parasitos diretamente em esfregaços sanguíneos (M.O.).

Tabela 3: Amostras positivas e negativas para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., obtidos pela M.O. e PCR (simples e *nested*) para 676 aves analisadas.

		PCR		
		Positivo	Negativo	Total
Microscopia	Positivo	134 (19,8%)	31 (4,6%)	165 (24,4%)
	Negativo	168 (24,9%)	343 (50,7%)	511 (75,6%)
	Total	302 (44,7%)	374 (55,3%)	676

#### 4.2.4.1. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com a espécie de hospedeiro

As espécies que apresentaram as maiores prevalências de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foram respectivamente, *Cacicus cela* 88,9% (8/9), *Ramphocelus carbo* 75,0% (9/12), *Turdus leucomelas* 72,7% (12/16), *Formicivora grisea* 70,0% (7/10), *Manacus manacus* 66,7% (14/21), *Elaenia chiriquensis* 50% (14/28), *Pipra fasciicauda* 48% (54/112), *Coereba flaveola* 44,4% (12/27) e *Elaenia cristata* 40,7% (11/27). Também se comparou o status migratório das principais espécies estudadas, *Pipra fasciicauda* (residente, n=112, p>0,05) e *Elaenia chiriquensis* (migratório, n=28, p>0,05), não sendo encontradas diferenças significativas em ambos os casos. As demais espécies não foram analisadas em função do reduzido tamanho amostral (Anexo 1).

#### 4.2.4.2. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. nas três diferentes áreas estudadas

A prevalência de aves parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. observada para aves da AUP de 54,7% (103/190) foi ligeiramente superior às áreas protegidas de PEL com prevalência de 41,4% (74/181) e PEC de 50,2% (153/305), detectando-se diferença significativa entre estas prevalências observadas para as localidades amostradas ( $X^2= 6,80$ ; p=0,03, Tendência linear=0,111)(Figura 11). Ao

comparar individualmente a prevalência de parasitismo entre a área de Cerrado não intacto e as áreas naturais protegidas, foi detectada diferença estatística significativa entre a área de Cerrado intacto (PEL) e a área de Cerrado não intacto (AUP) {(AUP x PEL ( $X^2=6,04$ ;  $p=0,01$ ))}, o mesmo não foi observado ao se comparar a AUP e a área de transição (PEC) e entre os dois parques (PEC e PEL) {AUP x PEC ( $X^2=0,80$ ;  $p=0,36$ ), PEL x PEC ( $X^2=3,13$ ;  $p=0,07$ )}.

A análise de uma única família de aves silvestres (Pipridae), que apresentou semelhante representação nas três áreas avaliadas, revelou semelhantes prevalências ( $p=0,5$ ). A prevalência de hemosporídeos também não se apresentou heterogênea para a espécie mais frequentemente capturada em nosso estudo, *Pipra fasciicauda* (Pipridae) ( $p=0,5$ ). A prevalência do parasito em três espécies adicionais (*Turdus leucomelas*, *Coereba flaveola* e *Volatinia jacarina*) não diferiu entre Cerrado intacto e área urbanizada ( $p > 0,05$ ).

Diferença estatística não foi observada em relação à prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. entre os diferentes anos de coleta (2006/2007-2008/2009)(Figura 12) ( $p= 0,7487$ ).

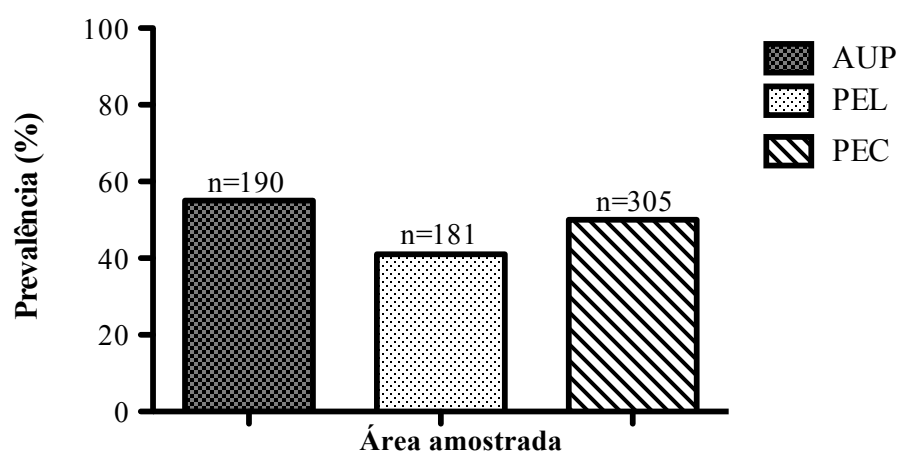


Figura 11: Prevalência de aves parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. no Parque Estadual do Cantão ( $n=305$ ), Parque Estadual do Lajeado ( $n=181$ ) e Área Urbana de Palmas ( $n=190$ ), estado do Tocantins.

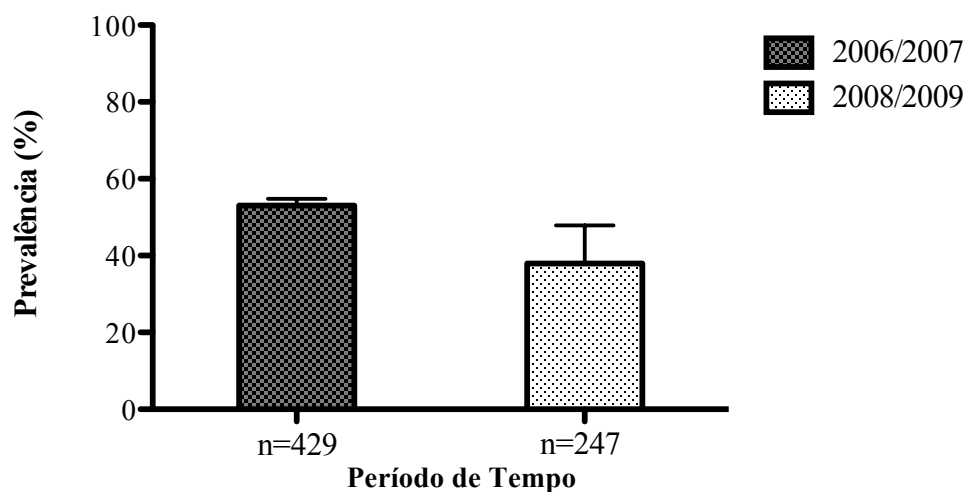


Figura 12: Prevalência de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. nos períodos de 2006/2007 e 2008/2009.

#### 4.2.4.3. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com o tipo de habitat

Encontrou-se uma maior prevalência de parasitos em aves silvestres capturadas na área de mata, 56% (112/200) quando comparada à prevalência detectada para a área de Cerrado, 48.5% (130/268) e área de capoeira, 43.8% (91/208) (Figura 13). Estas diferenças nas prevalências entre os habitats foram estatisticamente significativas ( $X^2=6.226$ ;  $p=0,04$ ). Ao analisar a prevalência de aves infectadas em cada localidade, observou-se que no PEL houve um menor número de aves infectadas no habitat de capoeira com diferença estatisticamente significativa ( $X^2=9,649$ ;  $p=0,0080$ ). O mesmo não ocorreu para as áreas PEC e AUP.

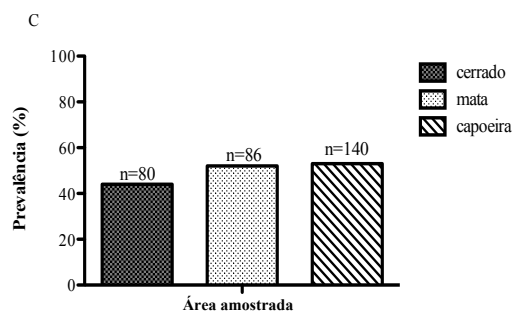
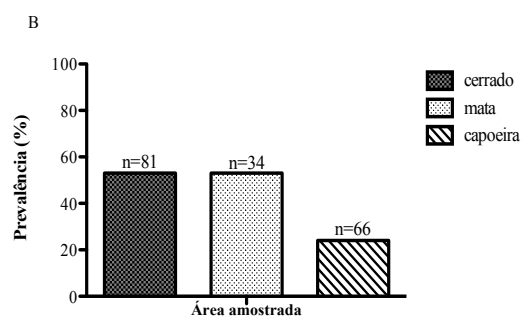
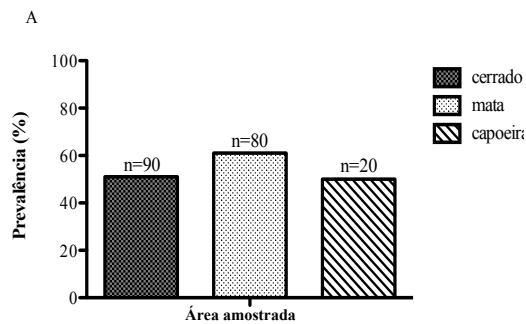
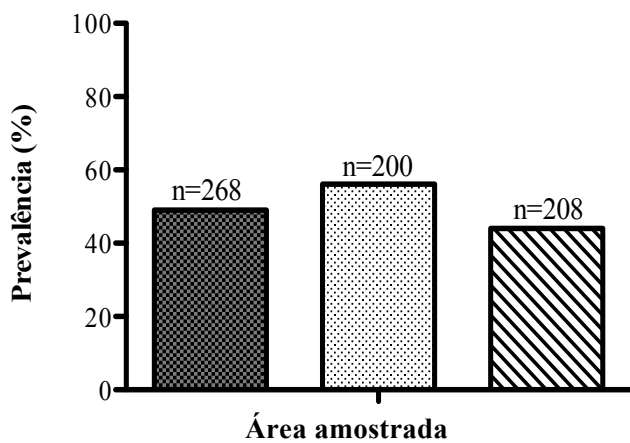


Figura 13: Prevalência total de aves parasitadas por *Plasmodium spp./Haemoproteus spp.* no estado do Tocantins, em relação ao habitat onde foram capturadas: Cerrado, mata e capoeira (as figuras A, B e C representam, respectivamente, a prevalência para as áreas AUP, PEL e PEC).

#### 4.2.4.4. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em função do habitat

Analisou-se a prevalência do parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. nas aves capturadas em função de seu habitat. As maiores prevalências foram encontradas nas espécies florestais que também frequentam áreas abertas (F2) sendo que 54,5% (109/200) das aves apresentavam-se infectadas. Entre as espécies estritamente florestais (F1) observou-se uma taxa de 47,7% (132/277) de infecção, seguida por 46,5% (46/99) de infecção para as aves estritamente campestres (C1) e aquelas de hábitos campestres que também usam áreas florestais (C2) com 44% (44/100) de infecção. Foram encontradas diferenças significativas na prevalência entre os diferentes grupos ( $X^2=26,32$ ;  $p<0,0001$ ). Ao comparar individualmente cada grupo, observamos que as diferenças foram significativas somente quando foram comparados o grupo de aves estritamente florestais (F1) com os grupos de aves campestres (C1 e C2), {(F1XC1-  $X^2= 5,374$ ;  $p=0,02$ ), (F1XC2-  $X^2= 4,400$ ;  $p=0,003$ )}, e entre os grupos de aves florestais (F1XF2-  $X^2= 23,85$ ;  $p=0,0001$ ). O mesmo não foi observado ao se comparar entre os grupos de aves campestres (C1XC2-  $X^2= 0,0001$ ;  $p=0,9$ ) e entre o grupo de aves com hábitos não estritamente florestais com o grupo de aves campestres (F2XC2-  $X^2= 1,83$ ;  $p=0,17$ ; F2XC1-  $X^2= 1,406$ ;  $p=0,2$ ) (Figura 14).

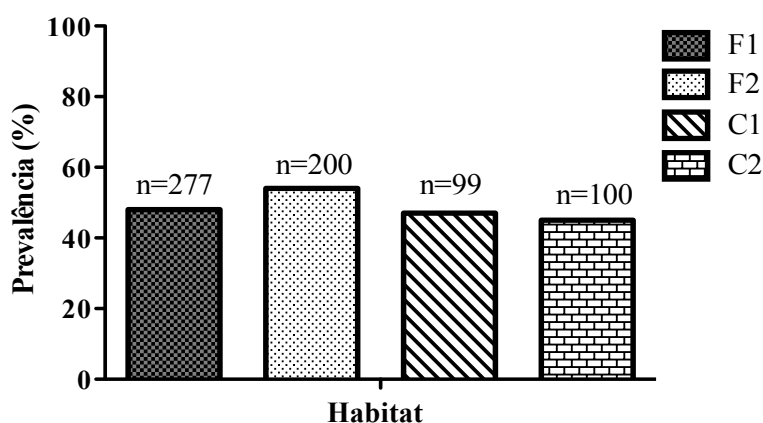


Figura 14: Prevalência total de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com o habitat (F1-espécies estritamente florestais, F2- espécies florestais que também usam áreas abertas, C1- espécies estritamente campestres e C2- espécies campestres que também usam áreas florestais).



#### ***4.2.4.5. Prevalência total de Plasmodium spp./Haemoproteus spp. de acordo com o período chuvoso ou período da seca***

A prevalência de aves parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foi maior no período chuvoso 38,7% (114/294) em relação ao período da seca 27,4% (102/372), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $X^2=8,955$ ;  $p=0,0028$ ). Observou-se um maior número de aves infectadas no período chuvoso (novembro a abril) nos três anos estudados (Figura 15). Não foi possível correlacionar a prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. entre os meses do ano devido a grande variação do número de aves capturadas em cada coleta.

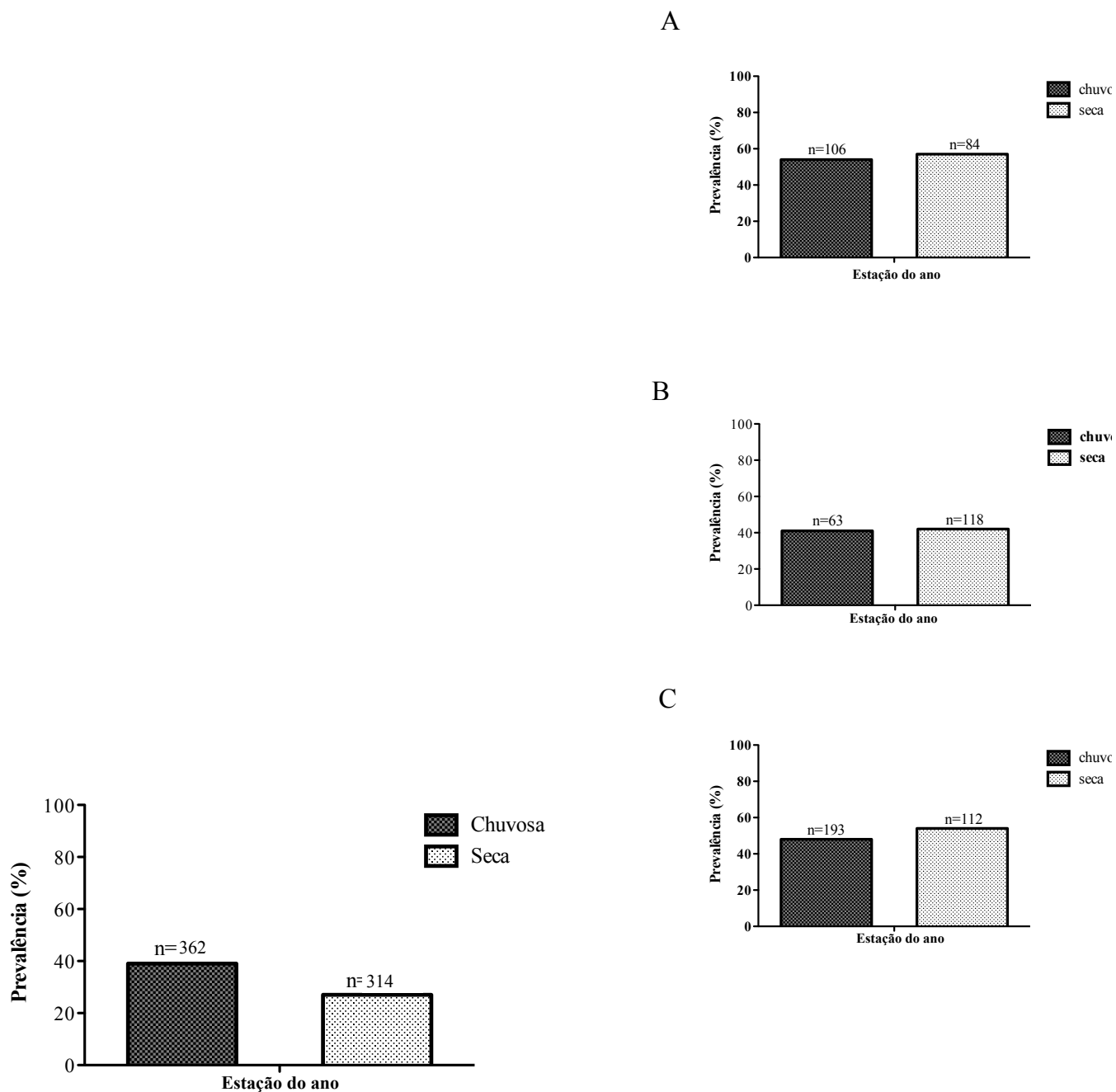


Figura 15: Prevalência sazonal total de aves parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. na estação seca (maio a outubro) e chuvosa (novembro a abril). Prevalência sazonal em cada uma das localidades estudadas (A- AUP; B- PEL; C- PEC ).

#### **4.2.4.6. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em função do status migratório**

Dos 77 passeriformes migratórios capturados (incluindo 10 espécies de aves silvestres), 44% (34/77) estavam parasitados por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. Em sua maioria, foram aves típicas do Cerrado, pertencentes às famílias Tyrannidae, dos gêneros *Elaenia*, *Myiarchus* e *Tyrannus*, além de *Vireo olivaceus* (Vireonidae). Verificou-se neste estudo que algumas espécies como *Volatinia jacarina* (Emberizidae), considerados migratórias em algumas regiões do país podem ser consideradas como residentes, uma vez que as populações desta espécie na região estudada não efetuam movimentos migratórios (SILVA, 1995 e 1997).

Dentre as localidades amostradas, o Parque Estadual do Lajeado, apresentou o maior número de indivíduos migratórios 72,8% (56/77) e elevada proporção destes parasitados 50% (28/56). Em função do reduzido tamanho amostral de aves migratórias capturas no PEC e AUP e devido à falta de proporção entre o número de aves migratórias e residentes capturadas não foi possível realizar comparações estatísticas.

#### **4.2.4.7. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em função da muda das penas**

Das 210 aves capturadas que apresentaram algum tipo de muda, seja das penas de vôo (asa e cauda) e/ou penas do corpo (cabeça, dorso e ventre), 49,5% (52/104) estavam parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., prevalência semelhante àquela observada para aves que não estavam em processo de muda (47,9%, sendo 103 infectadas em 216 analisadas), não havendo, portanto, diferenças estatísticas na prevalência de aves parasitadas de acordo com a ocorrência de muda ( $P > 0,05$ ). Considerando que o processo de muda das penas, principalmente das penas de vôo, requer um elevado gasto energético (SICK, 1997), podemos esperar um maior prevalência de aves parasitadas em processo de muda. Comparou-se a prevalência de aves parasitadas com muda das penas de vôo e de contorno, não havendo diferenças estatísticas significativas ( $X^2=0,4264$ ;  $p=0,5138$ ).

#### 4.2.4.8. Prevalência total de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. entre guildas tróficas

As guildas tróficas com maior número de espécies foram de aves preferencialmente insetívoras (n=263) e frugívoras (n=195). A maior prevalência de parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foi encontrada na guilda dos onívoros sendo de 59,2% (87/147), seguida dos granívoros com 54% (20/37), frugívoros com 51,3% (100/195), nectarívoros com 44,4% (12/27) e insetívoros com 40,7% (107/263), ocorrendo diferença estatisticamente significativa ( $X^2=14,37$ ;  $p=0,006$ ) entre as guildas analisadas (Figura 16). Uma espécie de ave silvestre (*Chloroceryle aenea*) com sete indivíduos, considerada piscívora, apresentou somente um indivíduo infectado.

Poder-se-ia esperar uma maior prevalência em aves insetívoras pelo fato da maior probabilidade destas estarem em contato com os vetores da malária aviária, entretanto, a dieta das aves insetívoras é extremamente variada e não necessariamente estes vetores compõem a dieta alimentar deste grupo de aves, ocorrendo o mesmo com as aves onívoras que também possuem uma dieta bastante variada.

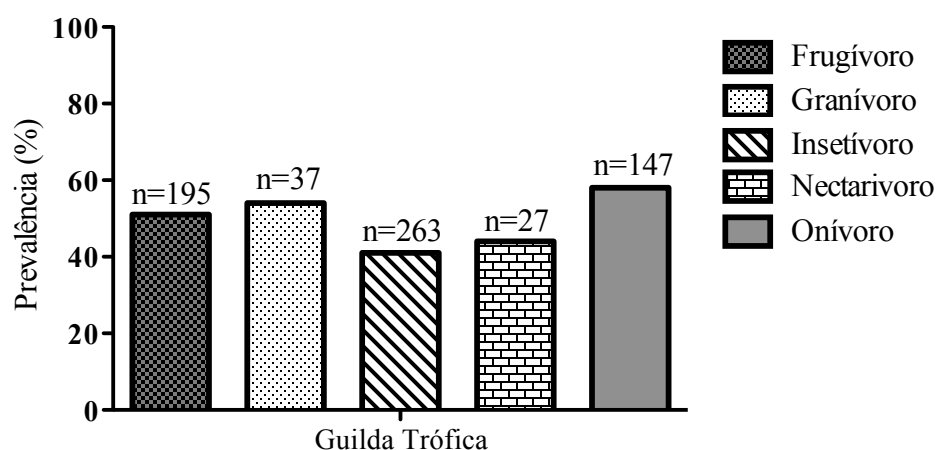


Figura 16: Prevalência total de aves infectadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com as guildas tróficas.

#### 4.3. RIQUEZA DE DIVERSIDADE DE LINHAGENS DE *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp. NAS AMOSTRAS DE AVES BRASILEIRAS

Todas as amostras que foram positivas a partir da amplificação pelas PCRs de diagnóstico (18SrRNA e SSU mitocondrial) e microscopia óptica foram submetidas a amplificação de um fragmento de 591 pb do gene citocromo b mitocondrial. Das amostras amplificadas pelo *screening* e diagnosticadas pela microscopia (n=323), 210 foram amplificadas pela PCR do gene citocromo b. A partir destas, foram obtidas 119 sequências, sendo, 19 oriundas de infecções mistas (*Haemoproteus/Plasmodium* ou duas espécie/linhagens diferentes de *Plasmodium* ou duas espécies/linhagens distintas de *Haemoproteus*) que não puderam ser analisadas no presente estudo. Assim, foram obtidas 100 sequências de amostras de aves silvestres pertencentes às três áreas, 30 amostras foram pertencentes a região urbana de Palmas (AUP), 25 do Parque Estadual do Lajeado (PEL) e 45 pertencentes ao Parque Estadual do Cantão (PEC).

Para as 100 amostras sequenciadas e identificadas (excluindo-se as 19 amostras de infecção mista não identificadas), 21 linhagens (11 linhagens diferentes de *Plasmodium* e 10 linhagens de *Haemoproteus*) foram obtidas a partir de 99% de semelhança entre as linhagens obtidas (Anexo 3). Estas linhagens foram encontradas parasitando diferentes espécies de aves silvestres, apresentando diferenças na sua prevalência. Por exemplo, a linhagem Toc-2 *Haemoproteus* spp. apresentou uma prevalência de infecção de 24%, estando presente em 18 diferentes espécies de aves silvestres (Tabela 4 e figura 17). Registramos a mesma proporção de aves silvestres infectadas por *Plasmodium* spp. e por *Haemoproteus* spp.. Entretanto, *Haemoproteus* spp. Foi encontrado infectando um maior número de diferentes espécies de aves, 42 espécies, enquanto, *Plasmodium* spp. esteve presente em 35 diferentes espécies de aves silvestres.

Das 11 linhagens de *Plasmodium* identificadas, seis foram restritas `a uma única área entre as três estudadas: Toc11, Toc21, Toc28 e Toc32 na área urbana; Toc19 em PEL e Toc14 do PEC (Figura 18). Cinco das 10 linhagens de *Haemoproteus* identificadas foram obtidas em áreas únicas: Toc5, Toc7, Toc26 e Toc29 em PEL e Toc22 em PEC. As linhagens de *Plasmodium* Toc4, Toc9, Toc16, Toc24 e Toc15 e linhagens de *Haemoproteus* Toc1, Toc2, Toc3, Toc13 e Toc20 foram observadas em mais de um habitat (PEL, PEC e AUP) (Figura 18).

Seis das linhagens encontradas no presente trabalho foram previamente descritas em outros estudos (Tabela 5). Quinze linhagens são descritas pela primeira vez: 8 de *Plasmodium* e 7 de *Haemoproteus*. As linhagens generalistas (encontradas em mais de um habitat) foram registradas de forma significativa em maior número de espécies hospedeiras ( $6,5 \pm 5,2$  dp, escala 2-14, n=6) quando comparadas as linhagens não generalistas ( $1,7 \pm 1,1$  dp; faixa de 1-5; n = 15) (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 6,8$ ; gl =1; p=0,01). A distribuição das linhagens dos parasitos entre as três áreas mostrou que a área de transição (PEC) apresentou o menor número de linhagens não generalistas.

A riqueza de diversidade parasitária foi maior na área urbana (78,7% do conjunto de diversidade) do que na área intacta (61,4%) e de transição (56,6%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (p> 0,05) (Tabela 6).

Tabela 4: Diversidade de parasitos da malária aviária no Estado do Tocantins.

Parasito	Linhagens	Nº aves examinadas	Nº espécies infectadas	Prevalência de Linhagens (%)
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc4	22	14	22
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc9	6	2	6
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc11	2	1	2
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc14	1	1	1
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc15	11	10	11
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc16	1	1	1
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc19	1	1	1
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc21	1	1	1
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc24	2	1	2
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc28	1	1	1
<i>Plasmodium</i> spp.	Toc32	2	2	2
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc1	4	4	4
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc2	24	18	24
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc3	9	7	9
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc5	2	2	2
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc7	1	1	1
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc13	2	2	2
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc20	3	3	3
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc22	2	2	2
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc26	1	1	1
<i>Haemoproteus</i> spp.	Toc29	2	2	2
TOTAL		100	77	100

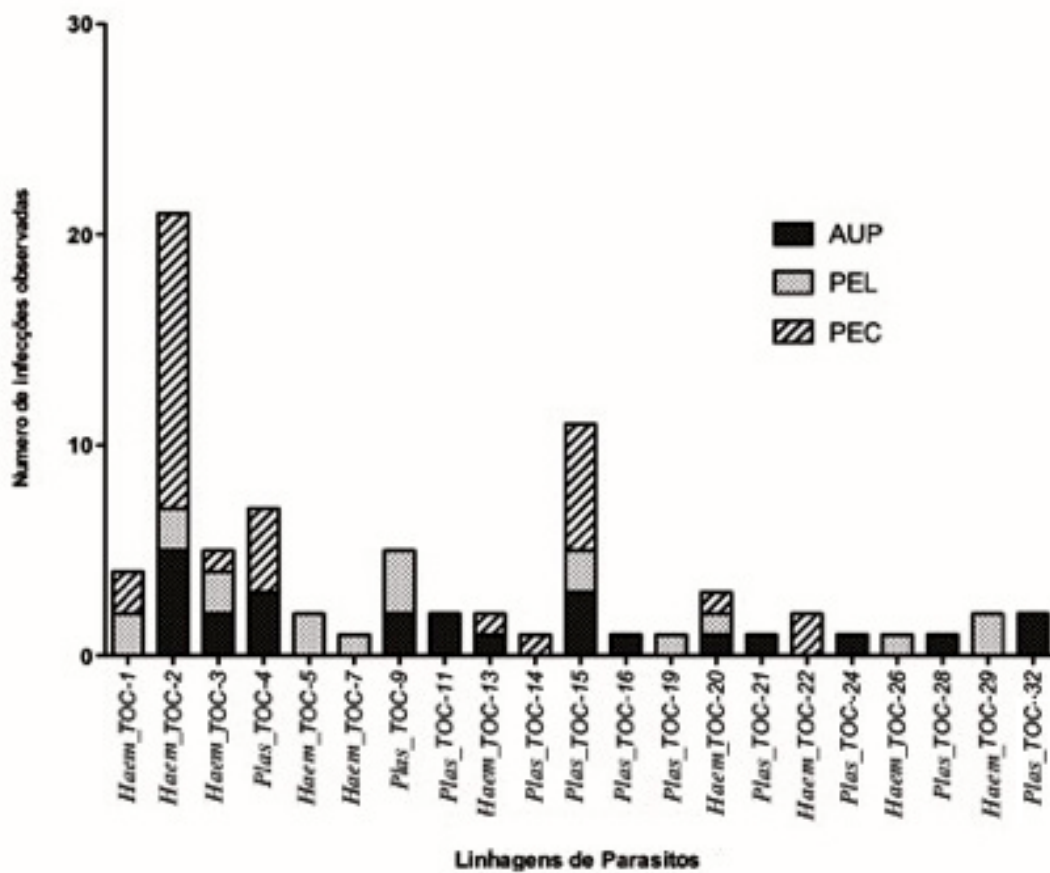


Figura 17: Linhagens de hemoparasitos e número de infecções encontradas nas áreas preservadas e no Cerrado alterado (AUP- cerrado alterado, PEL- cerrado intacto e PEC- área de transição).

Tabela 5. Relação de linhagens de parasitos já relatadas em outros estudos.

<b>Linhagens de Parasitos</b>	<b>Número GenBank de linhagens idênticas</b>	<b>Fonte</b>
Toc2_ Haem	AY540204	Ricklefs,R.E., et al., 2004
Toc4_ Plas	DQ659549	Beadell,J.S., et al., 2006
Toc5_ Haem	AY167242	Fallon et al., 2003
Toc15_ Plas	AF465559	Ricklefs,R.E. and Fallon,S.M., 2002
Toc20_ Haem	HM222483	Ricklefs,R.E. and Outlaw,D.C., 2010
Toc32_ Plas	GQ395654	Levin,I.I., et al., 2009

Tabela 6. Riqueza de diversidade de linhagens estimada pelo índice de Chao1 (S) na área urbana (AUP), Cerrado natural (PEL) e área de transição (PEC). SD – Desvio padrão, CI: Intervalo de confiança. S% - Porcentagem riqueza total estimada em cada área.

Áreas	S	SD	IC 95%		%
Riqueza total	22.88	2.26	21.29	32.99	100
PEL	12.96	1.4	12.09	19.97	56.6
PEC	14.00	4.18	11.39	34.00	61.4
AUP	18.00	5.54	13.89	41.98	78.7



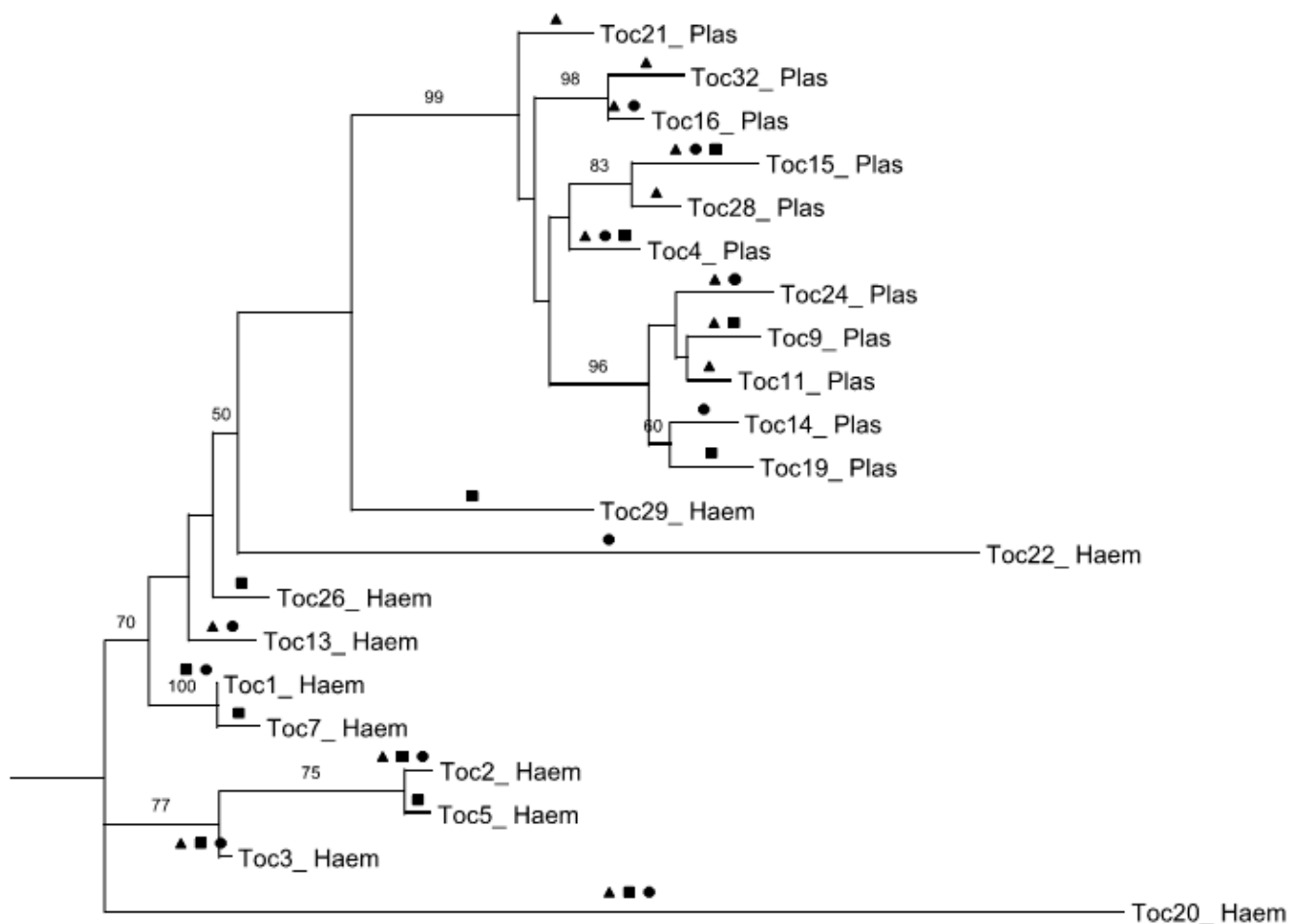


Figura 18: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizadas no Estado do Tocantins em três áreas estudadas (■AUP, ▲PEL e ●PEC). Relação filogenética de 21 linhagens de hemoparasitos, baseada em seqüências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados) (AUP- cerrado alterado, PEL- cerrado intacto e PEC- área de transição).

#### 4.3.1. Prevalência de linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com as características dos habitats

Houve diferenças entre as três áreas estudadas de acordo com as características dos habitats onde AUP apresenta Cerrado com marcada degradação ambiental, PEL apresenta o Cerrado intacto e PEC possui uma região de ecótono entre Cerrado e Amazônia totalmente preservado. Ao analisarmos as linhagens separadamente por área (Figuras 19, 20, 21) houve um maior número de linhagens de *Haemoproteus* spp. em relação a *Plasmodium* spp. na área urbana (AUP) quando comparada com as áreas preservadas (PEL e PEC).

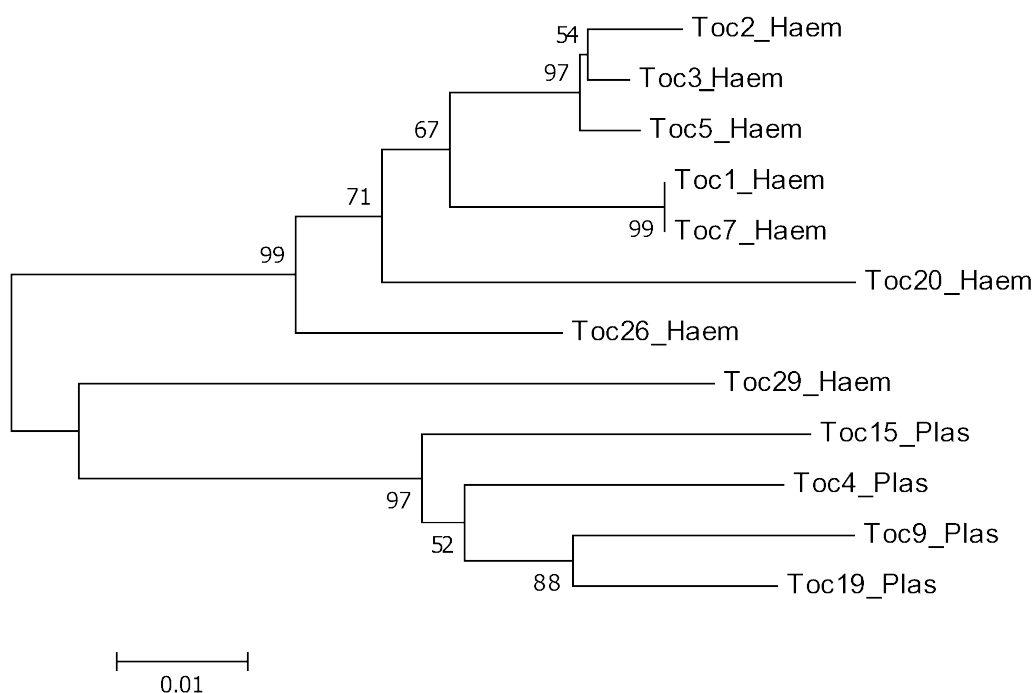


Figura 19: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizada na região urbana de Palmas (AUP). Relação filogenética de 12 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados).

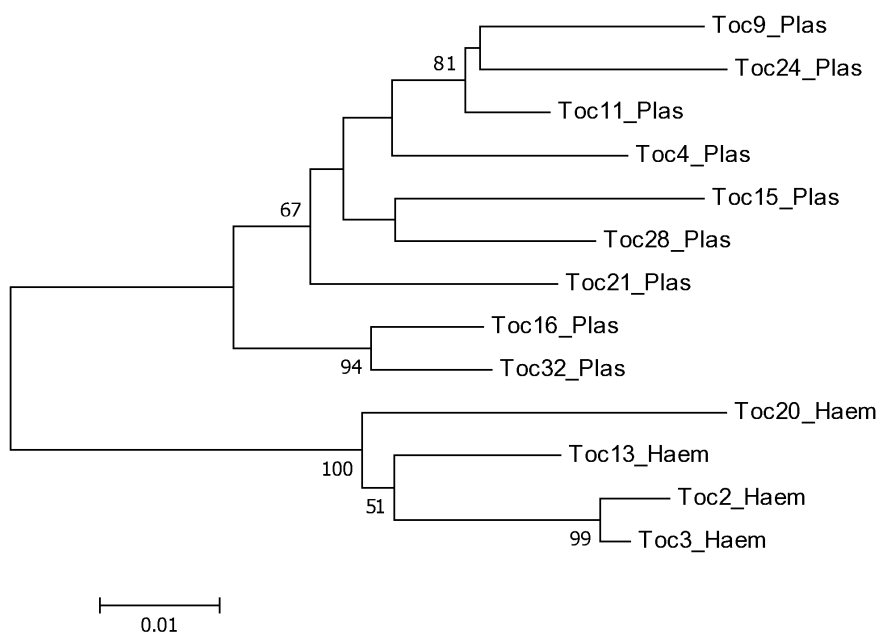


Figura 20: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizada na região do Parque Estadual do Lajeado (PEL). Relação filogenética de 13 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados).

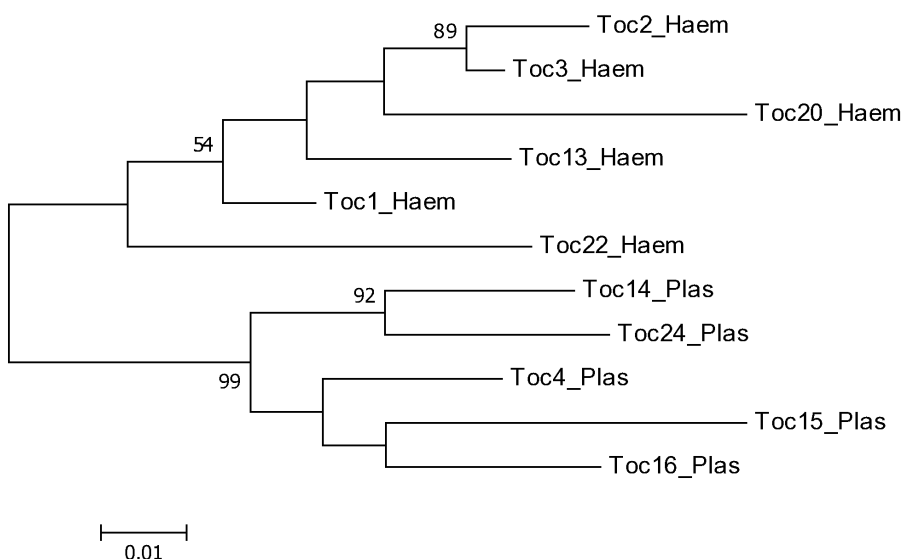


Figura 21: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de aves silvestres localizada na região do Parque Estadual do Cantão (PEC). Relação filogenética de 11 linhagens de hemoparasitos, baseada em sequências do citocromo b. Números localizados nos nós indicam o valor de *bootstrap* (1000 réplicas, só os valores acima de 50% são mostrados).

#### 4.3.2. Prevalência de linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. X status migratório e residente

No presente estudo, 77 aves migratórias foram capturadas, sendo 44% destas parasitadas por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. A fim de analisar a diversidade dos hemoparasitos de acordo com o status residente ou migratório optou-se por realizar a análise no nível de família, escolhendo-se aquelas com maior número de espécies de aves silvestres apresentando determinada linhagem de parasitos. Logo, comparou-se a família Pipridae por possuir espécies residentes, neste estudo (espécie *Pipra fasciicauda*) e a família Tyrannidae (espécies *Elaenia cristata* e *Elaenia chiriquensis*), consideradas espécies migratórias (SILVA, 1995 e 1997; MEDEIROS & MARINI, 2007). Ao compararmos a prevalência das linhagens de acordo com o status migratório ou residente, observou-se uma maior diversidade de linhagens nas espécies de aves migratórias da família Tyrannidae citadas anteriormente. Além disso, detectou-se um maior número de linhagens exclusivas para a família Tyrannidae (4 linhagens) em relação à família Pipridae (2 linhagens) (Figura 22).

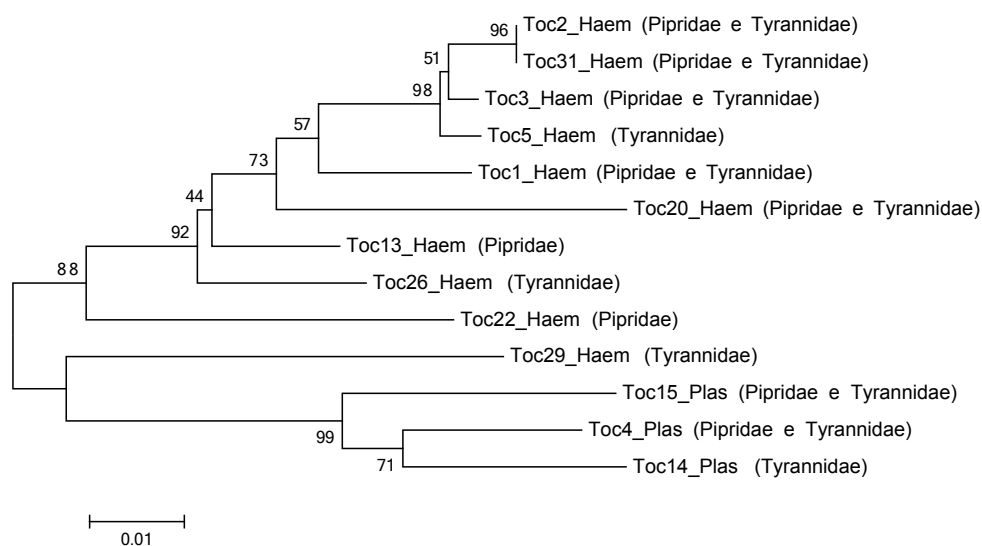


Figura 22: Filograma de 13 linhagens de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em três espécies de aves silvestres pertencentes a duas famílias com status migratório (Tyrannidae) e residente (Pipridae)(bootstrap de 1000 réplicas).

#### 4.4. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE AVES SILVESTRES DA VENEZUELA ANALISADAS

Na Venezuela, foram analisadas 527 amostras de aves silvestres (11 famílias e 20 espécies), sendo 252 aves silvestres pertencentes a região Oeste e 275 aves silvestres pertencentes à região Leste. As espécies com maior número de indivíduos amostrados foram respectivamente *Tiaris bicolor* (n=141), *Cardinalis phoenicis* (n=80), *Mimus gilvus* (n=51), *Xiphorhynchus picus* (n=38) e *Sublegatus arenarum* (n=25). Informações detalhadas sobre as espécies encontram-se no Anexo 2.

#### 4.5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp. NAS AMOSTRAS DA VENEZUELA

O diagnóstico molecular foi realizado a partir da amplificação do gene mitocondrial SSU (PCR simples).

A prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp foi de 41% sendo as espécies com maior prevalência, *Icterus nigrogularis* com 100% (19/19) de aves infectadas, *Mimus gilvus* 84,3% (43/51), *Melanerpes rubricapillus* 78,6% (11/14), *Cardinalis phoenicis* 73,8% (59/80). A prevalência de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. não variou entre as duas regiões estudadas. A prevalência de parasitos do sangue na região Oeste foi de 45% (113/252), superior à da região Leste que foi de 37,5% (103/275), mas esta diferença não foi significativa (p=0,1). Ao analisar as duas espécies de aves mais frequentemente capturadas e representação semelhante entre as regiões Leste e Oeste (*Cardinalis phoenicis* n=80; e *Tiaris bicolor* n=141), observou-se uma prevalência semelhante de parasitos entre as duas regiões estudadas (Tabela 7).

A prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. também não foi heterogênea na estação seca e chuvosa na análise das amostras como um todo (p=0,07) e entre as duas espécies (*Cardinalis phoenicis* e *Tiaris bicolor*) (p=0,6). Foi realizada uma análise para determinar a prevalência de parasitos em relação ao sexo das aves silvestres. Para isso foram escolhidas duas espécies que além de maior número de aves capturadas apresentam dimorfismo sexual. A prevalência de parasitos do sangue entre machos e fêmeas não diferiu para as espécies *Cardinalis phoenicis* e *Tiaris bicolor* (Tabela 7).

Tabela 7. Prevalência (%) de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de acordo com as regiões estudadas (leste e oeste) e o sexo em duas espécies de aves silvestres amostradas na Venezuela.

Espécies	Prevalência de Parasitos (%)		Valor de p (Teste qui- quadrado)
	Região		
	Leste	Oeste	
<i>Cardinalis phoeniceus</i>	72.7	75	0.3
<i>Tiaris bicolor</i>	22.5	19.7	0.3
Espécies	Sexo		Valor de p (Teste qui- quadrado)
	Macho	Fêmea	
	<i>Cardinalis phoeniceus</i>	69.2	
<i>Tiaris bicolor</i>	16.9	24.7	0.2

#### 4.6. DIVERSIDADE DE *PLASMODIUM* spp./*HAEMOPROTEUS* spp. NAS AMOSTRAS DA VENEZUELA

O sequenciamento do gene do citocromo b revelou sete linhagens de *Plasmodium* e 10 linhagens de *Haemoproteus*. Das sete linhagens de *Plasmodium*, seis foram restritas a uma região de estudo: Ven\_01, Ven\_08, Ven\_10 e Ven\_17 na região Leste; Ven\_07 e Ven\_15 na região Oeste (Figura 23). Três das 10 linhagens de *Haemoproteus* foram obtidas em uma única região: Ven\_12 e Ven\_14 na região leste e Ven\_03 na região Oeste.

A linhagem de *Plasmodium* Ven\_9 e linhagens de *Haemoproteus* Ven\_02, Ven\_04, Ven\_05, Ven\_06, Ven\_11, Ven13 e Ven\_16 foram observadas em ambas as regiões (Leste e Oeste) (Figura 23). Oito das linhagens encontradas no presente estudo já haviam sido descritas em estudos prévios (Tabela 8). Nove linhagens foram descritas pela primeira vez para o presente estudo: três referentes à *Plasmodium* e seis à *Haemoproteus*.

A diversidade parasitária foi maior na região Leste (82,4% da diversidade combinada) do que na região Oeste (64,7%), mas não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

A tabela 9 lista as linhagens dos parasitos, o número de aves infectadas por cada linhagem, o número de espécies infectadas por cada linhagem e a prevalência de cada linhagem no estudo. A proporção de linhagens do parasito que compartilha sequências idênticas em mais de uma espécie de hospedeiro foi maior para *Haemoproteus* (70% de espécies de hospedeiros) do que para *Plasmodium* (30% das espécies de hospedeiros).

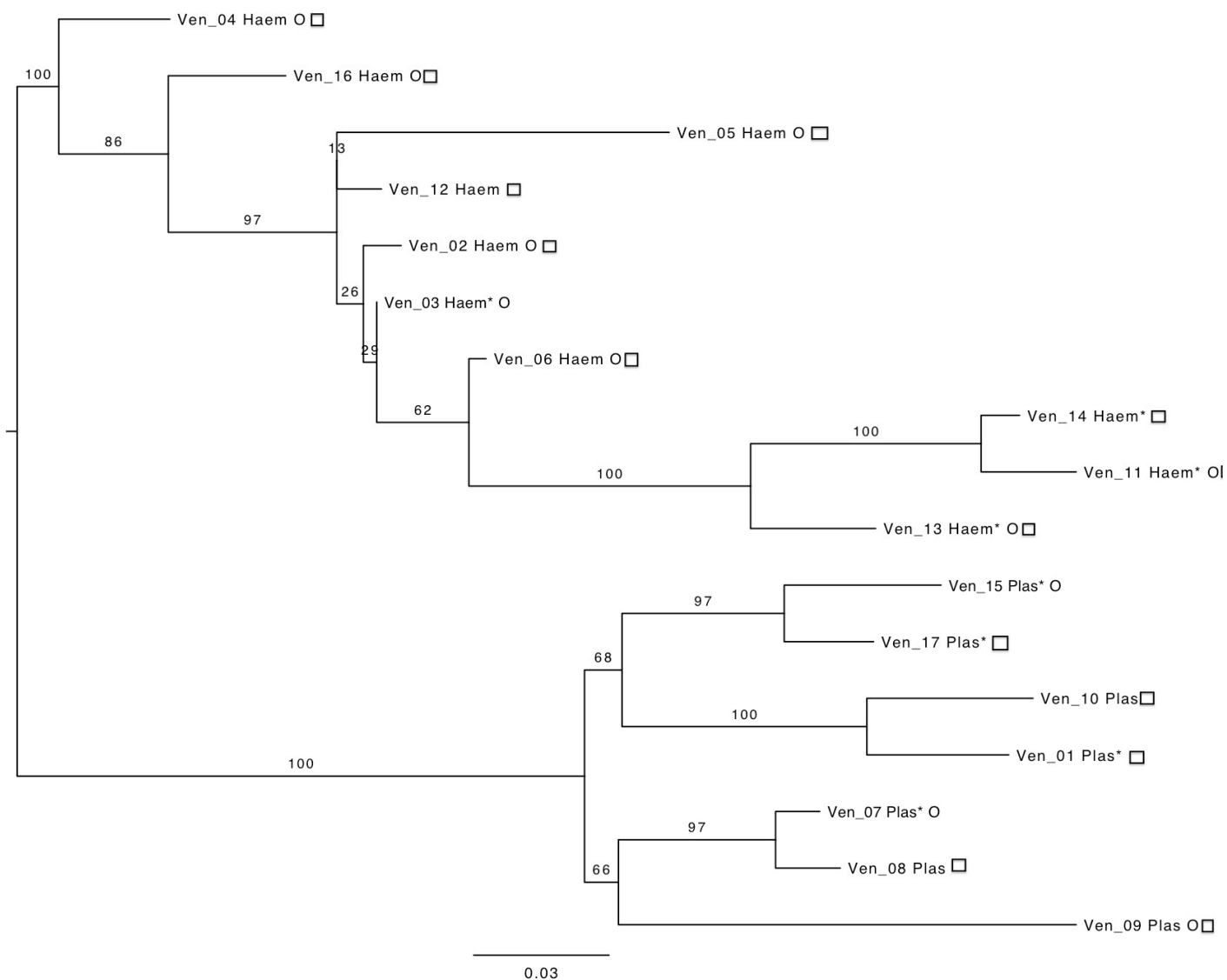


Figura 23. Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em uma comunidade de aves silvestres. As relações filogenéticas das 17 linhagens de Haemosporida encontradas em duas regiões diferentes, baseados em sequências do cit b. Os números localizados na parte superior dos ramos indicam apoio de *bootstrap* ML (1000 réplicas). A presença de cada linhagem do parasito nas duas áreas estudadas na Venezuela é indicada por: região Oeste (O) e a região Leste (□). Linhagens dos parasitos relacionados em outros estudos (\*).

Tabela 8: Relação de linhagens de parasitos já relatados em outros estudos.

Linhagens de Parasitos	Número GenBank de linhagens idênticas	Fonte
Ven_1 Plas	AF465559	Ricklefs,R.E. & Fallon,S.M., 2002
Ven_03 Haem	GQ395658	Levin et al., 2009
Ven_07 Plas	DQ838997	Beadell et al., 2006
Ven_11 Haem	AF465568	Ricklefs,R.E. & Fallon,S.M., 2002
Ven_13 Haem	HM222483	Ricklefs,R.E. & Outlaw,D.C., 2010
Ven_14 Haem	GQ395647	Levin,I.I., et al., 2009
Ven_15 Plas	GQ395654	Levin,I.I., et al., 2009
Ven_17 Plas	EU627831	Ishak,H.D et al., 2008

Tabela 9: Diversidade de parasitos da malária aviária na região norte da Venezuela

Parasito	Linhagens	Nº aves examinadas	Nº espécies infectadas	Prevalência de Linhagens (%)
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven01	5	1	3,1
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven07	1	1	0,6
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven08	2	2	1,3
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven09	2	2	1,3
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven10	1	1	0,6
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven15	1	1	0,6
<i>Plasmodium</i> spp.	Ven17	1	1	0,6
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven02	100	10	0,1
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven03	4	2	2,5
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven04	16	2	9,9
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven05	6	1	3,7
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven06	4	2	2,5
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven11	8	1	5
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven12	1	1	0,6
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven13	5	2	3,1
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven14	1	1	0,6
<i>Haemoproteus</i> spp.	Ven16	3	3	2
<b>TOTAL</b>		<b>161</b>	<b>34</b>	<b>100</b>



#### 4.7. RELAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS BRASILEIROS E VENEZUELANOS

O filograma produzido para as duas regiões combinadas resultou em um clado um de *Plasmodium* spp. (Figura 24). Alguns subclados compartilharam linhagens entre os dois países. Seis linhagens brasileiras (Toc1, Toc2, Toc4, Toc7, Toc15 e Toc32) foram similares a cinco linhagens da Venezuela (Ven\_1, Ven\_2, Ven\_7, Ven\_15 e Ven\_16), similaridade apoiada por altos valores de *bootstrap*. Nenhuma das linhagens ocorreu na mesma espécie de hospedeiro para os dois países e, em alguns casos, elas não foram encontradas nem mesmo na mesma família de ave, o que sugere que estas podem ser linhagens de parasitos altamente generalistas.

O índice de diversidade de Shannon indicou que a diversidade de linhagens foi maior no Brasil do que na Venezuela ( $t=4.84$   $p=0.000$ ) (Tabela 10).

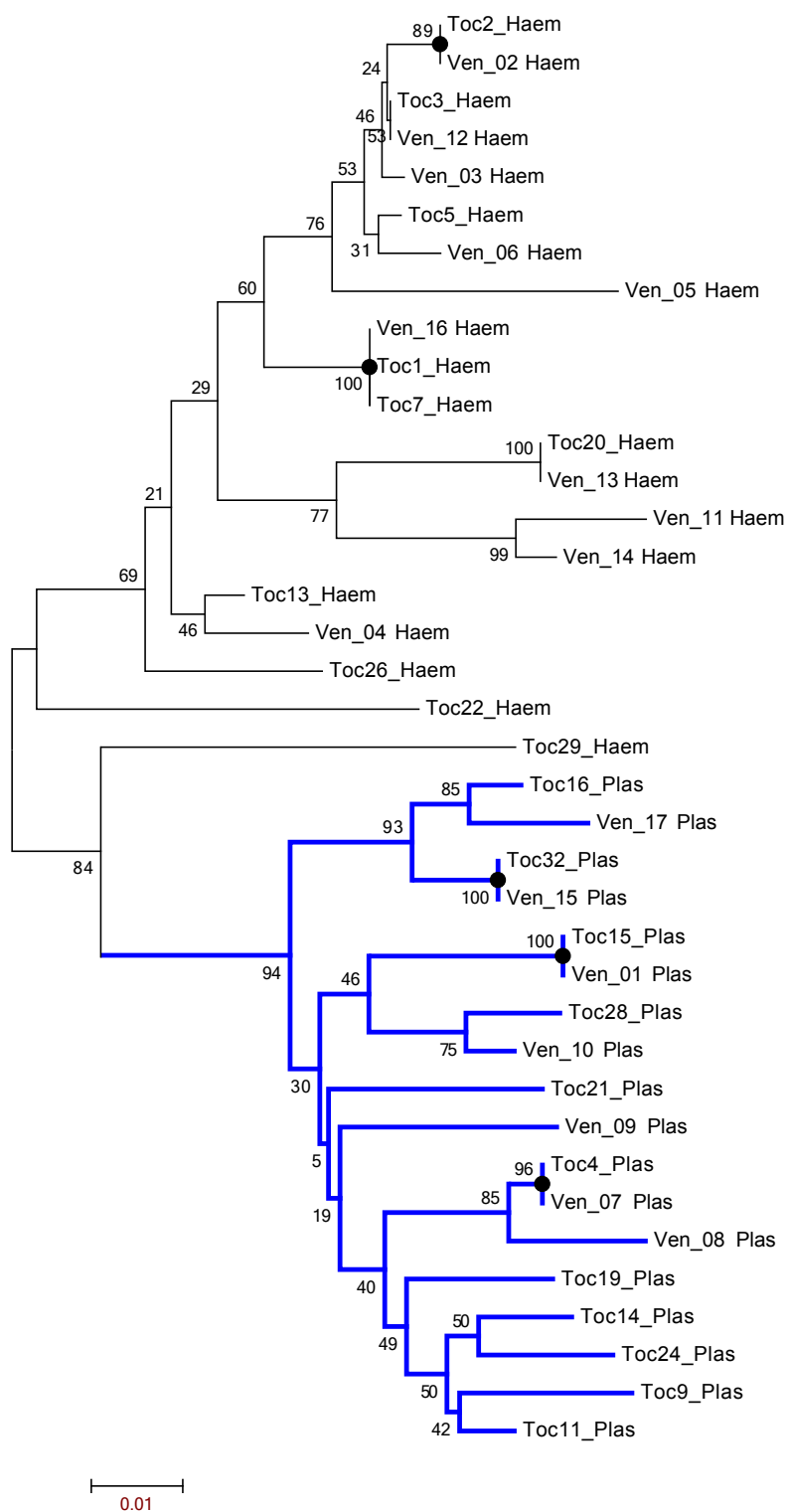


Figura 24: Filograma de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em comunidades de aves silvestres pertencentes ao Brasil e à Venezuela, baseados em sequências do cit b. Os números localizados na parte superior dos ramos indicam suporte de *bootstrap* ML (1000 réplicas). A presença de linhagens semelhantes entre os dois países é indicado por: ●

Tabela 10: Tamanho das amostras e o índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) para as linhagens de parasitos detectados nas regiões do Brasil e Venezuela.

<b>Diversidade</b>	<b>Brasil</b>	<b>Venezuela</b>
Riqueza	21	17
Número de Indivíduos	100	161
Shannon ( $H'$ )	2.40	1.56



## **Diagnóstico e prevalência da infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em aves brasileiras**

Em nosso estudo, evidenciamos alta prevalência de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em aves silvestres brasileiras quando utilizamos simultaneamente, ou seja, em paralelo, a identificação microscópica e molecular destes parasitos.

Alguns estudos corroboram nossos resultados demonstrando que a prevalência estimada de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., apresentou-se maior quando associada ao uso paralelo de ferramentas moleculares e microscopia do que quando utilizou-se somente um dos métodos de detecção de forma isolada (GARAMSZEGI, 2010).

Para se obter uma melhor sensibilidade da microscopia óptica é necessário analisar um maior número de campos ópticos; recomenda-se cerca de 200 campos visuais, um critério que foi cumprido em nosso estudo. Porém, poucos estudos cumprem este procedimento (HABERKORN, 1984; DEVICHE et al., 2001; MURATA, 2002; SHURULINKOV & GOLEMANSKY, 2002; RIBEIRO et al., 2005; BELO et al., 2009). Atualmente aceita-se que dois fatores principais determinem o sucesso da identificação das espécies: os esforços de um especialista com experiência e a visualização de um maior número de campos visuais na microscopia óptica (VALKIŪNAS, 2005).

Em nosso estudo, podemos confirmar a fraca correspondência entre PCR e microscopia, provavelmente devido à baixa intensidade de parasitemia e às variações de sensibilidade de diagnóstico em concordância com estudos realizados previamente (JARVI et al., 2002; RICHARD et al., 2002; BELO et al., 2009; BELO et al., 2011). Em nosso estudo, os baixos níveis de parasitemia detectados pelo exame microscópico (1-5 parasitos/200 campos microscópicos), com presença de poucas formas intra-eritrocíticas dos plasmódios, também impediu a identificação morfológica do parasito.

Os dados obtidos n presente trabalho evidenciam os problemas já mencionados com relação ao diagnóstico molecular da infecção na detecção de infecções mistas, tendo sido impossível a verificação simultânea de amostras positivas para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. A presença de falso-negativos detectada em nosso estudo pelo diagnóstico molecular pode estar associada à presença de certas linhagens de hemoparasitos não amplificáveis pelos iniciadores utilizados como já proposto por GARAMSZEGI (2010). Nesta direção, tem sido apontado que diferentes gêneros ou

espécies de parasitos podem apresentar diferentes habilidades de detecção por técnicas moleculares de acordo com os iniciadores utilizados (FALLON & RICKLEFS, 2008). Inclusive, um estudo recente propôs a combinação de pares de iniciadores para a triagem dos parasitos da malária em aves a fim de evitar resultados inapropriados ou inadequados (MARTINEZ et al., 2009).

Estudos recentes têm comparado o desempenho das duas principais metodologias utilizadas para detecção de parasitos da malária em aves, mas as conclusões apresentadas foram conflitantes. Por exemplo, FALLON & RICKLEFS (2008) mostraram que uma proporção considerável de infecção por espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus* passou despercebida na triagem visual, enquanto a PCR foi mais sensível para determinação da prevalência de infecção por estes parasitos do sangue. Esta conclusão reforça resultados de estudos anteriores, que também indicaram que a inspeção visual de esfregaços sanguíneos tende a ser menos eficaz para a detecção de parasitos do que a triagem molecular (JARVI et al., 2002; RICHARD et al., 2002). No entanto, recentemente, VALKIŪNAS e colaboradores (2008) mostraram que ambos os métodos subestimam a prevalência, sugerindo que as discrepâncias nos resultados podem ocorrer se as análises microscópicas são realizadas de modo inadequado, devido à baixa qualidade dos esfregaços ou inexperiência dos observadores. Por exemplo, os estudos microscópicos podem usar diferentes resoluções óticas ou analisar diferentes números de campos óticos ou eritrócitos, os quais podem afetar a sensibilidade da detecção do parasito (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). No entanto, o resultado da PCR pode também depender dos iniciadores utilizados, do número de ciclos térmicos, da qualidade da concentração de DNA e enzimas, do número de exames e de outras condições de laboratório, que podem variar entre os estudos (FREED & CANN, 2003, 2006).

Estas discussões metodológicas atuais e suas repercussões na detecção de infecção por hemospórideos demonstraram que os métodos moleculares (PCR) e os métodos microscópicos (baseados na morfologia das formas eritrocíticas) usados para estimar a prevalência de malária aviária apresentam sensibilidades bastante diferentes (JARVI et al., 2002; RICHARD et al., 2002; HELLGREN et al., 2004; WALDENSTRÖM et al., 2004; FALLON & RICKLEFS, 2008; VALKIŪNAS et al., 2008). O problema mais frequente apontado por estudos baseados no diagnóstico microscópico é que a microscopia fornece estimativas muito baixas de prevalência quando comparadas às obtidas por métodos

moleculares. Isso pode ocorrer porque a amplificação de sequências-alvo é mais eficiente na detecção de parasitos em situações de baixa intensidade de quando comparada à triagem visual. No entanto, é importante ressaltar que as ferramentas moleculares podem fornecer tanto resultados falsos negativos como falsos positivos e um desempenho inadequado na detecção de infecções mistas (FREED & CANN, 2003, 2006; COSGROVE et al., 2006 ; VALKIŪNAS et al., 2006).

Uma vez discutidos os problemas, vantagens e limitações dos métodos diagnósticos empregados neste estudo, é importante ressaltar que poucos estudos de prevalência de hemoparásitos em aves silvestres têm sido conduzidos em áreas neotropicais, como zonas áridas, o Cerrado e as áreas de transição que compõem a Floresta Amazônica e o Cerrado. A prevalência de *Plasmodium* spp. encontrada neste estudo, corresponde à maior registrada até o momento para as comunidades de aves silvestres Neotropicais (47,8%). A prevalência mais próxima à encontrada no presente estudo corresponde àquela registrada também no Brasil, no Estado de Minas Gerais por RIBEIRO e colaboradores (2005) de cerca de 40% em aves da Mata Atlântica contrapondo às prevalências de aproximadamente 10% anteriormente descritas para aves neotropicais (WHITE et al., 1978). Esta alta prevalência encontrada no presente estudo aponta para a grande diversidade da avifauna Neotropical o que pode oferecer um grande potencial para a elevada prevalência de hematozoários em aves em relação à região Neártica.

Prevalências de hemoparásitos em comunidades de aves silvestres Neotropicais foram analisadas em El Salvador (4,9%) (WINCHELL, 1978) e na Bolívia (5,1%) (BENNETT et al., 1991). Numa escala global, o valor encontrado para o Cerrado brasileiro foi maior do que os valores encontrados nas revisões feitas para a região Neotropical (10,5%;  $Z = 3,308$ ,  $p = 0,001$ ), América do Norte (36,9%;  $Z = 13,387$ ,  $p < 0,001$ ) e sudeste da Ásia (16,3%;  $Z = 5,988$ ,  $p < 0,001$ ) (GREINER et al., 1975; MCCLURE et al., 1978; WHITE et al., 1978).

Em escala regional, a maioria dos trabalhos evidencia prevalências de hemoparásitos em aves silvestres no Brasil inferiores à taxa encontrada no presente estudo, seja no Cerrado, 5,6% (FECCHIO, 2006), Mata Atlântica, 15,8% (SEBAIO, 2002) e 8,0% (WOODWORTH-LYNAS et al., 1989) e Amazônia 10,3% (LAINSON et al., 1970). O uso de microscopia como único método para determinar a prevalência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres da Mata Atlântica e do Cerrado, foi investigado em alguns estudos

(SEBAIO et al., 2010; FECCHIO et al., 2011) revelando baixas prevalências de *Plasmodium* spp. (<10%).

Alta prevalência de infecção por parasitos da malária aviária (41%) foi observada na região árida da Venezuela. Prevalência semelhante (50%) foi observada em filhotes de cegonha também na Venezuela (GABALDÓN & ULLOA, 1980). Neste contexto, a alta prevalência (50%) dos parasitos da malária em filhotes de aves ciconiformes, bem como a elevada mortalidade entre os filhotes com malária nesta região da América Latina (GABALDÓN & ULLOA, 1980) requer atenção. A alta prevalência observada nesta região Neotropical pode estar relacionada aos vetores das famílias dos Ceratopogonidae e Culicidae, comuns na região Neotropical e responsáveis pela transmissão respectiva de *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. (GARNHAM, 1966; LINLEY, 1985; VALKIŪNAS, 1997). Em relação ao sexo das aves, assim com em outros estudos (DEVICHE et al., 2001; VALKIŪNAS et al., 2005) não foi encontrada diferença de infecção por parasitos entre machos e fêmeas.

Mesmo sendo uma região árida, há estudos que relatam a abundância do vetor *Anopheles aquasalis*, principal vetor de malária humana na Norte da Venezuela, tanto na estação seca como chuvosa, sendo positivamente correlacionada com a qualidade da água, pH, salinidade e condutividade, e com o oxigênio dissolvido na água principalmente na estação seca (BERTI, 2010).

### ***Relação entre prevalência de hemoparasitos e as características ambientais e do hospedeiro***

A prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. registrada em nosso estudo foi maior em áreas antropizadas (Cerrado urbanizado) quando comparada às prevalências para áreas intactas ou pouco degradadas.

O presente estudo é o primeiro a relatar a prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em comunidades de aves silvestres de áreas urbanas mostrando uma maior prevalência de aves parasitadas em ambiente que vem sofrendo alterações ambientais. Nenhuma das espécies capturadas na área urbana foi considerada sinatropical, ou seja, adaptada a este meio.

A alta prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. registrada na área de



transição (PEC) pode ser atribuída à presença de uma área que sofre períodos de alagamento, favorecendo assim a reprodução de vetores e por consequência aumento do número de infecções. Estudos têm demonstrado um aumento do risco de malária humana nas proximidades de coleções de água, que fornecem abundantes criadouros de mosquitos (VAN DER HOEK et al., 2003; BALLS et al., 2004; OMUMBO et al., 2005). Futuros estudos de ecologia de mosquitos vetores podem revelar associações entre a competência vetorial de mosquitos nas áreas de transição (Amazônia e Cerrado), o que será particularmente útil para explicar os padrões heterogêneos observados nas infecções por plasmódios aviários.

Na Venezuela, há uma prática atual nas terras de zonas áridas que causam, a longo prazo, alterações ambientais e representam uma grave ameaça à sobrevivência das aves de habitat restrito (RODRIGUEZ-FERRARO & BLAKE, 2008). Existem algumas espécies de aves comuns no deserto seco e denso ao longo das costas da Venezuela e Colômbia, que diferem consideravelmente entre as áreas como consequência de fatores antrópicos, como a modificação do habitat e caça furtiva. Informações sobre os parasitos do sangue podem contribuir para conservação das aves silvestres pertencentes às zonas áridas. A alta prevalência de parasitos observada neste habitat pode ser associada à precipitação anormal, o que provoca aumentos na reprodução e sobrevivência do vetor. Em Botsuana, na África, mais de dois terços das variabilidades observadas entre os anos de incidência de malária humana durante os meses de janeiro a maio podem ser explicadas pela variação na precipitação no período compreendido entre os meses de dezembro a fevereiro (THOMSON et al., 2005). Na Venezuela existem relatos sobre chuvas anômalas, conforme descrito por LYON (2002) que mostrou prevalência de chuva torrencial no mês de dezembro de 1999, resultando em inundações devastadoras e deslizamentos de terra ao longo da costa norte da Venezuela. Esses eventos ocorreram em uma área de clima predominantemente seco, durante a estação seca precedida por fortes, mas raras chuvas sazonais.

Diferenças ambientais entre diferentes habitats podem oferecer oportunidades distintas para as associações parasito-hospedeiro e ajudar a explicar as diferenças na prevalência dos parasitos do sangue (TELLA et al., 1999; DURRANT et al., 2006).

Com relação às espécies de aves silvestres do norte do Brasil, a prevalência de hemoparasitos foi, em geral, mais elevada que aquelas descritas para outras regiões do

país. FECCHIO (2006) encontrou prevalências bem inferiores para algumas destas espécies no Cerrado do Distrito Federal: *Elaenia chiriquensis* (n=120; 0,8%), *Elaenia cristata* (n=110; 2,7%) e *Volatinia jacarina* (n=4; 0,0%). Na Mata Atlântica, SEBAIO (2002) encontrou 44,4% de prevalência em *Turdus leucomelas* (n=18) provenientes de duas áreas protegidas do estado de Minas Gerais. As diferenças encontradas poderiam ser influenciadas pelo método de diagnóstico utilizado, uma vez que FECCHIO (2006) e SEBAIO (2002) o fizeram por observação microscópica.

A maior prevalência de parasitos em aves que vivem na mata pode estar relacionada com a presença de uma maior diversidade de espécies, incluindo diferentes espécies de vetores. O mesmo podemos dizer com relação ao habitat onde observamos que as aves que vivem em florestas que frequentam áreas abertas e aves estritamente florestais estão mais expostas aos vetores potenciais, o que resultaria em maiores taxas de parasitismo. As condições do ambiente, assim como a umidade do ar, o aumento da temperatura do ar e do solo podem afetar a quantidade de vetores de parasitos sanguíneos como ceratopogonídeos e culicídeos (KETTLE, 1968). Isto significa que aves florestais tem maiores chances de serem infectadas do que aquelas que utilizam outros tipos de habitats.

Tem sido relatado em alguns estudos que as variações sazonais na prevalência de hemoparasitos ocorram mais frequentemente em regiões temperadas (KIRKPATRICK & SUTHERS, 1988; WEATHERHEAD & BENNETT, 1992), onde o clima sazonal é mais pronunciado, limitando a transmissão dos parasitos aos meses quentes do ano (ATKINSON et al., 1988). Entretanto, nosso estudo realizado em uma região Neotropical mostrou variação sazonal na prevalência de hemoparasitos na região brasileira com uma maior prevalência de aves parasitadas no período chuvoso, o que indica que no período chuvoso há um maior número de aves parasitadas, provavelmente em função da maior umidade e volume de água que podem favorecer a reprodução de vetores. O mesmo não foi observado para as aves da Venezuela que não apresentaram variação sazonal na prevalência de hemoparasitos o que possivelmente, se deve, ao fato do estudo ter sido realizado em uma zona árida onde períodos de chuva além de escassos não são sazonais.

Considerando as espécies migratórias, estas estão mais expostas à pressão dos parasitos do que as aves residentes em função de transitarem por diferentes locais. Por estarem mais expostas a diferentes vetores, estas espécies tendem a apresentar alta

prevalência de hemoparasitos (GREINER et al., 1975). No presente estudo foram detectadas altas prevalências de hemoparasitos (44%) em aves migratórias capturadas. Entretanto, cabe ressaltar que não foi possível correlacionar a prevalência de hemoparasitos ao hábito migratório ou não das espécies de hospedeiros devido a grande diferença do número de aves capturadas entre as duas categorias.

No período de muda de penas, as aves apresentam um elevado gasto energético (SICK, 1997), além de uma redução da resposta imune (BERRY, 2003). Assim, poderíamos esperar um maior prevalência de aves parasitadas em processo de muda. Entretanto, neste estudo não foi observada diferença estatística significativa na prevalência de hemoparasitos entre aves capturadas no período de muda ou não.

A dieta de aves também é outro fator que parece afetar a prevalência de parasitos no sangue. Em nosso estudo, as infecções por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foram mais frequentes em aves onívoras, diferindo estatisticamente dos demais grupos analisados. Além das espécies onívoras, as espécies granívoras e frugívoras também apresentaram um grande número de aves infectadas. Outro estudo realizado por nosso grupo em aves de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais mostrou maior prevalência na guilda dos insetívoros, atribuindo este resultado a um maior contato das aves com os vetores ou ainda à pior condição física de alguns indivíduos parasitados, o que os tornaria menos ativos e conseqüentemente mais vulneráveis, agravando a infecção (RIBEIRO et al. 2005).

### ***Diversidade dos parasitos Plasmodium spp./Haemoproteus spp. no Brasil e na Venezuela***

A maioria das análises genéticas de infecções por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. emprega o sequenciamento de genes mitocondriais localizados em um segmento específico do gene do citocromo b (BENSCH et al., 2009). Desta forma, busca-se uniformizar os dados obtidos de prevalência e diversidade de parasitos em várias partes do mundo a fim de se obter um banco de dados mundial de parasitos da malária aviária. BENSCH e colaboradores (2009) propuseram um banco de dados unificado, disponível em um *website* de consulta pública, Neste *website* é possível identificar hemosporídeos aviários dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* identificados por suas

sequências obtidas da região parcial do citocromo b. Os dados iniciais do banco de dados incluem as informações disponíveis sobre cada parasito, como sequência, hospedeiro, região geográfica onde o hospedeiro foi capturado, morfoespécies, bem como marcadores genéticos que possam ser usados para análises filogenéticas.

A intensa utilização de marcadores mitocondriais nos revela uma diversidade do parasito muito maior do que o esperado a partir de análises morfológicas tradicionais, mas existe uma questão não resolvida sobre até que ponto essa variedade reflete a diversidade real de espécies.

No presente estudo foi avaliada além da prevalência de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. e suas associações a fatores bióticos e abióticos, a riqueza de linhagens de parasitos que infectam aves silvestres brasileiras em duas diferentes áreas de Cerrado: Cerrado preservado e Cerrado impactado, além de um ecótono constituído por uma zona de transição natural entre Cerrado e a Floresta Amazônica. Pretendeu-se, assim, fornecer uma indicação das influências de perturbações antropogênicas em diferentes habitats sobre a prevalência e diversidade genética de parasitos presentes em comunidades de aves silvestres no Brasil.

Em contraste com a prevalência, não foi observada diferença significativa entre a diversidade de linhagens de parasitos no Cerrado intacto e Cerrado urbanizado. No entanto, quando analisamos uma única família (Pipridae) e uma única espécie de ave silvestre (*Pipra fasciicauda*) amostrada nos três ambientes, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência ou diversidade de linhagens do parasito. A presença ou ausência de determinada espécie de hospedeiro é provavelmente o fator mais importante influenciando a presença de linhagens do parasito e a prevalência global, como mostrado em alguns estudos anteriores (RICKLEFS et al., 2004; RICKLEFS et al., 2005). A similaridade na diversidade do parasito entre as três áreas brasileiras pode estar relacionada com a grande variedade de aves silvestres distribuídas entre essas áreas. Assim, é provável que a presença ou ausência de uma linhagem do parasito dependa da presença de espécies hospedeiras ao invés de atributos específicos do habitat. Em contraste, CHASAR e colaboradores (2009) mostraram que a degradação de habitats florestais em Camarões, África, determina alta prevalência e alta diversidade de linhagens do parasito dependente da espécie hospedeira. No entanto, este tipo de alteração de habitat provavelmente resulta em mudanças mais dramáticas nas comunidades de aves e de vetor

do que aquela verificada para o habitat de Cerrado urbanizado analisado em nosso estudo.

A variação espacial da prevalência do parasito tem sido demonstrada (SCHALL & MARGHOOB, 1995; BENSCH & AKESSON, 2003) e, é provável que diferentes linhagens do parasito são associadas às comunidades particulares de vetores. Esse fator poderia explicar as diferenças na distribuição geográfica de linhagens do parasito em locais diferentes no presente estudo. No entanto, não observamos diferenças significativas na diversidade de linhagens entre os três habitats investigados sugerindo que as comunidades de vetores foram suficientes para apoiar de forma semelhante as comunidades do parasito, independentemente da configuração do ambiente.

*Plasmodium* e *Haemoproteus* são amplamente distribuídos em muitas famílias de aves. Alguns estudos têm sugerido que o parasito *Haemoproteus* apresente-se relativamente mais associado à hospedeiros específicos do que parasitos do gênero *Plasmodium* (ATKINSON & VAN RIPER, 1991). No entanto, em nosso estudo, linhagens de *Haemoproteus* foram mais compartilhadas entre diferentes espécies hospedeiras do que as linhagens de *Plasmodium*, embora essa diferença não tenha sido significativa. Certamente, os parasitos de ambos os gêneros são, em geral, competentes para infectar várias espécies de hospedeiros, o que está subjacente ao fenômeno de frequentes mudanças de hospedeiros ao longo da história evolutiva dos parasitos hemosporídeos (BENSCH et al., 2000;. RICKLEFS & FALLON, 2002;. WALDENSTRÖM et al., 2002; BEADELL et al., 2004).

É aceito que o habitat pode influenciar a carga parasitária em espécies de hospedeiros, alterando a frequência de contato com vetores de parasitos sanguíneos (SCOTT & EDMAN, 1991). No entanto, no presente estudo, embora tenhamos observado uma maior diversidade de parasitos na área urbana, não houve diferença estatística na diversidade das linhagens entre as três áreas estudadas, incluindo o ambiente de transição que poderia apresentar uma grande abundância de vetores após períodos de alagamento.

Observou-se ampla variação no número de hospedeiros a partir dos quais foram recuperadas linhagens individuais do parasito, variando de um a quinze hospedeiros de espécies de aves. A linhagem com o maior número de espécies hospedeiras (Toc2 *Haemoproteus* sp.) já foi descrita na Venezuela e no estado do Alabama nos Estados Unidos (RICKLEFS, et al., 2004). Outra linhagem com ampla distribuição de hospedeiros (Toc15) também foi descrita em Missouri nos Estados Unidos e nas Antilhas (FALLON et

al, 2003.; RICKLEFS et al., 2005). Em geral, as seis linhagens de parasito identificadas no presente estudo e que também são descritas em outras regiões exibiram maior abundância e diversidade de hospedeiros locais. Observamos linhagens individuais de *Haemoproteus* parasitando várias espécies e até oito famílias de aves. Outros estudos têm detectado diversidade de hospedeiros semelhante para algumas linhagens de *Haemoproteus* (FALLON et al., 2005), indicando que essas linhagens podem infectar um ampla variedade de hospedeiros. Em contraste, com essas linhagens generalistas, também observamos várias linhagens individuais com única espécie de hospedeiro. Muitas destas linhagens estavam presentes em baixa abundância em nossa amostragem, e por isso foi impossível avaliar a distribuição dos hospedeiros conforme já discutido por RICKLEFS e colaboradores (2005). Espera-se que estudos adicionais na região norte do Brasil ampliem as faixas de hospedeiros em muitas das linhagens de hemosporídeos aparentemente especialistas.

Na Venezuela, registramos a existência de 17 linhagens de parasito em zona árida, sendo nove novas linhagens descritas (três para *Plasmodium* e seis para *Haemoproteus*). Isso pode sugerir que linhagens do parasito possam ser transmitidas por espécies de mosquitos presentes no habitat árido. Zonas áridas apresentam clima quente na maior parte do ano. Além disso, é aceito que a temperatura e a umidade são determinantes fundamentais na distribuição e abundância da maioria das espécies de vetores.

No presente estudo, constatamos que a linhagem Ven\_17 Plas, antes só observada em Corujas (ordem dos Strigiformes), foi também encontrada em uma espécie da ordem Passeriformes, o *Sublegatus arenarum*, indicando que esta linhagem considerada como específica de um grupo de hospedeiros é capaz de infectar outras ordens de aves silvestres.

É importante mencionar ainda que estudos já relataram a ocorrência de parasitos do subgênero *Novyella*, inclusive, aquele mais frequentemente detectado em aves da região da Venezuela (GABALDÓN & ULLOA, 1976). Infelizmente, no presente estudo não foi possível detectar as espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* nem mesmo o subgênero envolvido na infecção uma vez que não dispomos dos esfregaços sanguíneos das aves analisadas nesta região de estudo.

Em um total de 38 linhagens (21 Brasileiras e 17 Venezuelanas), onze linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus* foram compartilhadas entre o norte do Brasil e o norte da Venezuela, indicando que a malária aviária submete-se a diferentes processos evolutivos

em cada região. As onze linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus* (seis linhagens de *Plasmodium* e cinco linhagens de *Haemoproteus*) compartilhadas entre as duas regiões foram encontradas em várias espécies diferentes de hospedeiros incluindo diferentes gêneros e até mesmo famílias de aves. Isto indica que estas linhagens compartilhadas não estão restritas a um determinado hospedeiro e aparecem nas amostras mais comumente do que as linhagens restritas a uma determinada região.

Um fato que merece atenção é a incompatibilidade de vetores encontrada entre as duas regiões. As linhagens de *Plasmodium/Haemoproteus* podem ser transportadas entre as duas regiões, mas os vetores presentes em cada região podem não ser capazes de transmitir o parasito para um novo hospedeiro. Um trabalho clássico (HUFF, 1932) mostrou que entre os mosquitos *Culex pipiens*, variações individuais na susceptibilidade à infecção pelo *Plasmodium cathemerium* e *Plasmodium relictum* foram detectadas.

A restrição de linhagens a uma região também pode ser atribuída a linhagens que não são transportadas por aves silvestres migratórias entre as duas regiões. Muitas linhagens de hemosporídeos aviários parecem ser veiculados entre diferentes regiões geográficas por aves migratórias (RICKLEFS et al., 2005). WALDENSTRÖM e colaboradores (2002) detectaram linhagens de hemosporídeos em muitas amostras africanas que também tinham sido detectadas em populações de aves migratórias que reproduzem na Europa.

Entre o Brasil e a Venezuela podemos observar espécies do gênero *Tyrannus* que possuem movimentos migratórios entre o Brasil e a Venezuela. Os Tyrannidae são os mais representativos, cerca de 33,5% das aves que realizam este tipo de deslocamento (RIDGELY & TUDOR, 1994). Por exemplo, a subespécie *Myiarchus swainsoni swainsoni*, proveniente das regiões mais meridionais da América do Sul, inverna no norte deste continente. Durante o inverno austral, junho-agosto, *Elaenia parvirostris* se desloca para o norte atravessando o Amazonas, invernando na Colômbia, Venezuela e Guianas (RIDGELY & TUDOR, 1994). Entretanto, poucas espécies de aves silvestres apresentam esse padrão de migração.

Encontramos uma maior diversidade de linhagens na região do Brasil ao comparar com a região da Venezuela. Esta diversidade pode ser atribuída a uma maior diversidade de espécies de aves silvestres nos habitats brasileiros. As áreas brasileiras estudadas ainda podem apresentar uma maior diversidade de vetores do que a zona árida da Venezuela

devido à existência de ambientes que propiciam a reprodução de diferentes espécies de vetores. Entretanto, devemos considerar que esta diversidade pode não retratar de forma real a diversidade de parasitos no Brasil como um todo e nem em relação à Venezuela, mas, somente demonstrar a diversidade entre o cerrado brasileiro e a região árida da Venezuela.

Está claro que há uma necessidade de realizar mais estudos em regiões neotropicais e em diferentes habitats para compreender melhor as relações entre o ambiente, a abundância e a diversidade de vetores e de parasitos e seus respectivos efeitos no hospedeiro.





- *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. são parasitos frequentemente encontrados em aves silvestres pertencentes a dois países da região Neotropical, Brasil e Venezuela;
- A associação dos métodos de diagnóstico microscopia óptica e PCR permite a identificação de um maior número de aves infectadas e deve ser priorizada em estudos de prevalência de malária aviária;
- As prevalências de parasitismo por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. bem como a diversidade de linhagens destes hemoparasitos em aves silvestres brasileiras pertencentes a três diferentes habitats de cerrado (urbanizado, intacto e de transição) parecem similares embora, áreas de cerrado degradado apresentem maiores prevalências de infecção quando comparadas às áreas intactas;
- Algumas características biológicas do hospedeiro podem estar relacionadas ao aumento da susceptibilidade das aves aos parasitos da malária aviária, como por exemplo, hábitos alimentares onívoros, as condições migratórias, dependência da mata e de ocorrência em áreas florestais;
- Novas linhagens de parasitos, 15 no Brasil e 6 na Venezuela foram ser descritas pela primeira vez deste trabalho;
- Linhagens comuns de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. são compartilhadas entre o norte do Brasil e o norte da Venezuela;
- A diversidade de parasitos da malária aviária é maior na região brasileira do que na região venezuelana.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- ARCTANDER, P. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal of Ornithology*, v.129, p.205-216, 1988.
- ARRIERO, E.; MØLLER, A. P. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *Journal of Evolutionary Biology*. v. 21, p.1504-1513, 2008.
- ATKINSON, C. T. Epizootiology of *Haemoproteus melagrisdis* (Protozoa, Haemosporina) in Florida: potential vectors and prevalence in naturally infected Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medicine Entomology*, v.25, p.39–44, 1988
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In “*Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*” (J. E. Loye and M. Zuk, eds.), p.19-48. Oxford Univ. Press, Oxford. 1991.
- ATKINSON, K. L.; WOODS, R. J.; DUSEK, L. S. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology*, v.11, p.59-69, 1995.
- ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L.; IKO, W. M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, v.36, p.197-204, 2000.
- AVISE, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*. v.43, p.1192-1208, 1989.
- BALLS, M.J.; BODKER, R.; THOMAS, C.J. Effect of topography on the risk of malaria infection in the Usambara Mountains, Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.98, p.400–408, 2004.
- BARKER, Jr. R. H.; BANCHONGAKSORN, T.; COURVAL, J. M. et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerase chain reaction. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, p.416-426, 1992.
- BEADELL, J.; GERING, E.; AUSTIN, J. et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Molecular Ecology*., v.13, p.3829–3844, 2004.

- BEADELL, J.S., ISHTIAQ, F., COVAS, R., et al. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceeding Royal Society London B*, v.273, p.2935-44, 2006.
- BELO, N. O.; PASSOS, L. F.; MARTINS, L. C. et al. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Preventive Veterinary Medicine*. v.88, p.220-4, 2009.
- BELO, N. O. Prevalência de *Plasmodium* sp em aves silvestres da família Psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 60 pp. 2007.
- BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T.; REIS, E. S. et al. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. *Plos ONE* , v.6, 2011.
- BENNETT, G. F.; OKIA, N. O.; ASHFORD, R. W. et al. Avian Haemoproteidae. II. *Haemoproteus enucleator* sp. n. from the Kingfisher, *Ispidina picta* (Boddaert). *Journal of Parasitology*, v.58, p.1143-47, 1972.
- BENNETT, G. F.; WHITEWAY, M. A.; WOODWORTH-LYNAS, C. B. Host-parasite catalogue of the avian haematozoa. *Memorial University of Newfoundland Occasional Papers in Biology*, v.5, 243 p., 1982.
- BENNETT, G. F AND M. A. PEIRCE. Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890. *Journal of Natural History*, v.22, p.1683–1696, 1988.
- BENNETT, G. F.; EARLE, R. A.; PEIRCE, M. A. et al. Avian Leucocytozoidae: the leucocytozoids of the Phasianidae *sensu latu*. *Journal of Natural History*, v.25, p.1407-1428, 1991.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D. et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceeding Royal Society London B*, v.267, p.1583–1589, 2000.
- BENSCH, S.; ÅKESSON, A. Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers. *Journal of Parasitology*, v.89, p.388–391, 2003.
- BENSCH, S.; PEREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evolution*, v.58, p.1617-1620, 2004.

- BENSCH, S.; HELLGREN, O; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Molecular Ecology Resources*, v.9, p.1353-1358, 2009.
- BERRY, W.D. The physiology of induced molting. *Poult Science*, v.82, p.971-980, 2003.
- BERTI, J.; GONZÁLEZ, J.; NAVARRO-BUENO et al. Larval seasonality of the mosquito *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) and other insects associated to its habitat in Sucre, Venezuela. *Rev Biol Tropical*, v.58, p.777-787, 2010.
- CASTLE, M. D.; CHRITENSEN, B. M. Hematozoa of wild turkeys from the midwestern United States. Translocation of wild turkey and its potential role in the introduction of *Plasmodium kemp*i. *Journal of Wildlife Disease*, v.26, p.180-185, 1990.
- CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos Listas das aves do Brasil. Versão 25/01/2011 (2011). Disponível no site <http://www.ib.usp.br/cbro>
- CHASAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T. B.; SEHGAL, N. M.R. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology*, v.18, p.4121-33, 2009.
- CHAO, A.; CHAZDON, R. L.; COLWELL, R. K. et al. Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics*, v.62, p.361-371, 2006.
- CHEN, M. M.; SHI, L.; SULLIVAN, JR. D. J. *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to Plasmodium hemozoin and b-hematin. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.113, p.1-8, 2001.
- CLAYTON, D. H.; MOORE J. Host-parasite Evolution. General principles and avian models. Oxford University Press. Oxford. 1997.
- COLWELL, R. K. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2, Department of Ecology & Evolutionary Biology University of Connecticut, Storrs, CT. <http://purl.oclc.org/estimates>. 2008.
- COMBES, C. *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Chicago University Press, Chicago, Illinois. 2001.
- CORRADETTI, A.; GARNHAM, P.C.C.; LAIRD, M. New classification of the avian malaria parasites. *Parassitologia*, v.5, p.1-4, 1963.

- COSGROVE, C. L.; DAY, K. P.; SHELDON, B. C. Coamplification of Leucocytozoon by PCR diagnostic tests for avian malaria: A cautionary note. *Journal of Parasitology*, v.92, p.1362–1365, 2006.
- COTTONTAIL, V. M.; WELLINGHAUSEN, N.; KALKO, E. K. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panamá. *Parasitology*, v.136, p.1133-45, 2009.
- CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens. Ed. Roca, São Paulo, 1353 p., 2007.
- DESSER, S. S.; BENNETT, G. F. The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* and *Hepatocystis*. In: KREIER, J. P. (Ed.). *Parasitic Protozoa*, Academic Press, San Diego, California. p. 273–305, 1993.
- DEVICHE, P.; GREINER, E. C.; MANTECA, X. Interspecific variability of prevalence in blood parasites of adult passerine birds during the breeding season in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, v.37, p.28–35, 2001.
- DOBSON, A. P.; MAY, R. M. Disease and Conservation. In *Conservation Biology*. The science of scarcity and diversity. Massachusetts, p.345-365, 1986.
- DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F. et al. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. *Ornithology Monograph*, v.60, p.98–111, 2006.
- ESCALANTE, A. A.; FREELAND, D. E.; COLLINS, W. E.; et al. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome (*Plasmodium* y Apicomplexa) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.95, p.8124–8129, 1998.
- FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution*, v.57, p.606-615, 2003.
- FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. *American Nature*, v.165, p.466–480, 2005.
- FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E. Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *Journal of Avian Biology*, v.39, p.514–522, 2008.

- FEAGIN, J. E. The extrachromosomal DNAs of Apicomplexan parasites. *A. Rev. Microbiol.*, v.48, p.81–104, 1994.
- FECCHIO, A. Hemoparasitos de aves silvestres (Passeriformes) no Cerrado do Brasil Central, DF. Dissertação de Mestrado, UNB, Brasília, 33p. 2006.
- FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Low prevalence of blood parasites in Cerrado birds, Central Brazil. *Neotropical Biology And Conservation*, v.2, p.127-135, 2007.
- FECCHIO, A., ROBALINHO, M. L.; SILVEIRA, P. et al. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. *Emu - Aust Ornithol* “In Press”, 2011.
- FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, v.4, p.663-673, 1995.
- FREED, L. A.; CANN, R. L. On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. *Journal of Parasitology*, v.89, p.1261–1264, 2003.
- FREED, L. A.; CANN, R. L. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review. *Condor*. v.108, p.459–473, 2006.
- GABALDÓN, A.; ULLOA, G. Las formas exoeritrocíticas de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi*, 1976.
- GABALDÓN, A.; ULLOA, G. Holoendemicity of malaria: an avian model. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.74, p.501-507, 1980.
- GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *Journal of Parasitology*, v.96, p.1197-203, 2010.
- GARNHAM, P. C. The development cycle of *Hepatocystis (Plasmodium) kochi* in the monkey host. *Ibib*, v.41, p.601-616, 1948.
- GARNHAM, P. C., (Ed.). *Malaria parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Science, Oxford, UK, 1966.
- GARVIN, M. C., AND J. V. REMSEN. An alternative hypothesis for heavier parasite loads of brightly colored birds: Exposure at the nest. *Auk* v.114, p.179–191, 1997.
- GODFREY Jr, R. D.; FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Disease*, v.23, p.558-565, 1987.



- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; MCCUTCHAN, T. F. et al. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.*, v.80, p.634–637, 1994.
- GRASSI, B.; FELETTI, R. Parasites malariques chez les oiseaux. *Arch. Ital. Biol.*, v.13, p.297-300, 1890.
- GRATZ, N. G. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J Am Mosq Control Assoc.* v.7, p.353-65, 1991.
- GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. *Science*, v.283, p.1476–1481, 1999
- GREINER, E. C.; BENNETT, G. F.; WHITE, E. F. et al. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can. J. Zool.*, v.53, p.1762-1787, 1975.
- HABERKORN, A. Observations on malaria in European perching birds (Passeriformes). Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene, Series A. v.256, p.288–295, 1984.
- HAMILTON, W. D.; ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science*, v.218 p.384-387, 1982.
- HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, v.90, p.797-802, 2004.
- HELLGREN, H., J. PE´ REZ-TRIS, AND S. BENSCH. A jack-of-all-trades and still a master of some: Prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, v.90, p.2840–2849, 2009.
- HOLMES J. C.; PRICE P. Communities of parasites. In: *Community ecology: patterns and processes*. Anderson D.J. & Kikkawa J. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 187-213, 1986.
- HOLMES J. C. Parasitism and threats to biodiversity in shrinking ecosystems. *Biodiversity Conservation*, v.5, p.975-983, 1996.
- HUFF, C.G. Further infectivity experiments with mosquitoes and bird malaria. *Ibidem*, v.15, p.751-754, 1932.
- IEZHOVA, T. A.; VALKIUNAS, G.; BAIRLEIN, F. Vertebrate host specificity of two avian malaria parasites of the subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. *Journal of Parasitology*, v.91, p.472–474, 2005.

- JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected passerines. *Journal of Parasitology*, v.88, p.153-8, 2002.
- KETTLE, D. S. The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth and *Blanton*. *Bull. Entomology Research*, v.59, p.241–258, 1968.
- KEYMER, A. E.; ANDERSON, R. M. The dynamics of infection of *Tribolium confusum* by *Hymenolepis diminuta*: the influence of infective-stage density and spatial distribution. *Parasitology*, v.79, p. 195–207, 1979.
- KIRKPATRICK, E.; SUTHERS, H. B. Epizootiology of blood parasite infections in passerine birds from central New Jersey. *Canadian Journal of Zoology*, v.66, p.2374-2382, 1988.
- KIRKPATRICK, M.; RYAN, M. J. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*, v.350, p.33-38, 1991.
- KOTZE, D. J.; SAMWAYS, M. J. No general edge effects for invertebrates at Afrotropical forest/grassland ecotones. *Biodiversity Conservation*, v.10, p.443–466, 2001.
- KRIZANAUSKIENE A. et al. Variation in host specificity between species of avian haemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology*, v.92, p.1319-1324, 2006.
- LAFFERTY, K. D. Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on environment? *Parasitology Today*, v.13 p.251-255, 1997.
- LAFFERTY, K. D.; HOLT, R. D. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecological Letters*, v.6, p.654-664, 2003.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; HUMPHREY, P. S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the area de pesquisas ecológicas Guamá, Belém, Pará, Brasil. Proc. Nd. Int. Congres. Parasitol. In: *Journal of Parasitology*, v.56, p.197-198, 1970.
- LAVÉLAN, A. Les hématozoaires endoglobulaires (Haemocytozoa). *Cinquantenaire Soc. Biol.* pp. 124-133, 1899.
- LINLEY, J. R. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *Journal of Medical Entomology*, v.22, p.589-99. Review, 1985.
- LOYE, T. E.; CARROLL, S. P. Ectoparasite behavior and its effects on avian nest site selection. *Etological Society America*. v. 91, p.160-163, 1995.

- LYON, B. Enhanced Seasonal Rainfall in Northern Venezuela and the Extreme Events of December 1999. *Journal of Climate*, v.16, p.2302-2306, 2003.
- MARINI, M. A.; COUTO, D. Correlações ecológicas entre ectoparasitos e aves de florestas de Minas Gerais. In. Contribuições ao conhecimento ecológico do Cerrado. LEITE L.L. E SAITO C.H. Depto. de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, p.210-218, 1997.
- MARTINEZ, J., J. MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J. HERRERO et al. Restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: On the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology*, v.136, p.713–722, 2009.
- MARTINSEN, E. S.; BLUMBERG, B. J.; EISEN, R. J., et al. Avian hemosporidian parasites from northern California oak woodland and chaparral habitats. *Journal of Wildlife Disease*, v.44, p.260-8, 2008.
- MATTA, N. E.; BASTO, N.; GUTIERREZ, R. et al. Prevalence of blood parasites in Tyrannidae (Flycatchers) in the eastern plains of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, p.271-274, 2004.
- MCCALLUM, H.; DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Tree* v.10, p.190-194, 1995.
- MCCLURE, H.E., POONSWAD, P., GREINER, E.C., et al. *Haematozoa in the birds of Eastern and Southern Asia*. St. John's: Memorial University of Newfoundland, 1978.
- MCCURDY, D.G.; SHUTLER, D.; MULLIE, A.; FORBES, M.R. Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos*, v.82, p.303–312, 1998.
- MEDEIROS, R.C.S.; MARINI, M.Â. Biologia reprodutiva de *Elaenia chiriquensis* (Lawrence) (Aves, Tyrannidae) em Cerrado do Brasil Central. *Rev. Bras. Zool.* v. 24, 2007.
- MELLOR, P. S.; BOORMAN, J. & BAYLIS, M. Culicoides biting midge: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, v.45, p.307-340, 2000.
- MOLLER, A. P. Host–parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change. *Global Change Biology*, v.16, p.1158–1170, 2010.
- MURATA, K. Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, p.785–790, 2002.

- MYERS, N. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v.403 p.853-858, 2000.
- OMORI, S.; SATO, Y.; ISOBE, T. et al. Complete nucleotide sequences of the mitochondrial genomes of two avian malaria protozoa, *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium juxtannucleare*. *Parasitology Research*, v. 100, p. 661-664, 2007.
- OMUMBO, J. A.; HAY, S. I.; SNOW, R. W. et al. Modelling malaria risk in East Africa at high-spatial resolution. *Tropical Medicine and International Health*, v.10, p.557–566, 2005.
- PALINAUSKAS, V., VALKIUNAS, G., KRIZANAUSKIENE, A. et al. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone TM. *Experimental Parasitology*, v.123, p.134–139, 2009.
- PALINAUSKAS, V.; VALKIŪNAS, G.; BOLSHAKOV, C. V. et al. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): The effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*, v.127, p.527-533, 2011.
- PARAENSE, W. L. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. *Medicina Cirúrgica Farmácia*, v. 108, p.1-26, 1945.
- PATZ J. A. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspect.* v.112, p.1092-1098, 2000
- PEIRCE, M.A. Distribution and host–parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. *Ibidem*, v.15, p.419–458, 1981.
- PEIRCE, M. A.; AND ADLARD, R. D.. The haemoproteidae of the Culicidae. *Journal of Natural History*, v.39, p.2281–2287, 2005.
- PÉREZ-TRIS, J., HASSELQUIST, D., HELLGREN, O. What are malaria parasites? *Trends in Parasitology*, v.21, p.209–211, 2005.
- PÉREZ-TRIS, J.; BENSCH, S. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology*, v.131, p.15-23, 2005.
- PÉREZ-TRIS, J.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A. et al. Within-host speciation of malaria parasites. *PLoS One*, v. 2, p.1–7, 2007.

- PERKINS, S. L.; OSGOOD, S. M.; SCHALL, J. J. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria. Implications for epizootiology. *Molecular Ecology*, v.7, p. 1587-1590, 1998.
- PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology*, v.88, p.972-978, 2002.
- POULIN, R. Helminth growth in vertebrate hosts: does host sex matter? *International Journal for Parasitology*, v.26, p.1311-1315, 1996.
- POULIN, R., L. J. MARSHALL, AND H. G. SPENCER. Genetic variation and prevalence of blood parasites do not correlate among bird species. *Journal of Zoology of London*, v.252, p.381-388, 2000.
- PRUETT-JONES, S. G.; PRUETT-JONES, M. A.; JONES, H. I. Parasites and sexual selection in birds of paradise. *American Zoologist*, v.30, p.287-298, 1990.
- READ, A. F. Comparative evidence supports the Hamilton and Zuk hypothesis on parasites and sexual selection. *Nature*, v.328, p.68-70, 1987.
- READ, A. F.; TAYLOR, L. H. The ecology of genetically diverse infections. *Science*, v.292, p. 1099-1102, 2001.
- RIBEIRO, J. M. C; SEULU, F.; ABOSE, T. et al. Temporal and spatial distribution of anopheline mosquitos in an Ethiopian village: Implications for malaria control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, v.74, p.299-305, 1996.
- RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S. et al. Avian malaria in Brazilian passerini birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology*. v.130, p.261-267, 2005.
- RIBON, R. Fatores que influenciam a distribuição da avifauna em fragmentos de Mata Atlântica nas montanhas de Minas Gerais. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 90pp. 1998.
- RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I. et al. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology*, v.88, p.819-822, 2002.
- RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 269, p.885-892, 2002.

- RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology*, v.53, p.111-9, 2004.
- RICKLEFS, R. E., SWANSON, B.; FALLON, S. M., et al. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs*, v.75, p.543–559, 2005.
- RICKLEFS, R. E.; OUTLAW, D. C. A molecular clock for malaria parasites. *Science*, v.9, p.226-9, 2010.
- RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. The birds of South America: the Suboscines Passerines, vol 1. University of Texas Press. 1989.
- RIGBY, M. C.; MORET, Y. Life-history trade-offs with immune defenses. In: *Evolutionary biology of host-parasite relationships: theory meets reality*. Elsevier Science, B.V. Amsterdam, pp. 129-142. 2000.
- RODRÍGUEZ-FERRARO, A.; BLAKE, J. Diversity patterns of bird assemblages in arid zones of northern Venezuela. *Condor*, v.110, p.405-420, 2008.
- SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D.; SIMPSON, A. J. G. rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v.17, p.915-919, 1994.
- SARMIENTO, G. Ecological and floristic convergence between seasonal plant formation tropical and subtropical South America. *Journal Ecology*, v.60, p.367-410, 1972.
- SARMIENTO, G. Evolution of arid vegetation in tropical America. In: D.W. Goodall (Ed), *Evolution of desert biota*. University of Texas press, Austin, TX, p. 65-99, 1976.
- SAVAGE, A. F.; BERMINGHAM, E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology*, v.53, p.111–119, 2004.
- SAVAGE, A. F.; GREINER, E. C. Hematozoa of the avian family Brachypteraciidae (the ground-rollers). *Journal of Parasitology*, v.90, p.1468–1472, 2004.
- SCHALK, G.; FORBES, M. R. Male biases in parasitism of mammals: effects of study type, host age, and parasite taxon. *Oikos*, v.78, p.67–74. 1997.
- SCHALL, J. J.; MARGHOOB, A. B. Prevalence of malarial parasite over time and space: *Plasmodium mexicanum* in its vertebrate host, the western fence lizard *Sceloporus occidentalis*. *Animal Ecology*, v.64, p.177–185, 1995.
- SCHEUERLEIN, A., AND R. E. RICKLEFS. Prevalence of blood parasites in European

- passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, v.271, p.1363–1370, 2004.
- SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L. L. et al. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *Journal of Parasitology*, v.89, p.1025–1033, 2003.
- SCOTT, T. W.; EDMAN, J. D. Effects of avian host age and arbovirus infection on mosquito attraction and blood-feeding success. In: Loye JE, Zuk M, editors. *Bird parasite interactions*. Oxford University Press Oxford UK. pp. 179–204, 1991.
- SCOPEL, K. K. G., FONTES, C. J. F., NUNES, A. C. et al. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitemias in a Brazilian Amazon endemic area. *Malaria of Journal*, v.3, 2004.
- SEBAIO, F. Hemoparasitas em aves de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 64pp. 2002.
- SEBAIO, F.; BRAGA, E. M.; BRANQUINHO, F. et al. Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds: effects of fragment size and habitat dependency. *Bird Conservation International*, v.20, p.432-439, 2010.
- SEHGAL, R. N.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Blood parasites of some West African rainforest birds. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.67, p.295-301, 2005.
- SHURULINKOV, P.; GOLEMANSKY, V. Haemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of wild birds in Bulgaria. *Acta Protozoologica*, v.41, p.359–374, 2002.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro. Editora Nova Fronteira. 1997.
- SILVA, J. M. C. Avian inventory of Cerrado Region, South America: implications for biological conservation. *Bird Conservation International*, v.5, p.292-304, 1995.
- SILVA, J. M. C. Endemic birds species and conservation in the Cerrado region, South America. *Biodiversity and Conservation*, v.6, p.435-450, 1997.
- SMITH, T. B.; WAYNE, R. K.; GIRMAN, D. J. et al. A Role for Ecotones in Generating Rainforest Biodiversity. *Science*, v.276, p.1855-1857, 1997.
- SOL, D.; JOVANI, R.; TORRES, J. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*, v.135, p.542-7, 2003.

- SPENCER, K. A.; BUCHANAN, K. L.; LEITNER, S. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, v.272, p.2037–2043, 2005.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics*, v.22, p.2688–2690, 2006.
- SWINDELL, S.R., PLASTERER, T.N. SEQMAN. Contig assembly. *Methods in molecular and cellular biology*, v.70, p.75–89, 1997.
- TELFORD, S. R. Jr. A contribution to the systematics of the reptilian malaria parasites, family Plasmodiidae (Apicomplexa: Haemosporina). *Bulletin of the Florida State Museum Biological Sciences*, v. 34, p. 65-96, 1988.
- TELLA, J. L.; BLANCO, G.; FORERO, M. G. Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.96 p.1785–1789, 1999.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F. Clustal\_x Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids Research*, v.24, p.4876–4882, 1997.
- THOMSON, M. C.; MASON, S. J.; PHINDELA, T. Use of rainfall and sea surface temperature monitoring for malaria early warning in Botswana. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, p.214-21, 2005.
- TOCANTINS. Sistema Estadual de Planejamento e Meio Ambiente. Tocantins em dados. Palmas, TO, 1997.
- VALKIUNAS, G. Bird Haemosporida. *Acta Zoologica Lituanica*, (In Russian). V.3, p.1-607, 1997.
- VALKIUNAS, G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2005.
- VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A. et al. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology*, v.92, p.418-22, 2006.



- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENE, et al. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, v.94, p.1395–1401, 2008.
- VAN DER HOEK, W.; KONRADSEN, F.; AMERASINGHE, P. H. Towards a risk map of malaria for Sri Lanka: the importance of house location relative to vector breeding sites. *International journal of epidemiology*, v.32, p.280–285, 2003.
- VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L. et al. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monograph*, v.56, p. 327–344, 1986.
- VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C. T. T.; SEED, M. Plasmodia of Birds. *Parasitic Protozoa*, v.7, p.73-140, 1994.
- ZEHTINDJIEV, P. A.; ILIEVA, M. A.; WESTERDAHL, H. B. Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology*, v.119, p.99-110, 2008.
- WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S. et al. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, v.11, p. 1545-1554, 2002.
- WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D. et al. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology*, v.90, p.191–194, 2004.
- WEATHERHEAD, P.J.; BENNETT, G.F. Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology*, v.70, p.1–7, 1992.
- WEISS, R.A.; MCMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine*, v.10, p.70-76, 2004.
- WESTERDAHL, H.; WALDENSTRÖM, J.; HANSSON, B. et al. Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 272: 1511–1518, 2005.
- WINCHELL, E.J. Hematozoa of some birds of El Salvador. *Journal of Parasitology*, 64:558-559, 1978.
- WHITE, E. M.; GREINER, E. C.; BENNETT, G. F. et al. Distribution of the haematozoa of Neotropical birds. *Revista de biología tropical*, v.26, p.43-102, 1978.

- WILSON, K.; BJORNSTAD, O. N.; DOBSON, A. P. Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. In: *The Ecology of Wildlife Diseases* (eds Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP). Oxford University Press, Oxford, U.K., 2001.
- WOOD, M. J.; COSGROVE, C. L. The hitchhiker's guide to avian malaria. *Trends Ecol. Evol.*, v.21, p.5-7, 2006.
- WOOD, M. J., COSGROVE, C. L., WILKIN, T. A. Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology*, v.16, p.3263-3273, 2007.
- WOORDWORTH-LYNAS, C.B.; CAINES, J. R.; BENNET, G. F. Prevalence of avian haematozoa in São Paulo, Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, p.515-526, 1989.
- YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, v.3, p.32-35, 1950.
- YOUNG, B. E., M. C. GARVIN, AND D. B. MCDONALD. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, v.29, p.555-560, 1993.

**ANEXO 1:** Famílias e espécies de aves, indivíduos examinados e infectados por *Plasmodium spp./Haemoproteus spp.*, prevalência de infecção, status (migratório), habitat e guildas tróficas de aves capturadas no Parque Estadual do Cantão, Parque Estadual do Lajeado e área urbana de Palmas, estado do Tocantins.

**ANEXO 2:** Famílias e espécies de aves, indivíduos examinados e infectados por *Plasmodium spp./ Haemoproteus spp.*, prevalência de infecção de aves capturadas na região norte da Venezuela.

**ANEXO 3:** Alinhamento múltiplo entre as sequências de DNA do gene citocromo b de *Plasmodium e Haemoproteus* realizado a partir do programa Clustal X.

**ANEXO 4:** Artigo: Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. Nayara O. Belo, Renato T. Pinheiro, Elivania S. Reis, Robert E. Ricklefs, Erika M. Braga. PlosOne, Published March 8, 2011.

**ANEXO 5:** Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), número 205/2006.

## Anexo 1

Famílias/Espécies	N° de aves examinadas	N° de aves infectadas	Prevalência (%)	Status	Habitat*	Guilda trófica**
<b>Alcedinidae</b>	<b>3</b>	<b>1</b>				
<i>Chloroceryle aenea</i>	3	1	33,3	R	A	P
<b>Bucconidae</b>	<b>7</b>	<b>5</b>				
<i>Monasa nigrifrons</i>	4	2	50,0	R	F1	O
<i>Nystalus chacuru</i>	1	1	100,0	R	C1	O
<i>Nystalus maculatus</i>	2	2	100,0	R	C2	O
<b>Caprimulgidae</b>	<b>3</b>	<b>2</b>				
<i>Nyctidromus albicollis</i>	3	2	66,7	R	F2	I
<b>Cardinalidae</b>	<b>14</b>	<b>11</b>				
<i>Cyanocompsa cyanoides</i>	3	3	100,0	R	F1	O
<i>Saltator atricollis</i>	2	2	100,0	R	C2	O
<i>Saltator maximus</i>	9	6	66,7	R	F2	O
<b>Coerebidae</b>	<b>27</b>	<b>12</b>				
<i>Coereba flaveola</i>	27	12	44,5	R	F2	N
<b>Columbidae</b>	<b>3</b>	<b>2</b>				
<i>Columbina talpacoti</i>	2	1	50,0	R	C2	O
<i>Leptotila rufaxila</i>	1	1	100,0	R	F2	G
<b>Cuculidae</b>	<b>2</b>	<b>2</b>				
<i>Crotophaga ani</i>	2	2	100,0	R	C2	O
<b>Dendrocolaptidae</b>	<b>16</b>	<b>5</b>				
<i>Dendrocolaptes certhia</i>	1	1	100,0	R	F1	I
<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	1	0		R	F1	I
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	1	0		R	F1	O
<i>Dendroplex picus</i>	5	2	40,0	R	F2	I
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	2	0		R	C2	I
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	5	4	80,0	R	F1	I
<i>Xiphorhynchus obsoletus</i>	1	1	100,0	R	F2	I
<b>Emberizidae</b>	<b>43</b>	<b>23</b>				
<i>Ammodramus humeralis</i>	1	1	100,0	R	C1	O
<i>Arremon taciturnus</i>	2	1	50,0	R	F1	F
<i>Coryphospingus pileatus</i>	13	10	76,9	R	C2	O
<i>Sporophila angolensis</i>	1	1	100,0	R	C2	G
<i>Sporophila plumbea</i>	1	1	100,0	R	C1	G
<i>Volatinia jacarina</i>	25	9	36	R	C1	G

## Anexo 1

Famílias/Espécies	N° de aves examinadas	N° de aves infectadas	Prevalência (%)	Status	Habitat*	Guilda trófica**
<b>Fringilidae</b>	<b>5</b>	<b>1</b>				
<i>Euphonia chlorotica</i>	1	0		R	C2	O
<i>Euphonia violácea</i>	4	1	25,0	R	F2	G
<b>Furnariidae</b>	<b>3</b>	<b>0</b>				
<i>Xenops minutus</i>	1	0		R	F2	I
<i>Synallaxis albescens</i>	1	1	100,0	R	C1	O
<i>Synallaxis gujanensis</i>	1	0		R	F2	O
<b>Galbulidae</b>	<b>9</b>	<b>4</b>				
<i>Galbula ruficauda</i>	9	4	44,4	R	F2	I
<b>Hirundinidae</b>	<b>3</b>	<b>1</b>				
<i>Progne chalybea</i>	3	1	33,3	R	C2	O
<b>Icteridae</b>	<b>12</b>	<b>11</b>				
<i>Cacicus cela</i>	9	8	88,9	R	F1	O
<i>Gnorimopsar chopi</i>	3	3	100,0	R	C2	G
<b>Melanopareidae</b>	<b>1</b>	<b>0</b>				
<i>Melanopareia torquata</i>	1	0		R	C1	I
<b>Mimidae</b>	<b>2</b>	<b>0</b>				
<i>Mimus saturninus</i>	2	0		R	C1	O
<b>Parulidae</b>	<b>16</b>	<b>5</b>				
<i>Basileuterus culicivorus</i>	11	3	27,3	R	F1	I
<i>Basileuterus flaveolus</i>	3	1	33,4	R	F1	I
<i>Basileuterus hypoleucus</i>	2	0		R	F1	I
<b>Passeridae</b>	<b>1</b>	<b>1</b>				
<i>Passer domesticus</i>	1	1	100,0	R	C1	O
<b>Picidae</b>	<b>11</b>	<b>7</b>				
<i>Colaptes melanochloros</i>	1	1	100,0	R	C2	I
<i>Melanerpes candidus</i>	1	0		R	C2	O
<i>Picumnus albosquamatus</i>	9	6	66,7	R	F2	I
<b>Pipridae</b>	<b>136</b>	<b>69</b>				
<i>Machaeropterus pyrocephalus</i>	1	0		R	F1	F
<i>Manacus manacus</i>	21	14	61,5	R	F1	F
<i>Antilophia galeata</i>	2	2	100,0	R	F2	F
<i>Pipra fasciicauda</i>	112	54	48,0	R	F1	F
<b>Ramphastidae</b>	<b>1</b>	<b>0</b>				
<i>Pteroglossus inscriptus</i>	1	1	100,0	R	F2	O

## Anexo 1

Famílias/Espécies	N° de aves examinadas	N° de aves infectadas	Prevalência (%)	Status	Habitat*	Guilda trófica**
<b>Thamnophilidae</b>	<b>51</b>	<b>17</b>				
<i>Dysithamnus mentalis</i>	6	3	50,0	R	F1	I
<i>Formicivora grisea</i>	10	7	77,7	R	F2	I
<i>Formicivora rufa</i>	11	3	27,2	R	C2	I
<i>Hypocnemoides maculicauda</i>	6	2	33,3	R	F2	I
<i>Myrmotherula axillaris</i>	3	2	66,7	R	F1	I
<i>Myrmotherula multostriata</i>	2	1	50,0	R	F1	I
<i>Sakesphorus luctuosus</i>	3	2	66,7	R	F2	I
<i>Taraba major</i>	2	2	100,0	R	F2	I
<i>Thamnophilus amazonicus</i>	1	1	100,0	R	F1	O
<i>Thamnophilus doliatus</i>	1	0		R	F2	I
<i>Thamnophilus torquatus</i>	6	1	16,7	R	C2	I
<b>Thraupidae</b>	<b>56</b>	<b>36</b>				
<i>Cyanerpes cyaneus</i>	1	1	100,0	R	F1	F
<i>Dacnis cayana</i>	6	3	50,0	R	F2	F
<i>Hemithraupis guira</i>	3	3	100,0	R	F2	F
<i>Neothraupis fasciata</i>	1	1	100,0	R	C1	F
<i>Piranga flava</i>	1	0		R	C2	F
<i>Ramphocelus carbo</i>	12	9	75,0	R	F2	F
<i>Schistochlamys ruficapillus</i>	8	7	87,5	R	C2	O
<i>Tachyphonus cristatus</i>	4	3	75,0	R	F1	F
<i>Tachyphonus luctuosus</i>	1	1	100,0	R	F1	F
<i>Tachyphonus rufus</i>	5	3	60	R	F2	F
<i>Tangara cayana</i>	8	3	37,5	R	C2	F
<i>Thlypopsis sordida</i>	6	2	33,4	R	F2	F
<i>Thraupis sayaca</i>	2	0		R	C2	O
<i>Thraupis palmarum</i>	4	0		R	F2	F
<b>Tityridae</b>	<b>2</b>	<b>0</b>				
<i>Pachyramphus polychopterus</i>	2	0		R	F2	I
<b>Troglodytidae</b>	<b>18</b>	<b>6</b>				
<i>Cantorchilus leucotis</i>	6	5	83,0	R	F1	I
<i>Pheugopedius genibarbis</i>	10	1	10,0	R	F1	I
<i>Troglodytes musculus</i>	2	0		R	C1	O
<b>Trogonidae</b>	<b>1</b>	<b>1</b>				
<i>Trogon curucui</i>	1	1	100,0	R	F1	O
<b>Turdidae</b>	<b>23</b>	<b>16</b>				
<i>Turdus amaurochalinus</i>	1	0		M	C2	I
<i>Turdus leucomelas</i>	22	16	72,7	R	F2	O

## Anexo 1

Famílias/Espécies	N° de aves examinadas	N° de aves infectadas	Prevalência (%)	Status	Habitat*	Guilda trófica**
<b>Tyrannidae</b>	<b>190</b>	<b>55</b>				
<i>Camptostoma obsoletum</i>	5	1	20,0	R	F2	O
<i>Casiornis fuscus</i>	1	0			F2	I
<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	4	1	25,0	R	F1	O
<i>Corythopsis torquatus</i>	5	2	40,0	R	C1	I
<i>Elaenia chiriquensis</i>	28	14	50,0	M	C1	F
<i>Elaenia cristata</i>	27	11	40,7	M	C1	F
<i>Elaenia flavogaster</i>	8	3	37,5	R	C2	I
<i>Elaenia mesoleuca</i>	1	1	100,0	R	C2	F
<i>Elaenia parvirostris</i>	2	0		R	C1	F
<i>Elaenia spectabilis</i>	1	0		R	C2	F
<i>Empidonomus varius</i>	1	0		M	F2	I
<i>Euscarthmus meloryphus</i>	3	1	33,3	R	C1	I
<i>Euscarthmus rufomarginatus</i>	1	1	100,0	R	C1	O
<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i>	10	2	20,0	R	F2	I
<i>Hemitriccus striaticollis</i>	8	2	25,0	R	F1	I
<i>Inezia subflava</i>	1	0		R	F1	I
<i>Lathrotriccus eulerei</i>	6	1	16,7	R	F1	O
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	8	5	62,5	R	F1	I
<i>Megarynchus pitangá</i>	1	1	100,0	R	F2	O
<i>Mionectes oleaginous</i>	1	0		R	F1	I
<i>Myiarchus ferox</i>	3	1	33,3	M	F2	I
<i>Myiarchus swainsoni</i>	7	1	14,3	M	F2	I
<i>Myiarchus tuberculifer</i>	4	0		M	F2	I
<i>Myiopagis caniceps</i>	4	0		R	F1	I
<i>Myiopagis gaimardii</i>	10	7	54,5	R	F1	I
<i>Myiopagis viridicata</i>	6	1	16,7	R	F1	I
<i>Myiophobus fasciatus</i>	4	2	50,0	R	C2	O
<i>Myiozetetes cayanensis</i>	3	2	66,7	R	F2	I
<i>Phaeomyias murina</i>	8	2	25,0	R	F2	O
<i>Platyrinchus mystaceus</i>	3	1	33,3	R	F1	I
<i>Poecilotriccus fumifrons</i>	8	3	37,5	R	F1	I
<i>Ramphotrigon ruficauda</i>	1	1	100,0	R	F1	I
<i>Serpophaga subcristata</i>	2	1	50,0	R	C2	I
<i>Sublegatus modestus</i>	1	0		R	F1	I
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	2	1	50,0	R	F1	I
<i>Tolmomyias poliocephalus</i>	1	1	100,0	R	F1	I
<i>Tyrannus albogularis</i>	1	0		M	C2	I
<i>Tyrannus melancholicus</i>	2	1	50,0	M	C2	I

<b>Vireonidae</b>	<b>16</b>	<b>13</b>				
<i>Cyclarhis gujanensis</i>	4	3	75,0	R	F2	I
<i>Vireo olivaceus</i>	8	8	100,0	M	F2	I
<i>Hylophilus pectoralis</i>	4	2	50,0	R	F1	I

\*Habitat: F1 = espécies estritamente florestais, F2 = florestais que também usam áreas abertas, C1 = estritamente campestres, C2 = campestres que usam áreas florestais e A = aquáticas. \*\* Guildas tróficas: I = espécies preferencialmente insetívoras, F = frugívoras, N = nectarívoras, O = onívoras e G = granívoras, R= residente, M = status migratório (Silva, 1995 e 1997; Alves, 2007; CBRO, 2011)

## Anexo 2

<b>Famílias/Espécies</b>	<b>Número de aves examinadas</b>	<b>Número de aves Infectadas</b>	<b>Prevalência (%)</b>
<b>Cardinalidae</b>			
<i>Saltator orenocensis</i>	13	3	23
<b>Emberizidae</b>			
<i>Tiaris bicolor</i>	141	30	21,3
<b>Icteridae</b>			
<i>Icterus nigrogularis</i>	19	19	100
<i>Icterus icterus</i>	6	3	50
<b>Fringillidae</b>			
<i>Cardinalis phoeniceus</i>	80	59	73,8
<b>Furnariidae</b>			
<i>Synallaxis candei</i>	6	0	0
<i>Xiphorhynchus picus</i>	43	15	34,9
<b>Mimidae</b>			
<i>Mimus gilvus</i>	51	43	84,3
<b>Picidae</b>			
<i>Melanerpes rubricapillus</i>	15	11	73,3
<b>Psittacidae</b>			
<i>Amazona barbadensis</i>	20	0	0
<i>Aratinga pertinax</i>	11	8	72,7
<b>Thamnophilidae</b>			
<i>Formicivora intermedia</i>	4	1	25
<i>Sakesphorus canadensis</i>	7	5	71,4
<b>Thraupidae</b>			
<i>Coereba flaveola</i>	18	0	0
<i>Coryphospingus pileatus</i>	4	4	100
<i>Saltator coerulescens</i>	11	2	18,2
<i>Thraupis glaucocolpa</i>	11	5	45,5
<b>Throchilidae</b>			
<i>Leucippus fallax</i>	22	0	0
<b>Tyrannidae</b>			
<i>Elaenia parvirostris</i>	20	0	0
<i>Sublegatus arenarum</i>	25	8	32

Anexo 3

Toc15\_Plas GGACTTGTTTTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTTAGTGACCCAACACTAAAAAGATTT 60  
Toc28\_Plas -----  
Toc16\_Plas -----CTTGTAAGTGACCCAACCTTTAAAAAGATTT 30  
Toc32\_Plas -----GTGGATATCTTGTTAGTGACCCAACATTTAAAAAGATTC 38  
Toc4\_Plas GGACTTGTTTTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACCTTTAAAAAGATTC 60  
Toc24\_Plas -----ACATTTAAAAAGATTC 15  
Toc11\_Plas -----GGTGGATATCTTGTAAGTGATCCAACATTTAAAAAGATTT 39  
Toc9\_Plas GGTCTTGTCCTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTTAGTGATCCAACATTTAAAAAGATTT 60  
Toc14\_Plas GGTCTTGTCCTCATGGATCTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTTAAAAAGATTT 60  
Toc19\_Plas -----TTTCATGGATTTGTGGCGGATATCTTGTAAGTGATCCAACATTTAAAAAGATTT 53  
Toc21\_Plas -----TGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTTAAAAAGATTT 48  
Toc1\_Haem GGACTTGTTTTTCATGGATTTGCGGTGGATATAACAATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTC 60  
Toc7\_Haem -----GGATATAACAATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTC 36  
Toc2\_Haem GGACTTGTTTTTCATGGATTTGTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTC 60  
Toc5\_Haem -----GGATTTGTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTT 47  
Toc3\_Haem GGACTTGTTTTTCATGGATTTGTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTT 60  
Toc26\_Haem -----TGGATTTGTGGTGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTT 48  
Toc20\_Haem -----TTGTGGAGGATATACTATAAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTT 43  
Toc13\_Haem -----GGTGATATACTATAAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTT 39  
Toc22\_Haem GGTCTTATTACATGGATTTGTGGTGGATATAAATATTAGTGATCCTACTTTAAAAAGATTC 60  
Toc29\_Haem -GATTAGTCTCATGGATTTGTGGTGGATATACTTGTTAGTGACCCCTACCCTAAAAAGATTC 59

Toc15\_Plas TTTGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc28\_Plas -----TTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 35  
Toc16\_Plas TTTGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 90  
Toc32\_Plas TTTGTATTACACTTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 98  
Toc4\_Plas TTTGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc24\_Plas TTCGTATTACATTTTATATTTCCGTTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 75  
Toc11\_Plas TTTGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 99  
Toc9\_Plas TTTGTTTTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc14\_Plas TTTGTTTTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc19\_Plas TTTGTTTTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATAGTATTTATACATATATTC 113  
Toc21\_Plas TTCGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 108  
Toc1\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc7\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 96  
Toc2\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc5\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 107  
Toc3\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc26\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATTCATATATTC 108  
Toc20\_Haem TTTGTATTACACTTTTATATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 103  
Toc13\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 99  
Toc22\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTC 120  
Toc29\_Haem TTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTATATGTATAGTATTTATACATATATTC 119  
\* \* \* \* \*

Toc15\_Plas TTCTTACATTTACAAGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACGCTTTAAAAATACCC 180  
Toc28\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 95  
Toc16\_Plas TTCTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 150  
Toc32\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 158  
Toc4\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 180  
Toc24\_Plas TTTCTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 135  
Toc11\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 159  
Toc9\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 180  
Toc14\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 180  
Toc19\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 173  
Toc21\_Plas TTTTTACATTTACAAGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCC 168  
Toc1\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 180  
Toc7\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 156  
Toc2\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 180  
Toc5\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 167  
Toc3\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 180  
Toc26\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 168  
Toc20\_Haem TTCTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT 163



Toc13\_Haem TTTTACACTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACTGCTTTAAAAATACCT 159  
 Toc22\_Haem TTTTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACTGCTTTAAAAATACCT 180  
 Toc29\_Haem TTTCTACATTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCC 179  
 \*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

Toc15\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATAAAAAGGATTTAATAATATATTAGTCTTATTT 240  
 Toc28\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTCGATATTTAAAGGATTTAATAATATATTAGTATTATTT 155  
 Toc16\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTTTTATTT 210  
 Toc32\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGCCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTTTTATTT 218  
 Toc4\_Plas TTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTATTATTC 240  
 Toc24\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTTTTATTT 195  
 Toc11\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATATTTTAGTTTTATTT 219  
 Toc9\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATATCTAGTTTTATTT 240  
 Toc14\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATATCTTAGTTTTATTT 240  
 Toc19\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTTAAAGGATTTAATAATATCTTAGTCTTATTT 233  
 Toc21\_Plas TTCTATCCAAATCTATTAAGTCTCGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTATTATTT 228  
 Toc1\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 240  
 Toc7\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 216  
 Toc2\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 240  
 Toc5\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATAAAAAGGATTTAATAACGTATTAGTCTTATTT 227  
 Toc3\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 240  
 Toc26\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 228  
 Toc20\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 223  
 Toc13\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTT 219  
 Toc22\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGTCTAGATATTTAAAGGATTTAGTAAATATATTAGTATTATAC 240  
 Toc29\_Haem TTCTATCCAAAGTCTATTATGCCTAGATATTTAAAGGTTTTAATAACGTATTAGTATTATTC 239  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

Toc15\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCATAAACAGTA 300  
 Toc28\_Plas TTAGCACAAAGCTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCAATAACAGTA 215  
 Toc16\_Plas TTATCTCAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATCACATCCAGATAATGCAATCACAGTA 270  
 Toc32\_Plas TTATCTCAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATCTCATCCAGATAATGCAATAACAGTA 278  
 Toc4\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCATAACAGTA 300  
 Toc24\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAACGCAATTACAGTA 255  
 Toc11\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCAATTACAGTA 279  
 Toc9\_Plas TTAGCACAAAGCTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCAATTACAGTT 300  
 Toc14\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCCCATCCAGATAATGCAATTACAGTA 300  
 Toc19\_Plas TTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAACGCAATTACAGTA 293  
 Toc21\_Plas TTAGCTCAAAGTTTATTTGGAAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGCAATTACAGTA 288  
 Toc1\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGACATCCTGATAATGCAATTGTAGTA 300  
 Toc7\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGACATCCTGATAANGCAATTGTAGTA 276  
 Toc2\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCAATTGTAGTA 300  
 Toc5\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCAATTGTAGTA 287  
 Toc3\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCAATTGTAGTA 300  
 Toc26\_Haem CTAGCTCAAAGTTTATTTGGAAATTTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCTATTGTAGTA 288  
 Toc20\_Haem TTAGCTCAAAGTTTATTTGGTATTTACCATTATGCTCATCCAGATAATGCAATTGTAGTA 283  
 Toc13\_Haem CTAGCACAAAGTTTATTTGGTATTTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCAATTGTAGTA 279  
 Toc22\_Haem TTAGCTCAAAGTTTATTTGGTATATTACCATTATGCTCATCCTGATAATGCTATTGTAGTT 300  
 Toc29\_Haem TTAGCTCAAAGCTTATTTGGAAATATTACCATTATCTCATCCTGATAATGCTATTCCAGTA 299  
 \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\*

Toc15\_Plas GATAGATATGCTACACCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCA 360  
 Toc28\_Plas GATAGATATGCTACACCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCA 275  
 Toc16\_Plas GACAGATATGCAACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCA 330  
 Toc32\_Plas GATAGATATGCAACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCA 338  
 Toc4\_Plas GATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCT 360  
 Toc24\_Plas GATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTACTTCTTACCTTTTTATGCT 315  
 Toc11\_Plas GATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTACTTTTTACCTTTTTATGCT 339  
 Toc9\_Plas GATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCC 360  
 Toc14\_Plas GATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTACGCT 360  
 Toc19\_Plas GATAGATACGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCTTTTTATGCT 353  
 Toc21\_Plas GATAGATATGCTACACCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTACTTCTTACCTTTTTATGCA 348  
 Toc1\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCATTTTTATGCT 360  
 Toc7\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCATTTTTATGCT 336  
 Toc2\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTACTTTTTACCATTTTTATGCT 360  
 Toc5\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCATTTTTATGCT 347  
 Toc3\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTACCATTTTTATGCT 360

Toc26\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCCTGAATGGTATTTCTTACCTTTCTATGCT 348  
 Toc20\_Haem GATAGATATGTTACTCCTCTACATATTGTTCCCGAATGGTATTTCTTACCTTTTATGCT 343  
 Toc13\_Haem GATAGATATGTTACTCCTTTACATATTGTTCCCTGAATGGTATTTCTTACCTTTTATGCT 339  
 Toc22\_Haem GATAGATATGTTACTCCTCTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTATCTTTCTATGCT 360  
 Toc29\_Haem GATAGATATGCAACACCTTTACATATTGTTCCCTGAATGGTATTTCTTACCTTTTATGCT 359  
 \*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\* \* \*\* \*\* \*\*

Toc15\_Plas ATGTTAAAAACAATACCTAATAAAAACAGCAGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 420  
 Toc28\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCAGGTTTATTAGTTATGCTAGCATCATTACAA 335  
 Toc16\_Plas ATGTTAAAAACTATTCCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 390  
 Toc32\_Plas ATGTTAAAAACCATTCCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 398  
 Toc4\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCAGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 420  
 Toc24\_Plas ATGCTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 375  
 Toc11\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 399  
 Toc9\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 420  
 Toc14\_Plas ATGCTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 420  
 Toc19\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTCTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 413  
 Toc21\_Plas ATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCTGGTCTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 408  
 Toc1\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 420  
 Toc7\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 396  
 Toc2\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 420  
 Toc5\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 407  
 Toc3\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 420  
 Toc26\_Haem ATGTTAAAAACAATACCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCAT----- 400  
 Toc20\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATTGCTTCATTACAA 403  
 Toc13\_Haem ATGTTAAAAACAATACCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGATAGCATCATTACAA 399  
 Toc22\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTTTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 420  
 Toc29\_Haem ATGTTAAAAACAATTCCTAATAAAAACAGCTGGTCTATTAGTTATGTTAGCATCATTACAA 419  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

Toc15\_Plas ATTTTATTTTATTAGCAGAACAAAGAACTTAACCACTCTATCCAATTTAAATTTGCA 480  
 Toc28\_Plas ATCTTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAA----- 363  
 Toc16\_Plas ATATTATTTTACTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTTATCCAATTTAAATTTGCT 450  
 Toc32\_Plas ATATTATTTTACTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTCTAATACAATTTAAATTTGCT 458  
 Toc4\_Plas ATATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAACTTAACAACCTTATCCAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc24\_Plas ATACTATTTTATTAGCAGAACAAAGAACTTAACAACATTAATACAATTTAAATTTGCT 435  
 Toc11\_Plas ATATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTTATACAATTTAAATTTGCT 459  
 Toc9\_Plas ATACTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTTATACAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc14\_Plas ATATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAACTTAACCACTCTTATACAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc19\_Plas ATATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAACTTAACCACTCTTATACAATTTAAATTTGCT 473  
 Toc21\_Plas ATATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTATTA----- 451  
 Toc1\_Haem TTATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATCTAACAACCTTATACAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc7\_Haem TTATTATTTTATTAGCAGAACAAAAAATCTAACAACCTTATCCAATTTAAATTTGCT 456  
 Toc2\_Haem CTATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACATCATTATACAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc5\_Haem CTATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATCTAACATCATTATACAATTTAAATTTGCT 467  
 Toc3\_Haem TTATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATCTAACATCATTATACAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc26\_Haem -----  
 Toc20\_Haem TTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAATCTAACATCATTATACAATTTAAATTTGCT 463  
 Toc13\_Haem TTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACAACCTCTATACAATTTAAATTTGCT 459  
 Toc22\_Haem TTATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTATCATCTCTTATCCAATTTAAATTTGCT 480  
 Toc29\_Haem ATATTATTTTATTAGCAGAACAAAGAAATTTAACCACACTCATACAATTTAAATTTGCT 479

Toc15\_Plas TTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCAACAATCTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532  
 Toc28\_Plas -----  
 Toc16\_Plas TTTGGTGCTAGAGAATATTCGTTCTACTATCTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 502  
 Toc32\_Plas TTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTTCCTACTATCTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 510  
 Toc4\_Plas TTTGGTGCAAGAGAATATTCGTTCTACTATCTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532  
 Toc24\_Plas TTTGGTGTTAGAGAATATTCGTTCTATGATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 487  
 Toc11\_Plas TTTGGTGTTAGAGAATATTCGTTCTATGATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 511  
 Toc9\_Plas TTTGGTGTTAGAGAATATTCAGTTCCTATGATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532  
 Toc14\_Plas TTTGGTGTTAGAGAATATTCGTTCCAGTAAATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532  
 Toc19\_Plas TTCGGTGTTAGAGAATATTCGTTCTATGATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 525  
 Toc21\_Plas -----  
 Toc1\_Haem TTTGGTGCAAGAGAATATTCAGTACCTATTATTTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532  
 Toc7\_Haem TTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCTATTATTTGGTTTATATGT----- 501  
 Toc2\_Haem TTTGGTGCAAGAGAATATTCGTTACCTACAATCTGGTTTATATGTTTCATTCT----- 532

Toc5_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATATTCGTACCTACAATATGGTTTATATGTTTCATTCT-----	519
Toc3_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATATTCATACCTACTATTTGGTTTATATGTTTCATTCT-----	532
Toc26_Haem	-----	
Toc20_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATACTCTGTTCTACTATATGGTTTATATGTTTCATTCT-----	515
Toc13_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATACTCTATACCTACTATTTGGTTTATATGTTTCATTCT-----	511
Toc22_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATATTCGTACCTATGATTTGGTTTATATGTTTCATTTT-----	532
Toc29_Haem	TTTGGTGCAAGAGAATACTCATTACCTATTATTTGGTTTATATGTTTCATTCT-----	531