

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

DISSERTAÇÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PARASITOS DO
GÊNERO *Haemoproteus* EM AVES SELVAGENS DA MATA
ATLÂNTICA ALTIMONTANA E PADRONIZAÇÃO DE
UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO
ARMAZENADO EM CARTÕES FTA®**

Nelson Meireles da Silva

2023



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PARASITOS DO GÊNERO
Haemoproteus EM AVES SELVAGENS DA MATA ATLÂNTICA
ALTIMONTANA E PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE
EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE
ARMAZENADO EM CARTÕES FTA®**

NELSON MEIRELES DA SILVA

Sob a Orientação do Professor

Huarrisson Azevedo Santos

Sob a Coorientação do Professor

Carlos Luiz Massard

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção do
grau de **Mestre em Ciências
Veterinárias** no Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Novembro de 2023

Ficha catalográfica

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

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

S586d

Silva, Nelson Meireles da, 1992-
Diversidade genética de parasitos do gênero
Haemoproteus em aves selvagens da Mata Atlântica
almontana e padronização de um protocolo de extração
de DNA genômico a partir de sangue armazenado em
cartões FTA® / Nelson Meireles da Silva. - Rio de
Janeiro, 2023.
124 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2023.

1. Hemosporideo. 2. Avifauna. 3. Análise
filogenética. 4. Cyt-B. I. Azevedo Santos,
Huarrisson, 1980-, orient. II. Massard, Carlos Luiz ,
-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



ATA Nº 5107/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.073625/2023-18

Seropédica-RJ, 07 de novembro de 2023.

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

NELSON MEIRELES DA SILVA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/11/2023

(Assinado digitalmente em 08/11/2023 10:17)
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ####014#2

(Assinado digitalmente em 08/11/2023 11:48)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ####034#8

(Assinado digitalmente em 27/11/2023 13:21)
DANIEL DA SILVA GUEDES JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.757-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:
5107, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **07/11/2023** e o código de verificação: **17a145f73f**

A GRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Joana d'Arc, que tem o mesmo nome de uma guerreira francesa não é à toa. Não existem palavras capazes de expressar o quanto eu sou grato por tudo que fez. Obrigado por sempre me apoiar em todos os aspectos e sem você não teria conseguido chegar até aqui, essa conquista é nossa.

Agradeço a minha avó materna Maria (*in memoriam*) por todas as horas de conversas e transmissão de conhecimento, por continuar cuidando de mim.

Agradeço ao meu orientador Dr. Huarrisson Azevedo Santos, por ter me recebido de volta de braços abertos, por ter me proporcionado oportunidades de crescimento profissional, me possibilitando unir duas coisas que gosto bastante, parasitologia e animais silvestres. Por confiar em mim na execução deste trabalho.

Agradeço esta Universidade que me proporcionou muito mais que conhecimento científico, me forneceu oportunidade de crescimento pessoal e que eu encontrasse pessoas maravilhosas.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) por todos os momentos juntos, dentro e fora do laboratório, por toda ajuda. Sou grato a rede de apoio que acabamos criando. Agradeço também aos outros colegas da pós-graduação que foram parceiros dentro e fora do laboratório. E aos alunos de graduação que também marcaram presença durante minha trajetória.

Agradeço a Deus por ter me dado força para seguir em frente, por mostrar que apesar das adversidades, eu sou capaz de realizar meus sonhos.

Por último, mas não menos importante, agradeço as aves que foram utilizadas nesse projeto. Já que sem as mesmas este trabalho não teria sido desenvolvido. Obrigado por nos ensinar a fazer ciência respeitando os limites da natureza.

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

BIOGRAFIA

Nelson Meireles da Silva, filho de Joana d'Arc Correia de Meireles e Nelson Ubirajara da Silva. Nascido no dia 03 de setembro de 1992 na cidade do Rio de Janeiro.

Cresceu e estudou em São João de Meriti, região metropolitana do Rio de Janeiro, oriundo de escola pública, ingressou no curso de Medicina Veterinária no ano de 2011. Por volta do seu terceiro semestre entrou para o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da mesma universidade e sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Massard foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq. Em 2014 teve a oportunidade de fazer parte do programa Ciências sem Fronteiras na Hungria, onde viveu por três semestres, sendo 1 desses para realização de curso de inglês e húngaro. Os outros dois teve a oportunidade de estudar na Universidade de Medicina Veterinária de Budapeste (*Állatorvostudományi Egyetem*). Após regresso do intercâmbio, fez parte do programa de iniciação científica voluntária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, agora sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos. Durante a graduação fez parte da organização do grupo de estudos de animais silvestres (LIAS). Realizou estágio supervisionado no setor de Medicina de Animais Selvagens (SMAS) do Hospital Veterinário da UFRRJ, sob orientação do professor Dr. Daniel de Almeida Balthazar.

Em setembro de 2021 ingressou no mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos, com defesa em novembro de 2023.

*« On ne voit bien qu'avec le cœur.
L'essentiel est invisible pour les yeux. »*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

SILVA, Nelson Meireles. **Diversidade genética de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves selvagens da Mata Atlântica altimontana e padronização de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue armazenado em cartões FTA®.** 2023. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade do mundo e abriga uma variedade impressionante de aves silvestres. Os parasitos pertencentes ao gênero *Haemoproteus* são classificados na família Haemoproteidae e têm como vetores insetos hematófagos das famílias Ceratopogonidae e Hippoboscidae. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de parasitos do gênero *Haemoproteus* no bioma Mata Atlântica, nos Parques Nacionais do Caparaó (MG), de Itatiaia e da Serra dos Órgãos (RJ), entre 700 e 2500 metros de altitude. Dentre as 586 aves amostradas, 94 foram positivas para *Plasmodium/Haemoproteus*, sendo obtida uma prevalência geral de 16,04% (n=94/586). Na análise filogenética as sequências obtidas (38) neste estudo agruparam-se em 6 clados bem suportados. O clado A foi composto por 10 amostras que se agruparam em clado exclusivo, tendo como grupo irmão *Haemoproteus erythrogravidus*. No clado B, quatro amostras se agruparam no grupo de *Haemoproteus erythrogravidus*. No clado C, quatro amostras formaram um grupo exclusivo, tendo como grupo irmão *Haemoproteus zosteropis*. Um total de 13 amostras se agruparam no clado de *Haemoproteus nucleocentralis* (clado D), 5 amostras no clado de *Haemoproteus paraortalidum* (clado E). As linhagens agrupadas no clado B só foram encontradas em *Zonotrichia capensis*. O clado C foi encontrado somente a 1500 metros de altitude. Com relação aos locais amostrados, *H. erythrogravidus* só foi encontrado no PN do Caparaó. E não houve ocorrência de *Haemoproteus paraortalidum* no PN da Serra dos Órgãos. Uma prevalência e diversidade genética relativamente alta em aves silvestres foi observada na região estudada. Através dos resultados obtidos neste estudo, enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade global de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves endêmicas de diferentes espécies que ocorrem em áreas altimontanas da Mata Atlântica do Brasil. A seleção de um método de extração de DNA ideal deve levar em conta fatores como sensibilidade, consistência, rapidez e facilidade de execução. A literatura carece de evidências suficientes para apoiar a escolha de um método específico para extrair DNA de amostras de sangue total de aves. O objetivo deste trabalho foi padronizar um método de extração de DNA genômico a partir de sangue de ave selvagem coletado em FTA® Card. Foram testados 5 protocolos, entre eles: o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot e Fenol-Clorofórmio. Foi realizada a quantificação por espectrofotometria e fluorimetria, análise da pureza por espectrofotometria, teste de inibição por qPCR e integridade pela eletroforese em gel de agarose. As amostras extraídas através do protocolo do Kit Comercial “PureLink Genomic DNA Mini” apresentaram características visivelmente melhores quanto aos parâmetros avaliados comparada com as demais, obtendo então melhor resultado e maior eficiência. No teste de inibição houve um destaque para o kit da Invitrogen e para o método de Salting out que apresentam média de Cq mais baixas (p-valor 0,0568), contudo o kit apresentou valor mais baixo de desvio padrão. Este estudo fornece base científica para a extração de DNA genômico de alta qualidade a partir de quantidades pequenas de sangue, quando as amostras são armazenadas em cartões FTA®. Isso é particularmente benéfico para a pesquisa com aves, dada a grande variação de tamanhos e pesos entre as espécies. Conclui-se que a padronização de protocolos desempenha um papel fundamental na biologia molecular, uma vez que a extração eficiente de material genético é essencial para o sucesso das análises subsequentes.

Palavras-chave: Hemosporídeos; *cyt-b*; avifauna; análise filogenética

ABSTRACT

SILVA, Nelson Meireles. **Genetic diversity of parasites of the genus *Haemoproteus* in wild birds from the high-altitude Atlantic Forest and standardization of a protocol for genomic DNA extraction from blood stored on FTA® cards.** 122p. 2023. Thesis (Master's degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The Atlantic Forest is one of the richest biomes in biodiversity in the world and is home to an impressive variety of wild birds. parasites belonging to the genus *Haemoproteus* are classified in the family Haemoproteidae and have as vectors hematophagous insects from the families Ceratopogonidae and Hippoboscidae. the objective of this study was to evaluate the genetic diversity of parasites of the genus *Haemoproteus* in the Atlantic Forest biome, in the Caparaó (MG), Itatiaia and Serra dos Órgãos (RJ) national parks, between 700 and 2500 meters of altitude. among the 586 birds sampled, 94 were positive for *plasmodium/Haemoproteus*, obtaining an overall prevalence of 16.04% (n=94/586). in the phylogenetic analysis, the sequences obtained in this study were grouped into 6 well-supported clades. clade a was composed of 10 samples that were grouped into an exclusive clade, with *Haemoproteus erythrogravidus* as its sister group. in clade b, four samples grouped into the *Haemoproteus erythrogravidus* group. in clade c, four samples formed an exclusive group, with *Haemoproteus zosteropis* as the sister group. a total of 13 samples grouped into the *Haemoproteus nucleocentralis* clade (clade d), 5 samples into the *Haemoproteus paraortalidum* clade (clade e). the lineages grouped in clade b were only found in *Zonotrichia capensis*. clade c was only found at 1500 meters altitude. regarding the locations sampled, *h. erythrogravidus* was only found in the Caparaó NP. and there was no occurrence of *Haemoproteus paraortalidum* in the serra dos Órgãos NP. a relatively high prevalence and genetic diversity in wild birds was observed in the studied region. through the results obtained in this study, we enriched knowledge about the global diversity of parasites of the genus *Haemoproteus* in endemic birds of different species that occur in highland areas of the Atlantic Forest of Brazil. The selection of an ideal DNA extraction method must take into account factors such as sensitivity, consistency, speed and ease of execution. the literature lacks sufficient evidence to support the choice of a specific method to extract DNA from avian whole blood samples. the objective of this work was to standardize a genomic DNA extraction method. five protocols were tested, including the Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), Purelink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot and Phenolchloroform. and the quantification and verification of the quality of the extracted genetic material was carried out. the samples extracted from the "Purelink Genomic DNA Mini" commercial kit showed visibly better characteristics in terms of the evaluated parameters compared to the others, obtaining better results and greater efficiency. in the inhibition test, the Invitrogen kit and the salting out method stood out, which presented lower mean cq (p-value 0.0568), however the kit presented a lower standard deviation value. this study provides a scientific basis for extracting high-quality genomic DNA from quantities as small as blood when samples are stored on FTA® cards. this is particularly beneficial for bird research, given the wide variation in sizes and weights between species. it is concluded that the standardization of protocols plays a fundamental role in molecular biology, since the efficient extraction of genetic material is essential for the success of subsequent analyses.

Keywords: Haemosporidian; cytB; birdlife; phylogenetic analysis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das linhagens de Haemoproteus nos locais de coleta	38
Tabela 2: Quantificação e frações de pureza do Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen®)	63
Tabela 3: Quantificação e frações de pureza do Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)	64
Tabela 4: Quantificação do protocolo HotShot pelo Qubit 2.0	65
Tabela 5: Quantificação e frações de pureza do protocolo de Salting out	66
Tabela 6: Quantificação e frações de pureza do protocolo de Fenol-Clorofórmio	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Haemoproteus</i> em aves	9
Figura 2: Mapas de localização das áreas de coleta	24
Figura 3: Transectos de redes de neblina montados	25
Figura 4: Retirada de aves da rede de neblina e saquinho para transporte seguro dos animais	25
Figura 5: Coleta de sangue através da punção da veia braquial para confecção de esfregaço e armazenagem em cartões FTA®	26
Figura 6: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no presente estudo.	30
Figura 7: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no presente estudo	31
Figura 8: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no presente estudo	31
Figura 9: Resultado da nPCR das amostram negativas na qPCR e positivas na lâmina	32
Figura 10: Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 479 pb do gene mitocondrial <i>cytb</i> entre diferentes linhagens <i>Haemoproteus</i> spp.	34
Figura 11: Reconstrução filogenética baseada em um dataset com 477 pares de base da sequência do gene Citocromo b (<i>cytb</i>) de espécies do gênero <i>Haemoproteus</i> .	35
Figura 12: Estratificação altitudinal das linhagens de <i>Haemoproteus</i> spp. encontradas em aves selvagens nos Parques Nacionais de Itatiaia, a Serra dos Órgãos e Caparaó da mata atlântica dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais.	37
Figura 13: Ilustração do fluxo de atividades feitos para se realizar a padronização	52
Figura 14: Gel de agarose das bandas de DNA. A – Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen (A) e o PureLink® Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen (B).	68
Figura 15: Gel de agarose das bandas de DNA. A – Protocolo HotShot; B – Protocolo Salting out.	69
Figura 16: Gel de agarose do protocolo de Fenol-clorofórmio	70
Figura 17: Valores médios do Ciclo de Quantificação (Cq) obtidos a partir da PCR em tempo real com DNA exógeno de <i>Ehrlichia canis</i> e amostras de DNA de ave obtidos pelos métodos de extração Hotshot, Fenol-clorofórmio, Qiagen, Invitrogen e Salting Out.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

PCR- Reação em cadeia da polimerase

nPCR – *Nested* PCR

qPCR- PCR em tempo real

DNA- Ácido desoxirribonucleico

μ M- Micromolar

ML- Mililitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Mata Atlântica	3
2.2 Ordem Passeriformes	4
2.3 Hemosporídeos	4
2.3.1 Gênero <i>Haemoproteus</i>	7
2.3.2 Ciclo biológico de <i>Haemoproteus</i>	8
2.3.3 Diversidade genética e deteção de <i>Haemoproteus</i>	9
2.4 Cartões FTA	11
2.5 Extração de DNA	11
2.5.1 Kit DNeasy Blood and Tissue® (Qiagen)	13
2.5.2 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)	13
2.5.3 Fenol-Clorofórmio	13
2.5.4 Salting out	14
2.5.5 HotShot	14
2.6 Falta de padronização	14
CAPÍTULO I	
3. DIVERSIDADE GENÉTICA DE PARASITOS DO GÊNERO <i>Haemoproteus</i> EM AVES SELVAGENS DA MATA ATLÂNTICA ALTIMONTANA	16
3.1 INTRODUÇÃO	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.2.1 Autorização para coleta de material biológico	21
3.2.2 Locais de amostragem	21
3.2.2.1 Parque Nacional do Caparaó	21
3.2.2.2 Parque Nacional do Itatiaia	22
3.2.2.3 Parque Nacional da Serra dos Órgãos	22
3.2.3 Tamanho da amostra de aves	24
3.2.4 Coleta e acondicionamento das amostras	24
3.2.5 Detecção através do método de esfregaço sanguíneo	26
3.2.6 Extração do DNA genômico	27
3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)	27
3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR)	27
3.2.9 Purificação das amostras	28
3.2.10 Sequenciamento de um fragmento do gene <i>cyt-b</i>	28

3.2.11 Análises filogenéticas	29
3.3 RESULTADOS	30
3.3.1 Análises dos esfregaços sanguíneos	31
3.3.2 Análise por qPCR	31
3.3.3 Análise por nPCR	32
3.3.4 Análise filogenética de <i>Haemoproteus</i> sp.	32
3.4 DISCUSSÃO	39
3.5 CONCLUSÃO	45
Capítulo II	46
4. PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE ARMAZENADO EM CARTÕES FTA®	
46	
4.1 INTRODUÇÃO	49
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.2.1 Autorização para coleta de material biológico	51
4.2.2 Amostragem	51
4.2.3 Processamento inicial	52
4.2.4 Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)	52
4.2.5 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)	53
4.2.6 Salting Out	54
4.2.7 HotSHOT	54
4.2.8 Fenol-Clorofórmio	54
4.2.9 Quantificação e avaliação de qualidade das amostras	55
4.2.10 Eletroforese em gel de agarose	55
4.2.11 Teste de inibição através da qPCR	56
4.2.11.1 Criação do controle positivo de <i>B. vogeli</i>	56
4.2.11.2 Obtenção da amostra positiva para <i>B. vogeli</i> .	56
4.2.11.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	57
4.2.11.4 Amplificação do gene de interesse	57
4.2.11.5 Avaliação e purificação do produto amplificado	57
4.2.11.6 Clonagem em vetor plasmidial	58
4.2.11.7 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> DH5-alfa	58
4.2.11.8 Preparo do meio sólido e incubação	59
4.2.11.9 Seleção	59
4.2.11.10 Extração de DNA plasmidial e confirmação através de cPCR	59
4.2.11.11 Quantificação do DNA plasmidial	60

4.2.11.12 Linearização do plasmídeo	60
4.2.11.13 Teste de sensibilidade dos iniciadores	60
4.2.12 Análise estatística	60
4.3 RESULTADOS	61
4.3.1 Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)	61
4.3.2 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)	61
4.3.3 HotSHOT	62
4.3.4 Salting Out	62
4.3.5 Fenol-Clorofórmio	62
4.3.6 Eletroforese	68
4.3.7 Análise estatística	70
4.3.8 Teste de inibição	71
4.4 DISCUSSÃO	74
4.5 CONCLUSÃO	78
5. CONCLUSÃO GERAL	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
7. ANEXOS	100
Anexo A - Lista de espécies amostradas	101
Anexo B - Árvore filogenética com clados estratificados	105

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa quase metade do território da América Latina e é o país com maior biodiversidade de fauna e flora (RENCTAS, 2017), muitas destas espécies são endêmicas do nosso país, não sendo encontradas em nenhuma outra região. Devido a sua grande extensão territorial, o Brasil abriga diferentes zonas climáticas e isso favorece a formação de biomas com características bastante distintas. De acordo com o IBGE o Brasil abriga seis tipos de biomas: *Amazônia; Mata Atlântica; Cerrado; Caatinga; Pampa; e Pantanal*. Sendo o bioma Mata Atlântica responsável por ocupar aproximadamente 8% do território latino-americano e em torno de 13% do território nacional, sendo que este é o bioma com maior índice de degradação. Neste bioma, é estimado que haja ocorrência de 893 espécies de aves, sendo 215 endêmicas (MMA, 2018). A elevação do relevo em algumas áreas da Mata Atlântica é um dos fatores que influencia na heterogeneidade e endemismo de espécies de aves neste bioma (CHAVES, 2015). E este bioma abriga seis dos dez pontos mais altos do território nacional (IBGE, 2018), localizados mais especificamente nas regiões da Mantiqueira, Serra do Caparaó e Serra do Mar, destacando-se Itatiaia com 2791 metros acima do nível do mar. Essa variação de altitude fornece condições climáticas singulares a essas regiões quando comparadas às regiões de baixada, áreas mais altas apresentam maior amplitude térmica, limitação hídrica e maiores chances de isolamento geográfico. Todos esses fatores citados propiciam adaptações das espécies ali presentes, às variações ambientais. Sendo assim, se faz possível a aplicação da teoria de biogeografia de ilhas, na qual os processos de diversificação das espécies que habitam as montanhas da Mata Atlântica se dão de maneira similar aos que ocorrem nas ilhas oceânicas (MACARTHUR & WILSON, 1967). Existem diversos estudos que comprovam essa teoria em vários organismos e pode ser testada para os parasitos (KITAYAMA, 1996; BARBARÁ, 2007; POREMBSKI, 1998, VASCONCELOS, 2010, PRATES, 2017). Contudo, a diversidade de hemosporídeos nas áreas altimontanas da Mata Atlântica ainda segue insuficientemente conhecida. Os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, são os principais hemosporídeos aviários, protozoários heteróxenos obrigatórios que possuem o ciclo biológico bastante complexo. Que envolve parte do ciclo no hospedeiro vertebrado e parte dele no hospedeiro invertebrado. (ATKINSON; VAN RIPPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005). Esses parasitos possuem ampla distribuição geográfica e podem provocar diferentes efeitos deletérios em aves

silvestres (VALKIŪNAS, 2005). Os hemosporídeos são transmitidos por meio de vetores artrópodes da ordem Diptera (Arthropoda: Insecta: Diptera) (VALKIŪNAS, 2005). O gênero *Plasmodium*, agente da malária aviária, é transmitido por mosquitos da família Culicidae. O gênero *Haemoproteus* se divide em dois subgêneros, *Haemoproteus*, transmitido por moscas da família Hippoboscidae (VALKIŪNAS, 2005). O gênero *Leucocytozoon* é transmitido por moscas Culicoides e por espécies de família Simuliidae.

Grande parte do conhecimento sobre os aspectos clínicos em aves silvestres ainda é bastante ínfero quando comparado com os observados em aves domésticas (VALKIŪNAS, 2005), por este motivo se faz necessário aumentar as áreas amostradas e a diversidade de aves, a fim de tentar criar um panorama mais fidedigno sobre a distribuição dos hemosporídeos e além disso, gerar conhecimento acerca da diversidade genética desses hemoparasitos.

O diagnóstico molecular se tornou bastante popular nos últimos anos, e para garantir melhor eficiência do diagnóstico, uma etapa de extrema importância é a extração de DNA. Que precisa estar padronizada para extrair e aproveitar as amostras das mais diversas origens, tendo como resultado um DNA íntegro, de boa qualidade. Sendo assim, se faz necessário conhecer qual é o protocolo de extração que melhor se adequa.

Nas aves, tem-se uma dificuldade a mais na coleta de sangue, devido ao seu pequeno porte e, por consequência, menor volume sanguíneo. A quantidade de sangue a se coletar depende diretamente do tamanho e peso do animal, bem como do estado de saúde geral deste (LUMEIJ, 1997). Para a maioria das espécies de aves, é considerado seguro realizar a coleta de sangue correspondente a aproximadamente 1% ou 2% do peso corporal (CAMPBELL; ELLIS, 2007).

Quase a totalidade dos protocolos disponíveis para extração do DNA a partir de sangue busca maior rapidez do processo com menores custos, por exemplo: extração de DNA com fenol (ISOLA et al., 1994); extração com partículas de sílica (BOOM et al., 1990); extração com sílica associada à digestão enzimática (MESQUITA et al., 2001); extração com fenol e clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989); extração alcalina (RUDBECK et al., 1998); e os protocolos sugeridos por fabricantes de kits comerciais de extração. Estes últimos (kits comerciais) apresentam os maiores custos por amostra, mas têm maior praticidade na obtenção de amostras de qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade do mundo e abriga uma variedade impressionante de aves silvestres. Sua distribuição geográfica compreende uma amplitude latitudinal desde as proximidades da Linha do Equador (3°S) até áreas subtropicais (30°S). Ela engloba uma extensão aproximada de 3.300 quilômetros, abrangendo uma superfície territorial de cerca de 1.450.000 quilômetros quadrados. A região em questão predomina principalmente no território brasileiro, com inclusões em zonas territoriais da Argentina e do Paraguai, conforme reportado por (SILVA et al, 2004 em 2004; JOLY et al, 2014). O bioma Mata Atlântica ocupa aproximadamente 13% do território nacional e é o mais ameaçado. Neste bioma, é estimado que haja ocorrência de 893 espécies de aves, sendo 215 endêmicas (CRBO, 2021; MMA, 2018). Dessa forma, a Mata Atlântica é reconhecida como um dos 35 hotspots globais para a preservação, (MYERS, 2000; MITTERMEIER, 2011). A notável diversidade de espécies encontrada nesse ecossistema florestal e a elevada incidência de endemismos são impressionantes mesmo quando contrastadas com a maioria das demais florestas tropicais em escala mundial (MITTERMEIER et al, 2005). A fragmentação e a perda de habitat surgem como desafios significativos que representam ameaças substanciais à biodiversidade (PÜTTKER, 2020).

A elevação do relevo em algumas áreas da Mata Atlântica é um dos fatores que influencia na heterogeneidade e endemismo de espécies de aves neste bioma (CHAVES, 2015). E este bioma abriga seis dos dez pontos mais altos do território nacional (IBGE, 2018), localizados mais especificamente nas regiões da Mantiqueira, Serra do Caparaó e Serra do Mar, destacando-se Itatiaia com 2791 metros acima do nível do mar. Os mecanismos subjacentes à diversificação das espécies nas regiões montanhosas da Mata Atlântica assemelham-se aos processos observados em ilhas oceânicas. Nesse contexto, o isolamento geográfico provocado pelas formações montanhosas resulta em limitações na troca genética e, consequentemente, em diferenciações entre as populações dos organismos que se encontram isolados. Tal perspectiva encontra respaldo em estudos como os de MacArthur e Wilson (1967), Kitayama (1996), Barbará (2007), Porembski (1998), Vasconcelos (2010) e Prates (2017). Alguns estudos resultados destacam as mudanças na diversidade de aves em diferentes altitudes e fornecem insights sobre os

fatores que influenciam a distribuição das espécies (BORGES, 2020; SANTOS, 2019; MARINI, 2017; VASCONCELOS, 2016; BERGALLO, 2015).

2.2 Ordem Passeriformes

De acordo com Lima (2013), mais da metade das espécies mapeadas da mata atlântica pertence à ordem dos Passeriformes, os populares passarinhos, grupo que reúne 55% das formas conhecidas de aves do planeta. De acordo o autor, existem aproximadamente 476 espécies de pássaros no bioma. Encontram-se entre os membros dessa ordem aves de dimensões pequenas e médias. Composta principalmente por espécies canoras, de porte pequeno e que se alimentam principalmente de sementes, frutos e pequenos invertebrados, ocupando diversos tipos de ambientes e apresentando comportamentos distintos. (BEJČEK & ŠTASTNÝ, 2002). As menores representantes desta ordem são da família Tyrannidae, tendo peso médio de 4 a 5 gramas e medindo cerca de 6,5 a 9,8cm de comprimento total. As espécies pertencentes à subordem Tyranni, em sua maioria, manifestam uma tendência ecológica voltada para habitats florestais e arborícolas, demonstrando uma preferência alimentar insetívora. Em contraste, as espécies que compõem a subordem Passeri predominam em ambientes abertos, embora haja uma diversidade de representantes florestais no grupo (OLIVEIRA, 2018). Adicionalmente, os demonstram uma dieta mais variada, com muitas espécies se alimentando exclusivamente de frutos e sementes (RICKLEFS, 2002)

2.3 Hemosporídeos

Os hemosporídeos, pertencentes ao grupo Apicomplexa e à ordem Haemosporida, são protozoários parasitos cujo ciclo biológico envolve, parcialmente, células sanguíneas e tecidos de hospedeiros vertebrados (fase assexuada), incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos, e, parcialmente, tecidos de hospedeiros invertebrados (fase sexuada) - dípteros hematófagos - que atuam como vetores (GARNHAM, 1966; PERKINS, 2014). Os membros dessa ordem compartilham características comuns, tais como o ciclo biológico heteroxeno, no qual a esquizogonia ocorre no hospedeiro vertebrado e a gametogonia/esporogonia ocorre no vetor; a presença de macrogametócitos e microgametócitos, que se desenvolvem de maneira independente nas células do hospedeiro vertebrado; a presença de oocineto ou zigoto móvel no hospedeiro

invertebrado; e esporozoítos sem membrana celular no hospedeiro invertebrado (GARNHAM, 1966; REMPLE, 2004; VALKIŪNAS, 2005).

Com base nessas características, juntamente com outras particularidades específicas de cada táxon dentro desse grupo, a classificação sistemática atual categoriza os hemosporídeos aviários em três principais famílias: Plasmodiidae, Haemoproteidae e Leucocytozoidae. Essas famílias incluem, respectivamente, quatro gêneros que infectam aves: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Fallisia* e *Leucocytozoon*. Os hemosporídeos aviários podem ser classificados de acordo com essa taxonomia (VALKIŪNAS, ATKINSON, 2020).

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)

Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família: Haemoproteidae (Doflein, 1916)

Gênero: *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Subgênero: *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Subgênero: *Parahaemoproteus* (Bennett,
Garnham & Fallis, 1965)

Família: Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gênero: *Plasmodium* (Marchiafava e Celli, 1885)

Família: Leucocytozoidae (Fallis & Bennett, 1961)

Gênero: *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

A taxonomia dos hemosporídeos, em seus mais de 100 anos de história, levou em conta somente a utilização caracteres morfológicos baseados no conceito da similaridade morfológica para a identificação e delimitação das espécies do grupo (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Nesse contexto, os caracteres dos parasitos observados em esfregaços sanguíneos sob microscopia como: a presença de merontes e quando presentes

o número de merozoítos nos merontes; o tamanho e a forma dos gametócitos; a presença ou ausência de pigmento de hemozoína; o tipo de célula hospedeira infectada; as alterações causadas pelo parasito nas células infectadas somados a espécie de hospedeiro infectado e a região de registro do parasito, serviram de parâmetro para a descrição das espécies de hemosporídeos e guiaram a classificação taxonômica do grupo durante grande parte da sua história (GARNHAM, 1966; PERKINS et al., 2000; VALKIŪNAS, 2005; SÁ, 2011). Contudo, o aumento de publicações de novas espécies baseadas em similaridade morfológica e principalmente com base nos hospedeiros e locais-tipo resultou com o passar dos anos em uma superestimação da diversidade dos hemosporídeos e uma taxonomia conflituosa e repleta de espécies inválidas gerando problemas de identificação durante mais de um século (PERKINS et al., 2000; VALKIUNAS, 2005). O salto na sistemática do grupo tem início com a implementação, domínio e popularização das técnicas de PCR e sequenciamento genético entre os pesquisadores da área (HELGREEN et al., 2004; BRAGA et al., 2011). A partir destas técnicas novas informações taxonômicas passaram a ser obtidas a partir do sequenciamento genético de várias espécies de hemosporídeos e começaram a revelar diferenças entre as espécies parasitos (BENSCH et al., 2004).

A implementação das técnicas de PCR, sequenciamento genético e reconstrução filogenética associadas a padronização das sequências de hemosporídeos produzidas, trouxe avanço para a taxonomia do grupo (BENSCH, et al., 2004; et al., 2009; HELGREEN et al., 2004;). Problemas como homônimas, sinonímias e *iserta sedis* foram resolvidos gerando a reclassificação de muitos táxons de Haemosporida tanto à nível de espécie quanto à nível de Família (VALKIUNAS, 2005; e IEZHIVA, 2018; et al., 2022; BENSCH et al., 2009;). Dessa forma a soma de estudos morfológicos utilizando as técnicas clássicas e a utilização modernos métodos moleculares e filogenéticos tornou-se o “padrão-ouro” para a detecção, identificação, classificação e descrição de novas espécies para os parasitos do grupo (VALKIUNAS, 2005; BESNCH et al., 2009; BRAGA et al., 2011; FECCHIO et al., 2020; MANDAL, 2021). Contudo, apesar da grande contribuição dos métodos moleculares para o entendimento da diversidade de hemosporídeos, a popularização em escala global destes métodos em detrimento das técnicas morfológicas tem gerado cada vez mais sequências genéticas de hemosporídeos aviários não relacionadas às espécies do parasito (BENSCH, 2009). O banco de dados específico de Hemosporídeos aviários (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) MalAvi (BENSCH et al., 2009) possui mais de 4787 linhagens do gene *cytb* destes

parasitos menos de 0,1% das linhagens são relacionadas a espécies caracterizadas morfologicamente.

2.3.1 Gênero *Haemoproteus*

Os parasitos pertencentes ao gênero *Haemoproteus* são classificados na família Haemoproteidae. As características distintivas desta família incluem o desenvolvimento de gametócitos dentro de eritrócitos. A reprodução sexual ocorre em insetos hematófagos das famílias Ceratopogonidae e Hippoboscidae (VALKIŪNAS, 2005). O gênero *Haemoproteus*, possui 2 subgêneros que ocorrem em aves: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*. A divisão entre os dois subgêneros de *Haemoproteus* se dá pelos vetores envolvidos na transmissão: enquanto o subgênero *Haemoproteus* é transmitido por moscas da família Hippoboscidae, o subgênero *Parahaemoproteus* é transmitido por mosquitos da família Ceratopogonidae (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; KRIZANAUSKIENE et al., 2013). O subgênero *Haemoproteus* possui grande parte de suas espécies associadas à hospedeiros da ordem Columbiforme (pombos), por sua vez o subgênero *Parahaemoproteus* possui uma maior diversidade de hospedeiros, sendo registrado em quase todas as ordens de aves, mas principalmente em Passeriformes (VALKIUNAS, 2005; e IEZHOVA, 2022). Baseados nos caracteres morfológicos e nas sequências do gene cytb dos parasitos são reconhecidas atualmente 177 espécies destes parasitos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; e IEZHOVA, 2022; BENSCH et al., 2009; DIMITROV et al., 2014). Assim como os parasitos do gênero *Plasmodium*, as espécies do gênero *Haemoproteus* podem ser encontrados em todas as regiões biogeográficas do planeta, com exceção da Antártida (VALKIUNAS, 2005; BENSCH et al., 2009).

A gravidade das infecções por *Haemoproteus* spp. e a presença de sintomas clínicos em animais frequentemente estão associadas a níveis elevados de parasitemia (GARNHAM, 1966; ATKINSON & VAN Riper III, 1991). Houve relatos de surtos com doença severa e mortalidade em pombos (*Columba livia*) devido à infecção por *Haemoproteus columbae* (RESENDE et al., 2001; SOL et al., 2003).

Recentes descobertas histopatológicas mostram que os parasitos do gênero *Haemoproteus* podem danificar os órgãos das aves durante o desenvolvimento exoeritrocítico, incluindo cérebro, coração, pulmões, rins e músculos esqueléticos. Isso pode afetar a saúde geral das aves, e, portanto, pode ter implicações para sua

epidemiologia e manejo. No entanto, os estudos permanecem insuficientemente estudados, em parte devido às dificuldades na identificação de suas espécies, o que é um obstáculo para uma pesquisa abrangente de biodiversidade (VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2022).

2.3.2 Ciclo biológico de *Haemoproteus*

O ciclo nos vetores insetos é análogo ao descrito para o gênero *Plasmodium* spp. (Figura 1). Os esporozoítos resultantes da reprodução sexual e esporogonia nos hospedeiros invertebrados constituem as formas infecciosas para aves hospedeiras. Após a ingestão de sangue, os esporozoítos alojados nas glândulas salivares do vetor entram na circulação do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se via merogonia para formar merontes (ou esquizontes) extracelulares contendo merozoítos. Esses merontes são frequentemente encontrados nos tecidos pulmonares, esplênicos, hepáticos e renais (ATKINSON et al.; VALKIŪNAS, 2005). Algumas espécies de *Haemoproteus* apresentam uma esquizogonia secundária, resultando na formação de megalomerentes nas células endoteliais de capilares, miofibroblastos da musculatura esquelética e cardíaca. Os megalomerentes em células musculares são comparativamente maiores do que os esquizontes em células hepáticas. Após a segunda geração de esquizogonia extracelular, os merozoítos rompem os megalomerentes e infectam eritrócitos, onde se diferenciam em gametócitos. Tipicamente, pelo menos duas gerações de esquizontes tissulares ocorrem antes da presença de gametócitos na circulação periférica (VALKIŪNAS, 2005).

Durante o ciclo eritrocítico, apenas os gametócitos são visíveis, exibindo a produção de pigmentos hemozoína (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON & VAN Riper III, 1991). Alguns autores consideram as espécies de *Haemoproteus* mais restritas em relação aos seus hospedeiros vertebrados em comparação com outras espécies de hemosporídeos, como aquelas do gênero *Plasmodium* (BENNETT & CAMPBELL, 1972; PEIRCE & ADLARD, 2005; SAVAGE & GREINER, 2004).

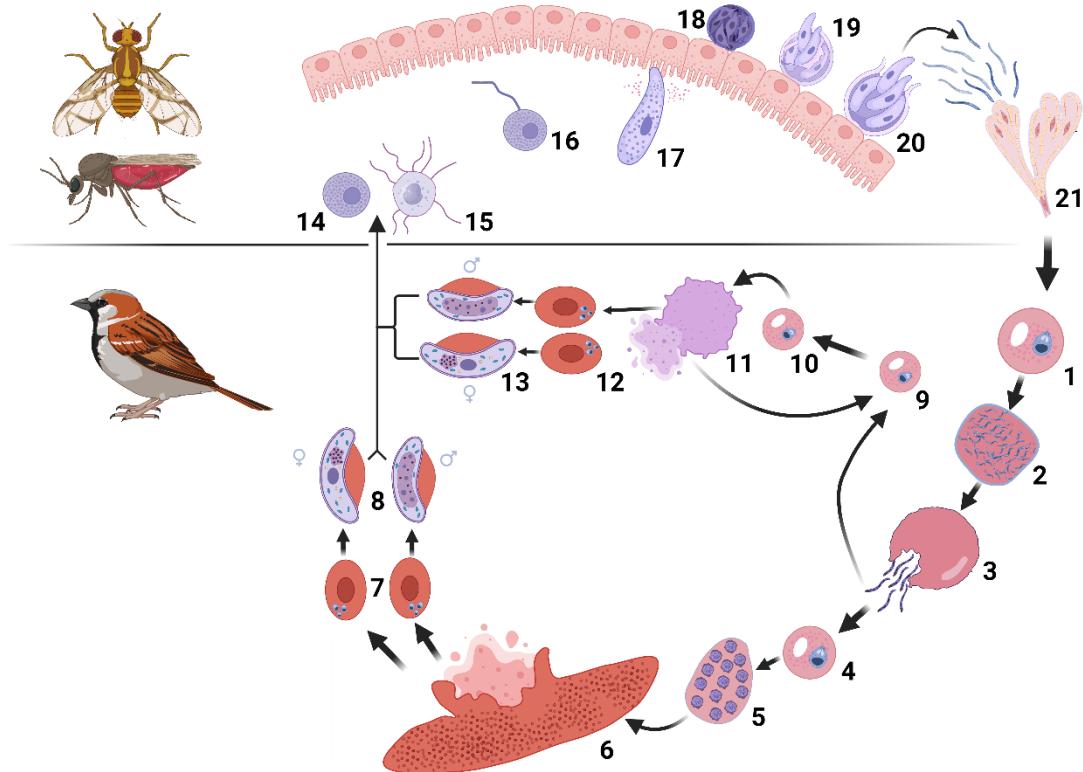


Figura 1: Representação do ciclo biológico de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves. Parte superior vetor (14–21), parte inferior ave (1–13). 1 – esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 – merontes exoeritrocíticos primários; 4 – merozoítos em células endoteliais; 5, 6 – crescimento e megalomerentes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítos na célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 – crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 – merozoítos em eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogameta; 15 – exflagelação dos microgametas; 16 – fertilização do macrogameta; 17 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 – esporogonia; 21 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de VALKIUNAS, 2005).

2.3.3 Diversidade genética e deteção de *Haemoproteus*

A família Haemoproteidae apresenta uma notável riqueza em termos de número de espécies, contando com 177 espécies de *Haemoproteus* descritos com base na morfologia dos gametócitos e nas peculiaridades de sua influência nas células hospedeiras (VALKIŪNAS e IEZHOVA, 2022). Paralelamente, foram identificadas 1905 linhagens genéticas desses parasitos; contudo, apenas 159 delas, correspondendo a 8%, foram associadas a 76 morfoespécies (banco de dados MalAvi, acesso mais recente em setembro

de 2023 (BENSCH et al., 2009). Isso sugere uma diversidade de espécies ainda mais elevada do que inicialmente considerada.

A combinação de ferramentas microscópicas e baseadas em PCR se complementam e ampliam a importância das pesquisas sobre a diversidade de parasitas hemosporídeos, sendo preferível, principalmente em estudos envolvendo animais selvagens (LOTTA et al 2019; BENSCH & HELLGREN, 2020; VALKIUNAS, 2022). A caracterização molecular está mais avançada para os parasitos de aves passeriformes que se reproduzem e migram na Europa, sendo mais limitada para os organismos que habitam espécies de aves tropicais, as quais são de difícil acesso para coleta de sangue (VALKIUNAS & ATKINSON, 2020; BENSCH et al., 2009). Marcadores moleculares espécie-específicos não estão para a maioria dos *Haemoproteus* aviários e atualmente são difíceis de desenhar devido à vasta diversidade genética desses patógeno. Este é um obstáculo significativo para o desenvolvimento de pesquisas de biodiversidade de *Haemoproteus* e outros hemosporídeos (VALKIUNAS, 2022).

A maioria dos parasitos *Haemoproteus* descritos ainda não foi caracterizada usando marcadores moleculares e o desenvolvimento desses marcadores é uma tarefa de extrema importância. Isso é especialmente relevante, uma vez que tais marcadores são inestimáveis para a identificação de espécies de hemosporídeos nas fases esporogônicas e teciduais, que permanecem não avaliadas na maioria desses patógenos selvagens (VALKIŪNAS e IEZHOVA, 2022).

Desde a popularização do uso da PCR para detecção de hemosporídeos no geral, a grande maioria dos estudos têm utilizado somente o gene mitocondrial do citocromo b (*cytb*) como marcador molecular (HELLGREN, 2004; PACHECO, 2018; OLIVEIRA, 2020; BENSCH et al., 2009, OUTLAW & RICKLEFS, 2014, VALKIŪNAS et al., 2017). Muitas vezes, essas PCRs que tem como alvo regiões conservadas do gene *cytb*, ignoram infecções mistas simplesmente porque são esperados tamanhos de amplicon iguais ou bastante semelhantes (PÉREZ-TRIS e BENSCH, 2005, VALKIUNAS et al., 2006, MARTÍNEZ et al., 2009, ZEHTINDJIEV et al., 2012). Uma questão sensível na detecção de infecções mistas através da PCR utilizando primers gerais pode ser a afinidade diferenciada dos primers para diferentes linhagens de parasitos ou a intensidade de infecção por uma dessas linhagens, resultando em baixas concentrações de DNA e baixa eficiência de amplificação (MARZAL et al., 2008).

2.4 Cartões FTA

O papel de filtro Flinders Technology Associates (cartão FTA®) consiste em uma membrana de celulose à base de algodão impregnada com um agente caotrópico. Esse agente serve para inativar micro-organismos infecciosos, promover a lise de componentes celulares e fixar o DNA e/ou RNA dentro da matriz de fibras (WHATMAN, 2006). Os cartões FTA têm sido utilizados para coletar diversos tipos amostras, sem a necessidade de manutenção de uma cadeia de frio durante o transporte dos mesmos. A aplicação dos cartões FTA demonstrou notável eficácia na identificação de diversos agentes patogênicos (ABDELWHAB, 2011; KEELER, 2012; MERINO, 2012; SMITH, 2018; SCHUMM, 2019). Segundo Thomas et. al., (2022) todos os formatos do FTA Card existentes capturam ácidos nucleicos das amostras e os preservam à temperatura ambiente, tornando este sistema ideal para coleta de amostras em campo e preservação durante o armazenamento e transporte. Para Dove et. al., (2010), o procedimento de coleta com o cartão é simples e envolve apenas pressionar a amostra biológica no papel filtro do cartão e deixar secar ao ar.

2.5 Extração de DNA

A extração e a purificação de ácidos nucléicos a partir de diversas amostras experimentais entre elas, sangue, bactérias, fungos, tecidos vegetais e animais (DHALIWAL, 2013) é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise das células presentes na amostra e a purificação do DNA. Após a lise das células, o DNA deve ser separado dos restos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas. As amostras de DNA podem também ser submetidas a processos de concentração e de purificação, com a finalidade de se obter melhores resultados nas amplificações. Para cada tipo de amostra, é possível explorar, ajustar e otimizar múltiplos protocolos, a fim de assegurar a obtenção de DNA de elevada qualidade. Uma ampla gama de protocolos está disponível, juntamente com uma diversificada oferta de kits comerciais destinados à extração de material genético, os quais se adaptam a uma variada gama de tipos de amostras (EMBRAPA, 2017). É importante salientar que, a qualidade e integridade do ácido nucleico isolado afetarão diretamente os resultados de todas as pesquisas científicas subsequentes (CSEKE, 2004).

A avaliação da qualidade e concentração do DNA extraído pode ser realizada por meio de eletroforese em gel de agarose. Nesse processo, as amostras de DNA são separadas com base em seus tamanhos moleculares, e as bandas resultantes são visíveis quando o gel é exposto a uma fonte de luz ultravioleta ou a um corante fluorescente. A concentração do DNA pode ser estimada pela intensidade das bandas, sendo que bandas mais intensas indicam uma maior concentração de DNA (COELHO et al. 2004).

As amostras de DNA extraídas no laboratório podem ser avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. A espectrofotometria é uma técnica amplamente utilizada na quantificação de ácidos nucleicos, uma vez que permite não apenas estimar a concentração de DNA, mas também avaliar a qualidade da amostra com base em razões de absorção específicas em comprimentos de onda particulares, como a razão A260/A280, que indica a pureza do DNA em relação a proteínas contaminantes. Essa técnica fornece informações valiosas para garantir que o DNA extraído seja de alta qualidade e adequado para aplicações subsequentes em laboratórios de biologia molecular e genética (OLIVEIRA 2007). A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA extraído e, desse modo, a relação A260/A280 pode ser usada para esse fim. Amostras cujos valores dessa relação são inferiores a 1,8 sugerem contaminação com proteínas (LEE et al. 2010).

A quantificação de DNA usando corantes fluorométricos é frequentemente considerada mais específica e precisa em comparação com métodos de espectrofotometria de absorção, que são geralmente menos específicos (BAIROLIYA, 2022). Um equipamento que é amplamente utilizado é o Qubit. Segundo informações do fabricante, os fluorômetros Qubit detectam corantes fluorescentes ligados especificamente à molécula-alvo e podem distinguir o DNA de fita dupla do DNA de fita simples ou o RNA íntegro do degradado, mesmo em quantidades extremamente pequenas ou na presença de contaminantes.

2.5.1 Kit DNeasy Blood and Tissue® (Qiagen)

O uso deste método de extração é extremamente popularizado e consolidado no meio científico por diversos motivos, é econômica, tem procedimentos mais simples e rápidos que a extração orgânica. (TAN, 2009) Porém, o elevado custo faz com que haja necessidade de se encontrar métodos mais acessíveis. A purificação do DNA é feita por meio do uso de uma coluna que contém fragmentos de sílica (coluna de purificação). Inicialmente, o DNA se liga à membrana da coluna de extração e depois ele é lavado para que apresente alta pureza (DHALIWAL, 2013). No final do protocolo, o DNA é eluído com tampão de eluição (ESSER, 2006). A utilização de kits permite a purificação do DNA nas amostras de maneira homogênea e rápida. Este kit tem sido utilizado para amostras de diversas espécies de malária e aves em todo o mundo (WOOD et al., 2007; CASTRO et al., 2011; ATKINSON et al., 2014; YABSLEY et al., 2023; MEISTER et al., 2023; LYNTON-JENKINS et al., 2023). Este kit pode ser utilizado para isolar DNA total (genômico, mitocondrial e de patógenos) de diversas fontes de amostra, incluindo tecidos e células animais frescas ou congeladas, tecidos e células fixados em formalina ou embutidos em parafina, caudas de roedores, sangue, bactérias, leveduras, cabelos, insetos, entre outros. O DNA purificado pode chegar a até 50 kb de tamanho, e o kit é eficaz na recuperação de fragmentos de DNA tão pequenos quanto 100 pb (DHALIWAL, 2013).

2.5.2 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

Assim como o kit da Qiagen, este também realiza a purificação do DNA através da coluna de sílica. Este kit isola DNA de uma ampla faixa de tamanhos de amostra, incluindo sangue (por exemplo, de 100 µl a 1 ml), tecidos, células, bactérias, swabs bucais. Isso proporciona ao usuário flexibilidade, uma vez que um único kit pode ser utilizado para isolar DNA de diversas fontes de amostra (DHALIWAL, 2013).

2.5.3 Fenol-Clorofórmio

O procedimento de escolha para a purificação de DNA, é a extração utilizando fenol tamponado, um método que demonstra eficácia na desnaturação de proteínas. O clorofórmio é também empregado como um agente desnaturante proteico na amostra. A combinação de fenol e clorofórmio apresenta notável eficiência na desproteinização, uma

vez que se baseia na propriedade hidrofóbica inerente das proteínas, as quais exibem afinidade por solventes orgânicos. As proteínas que foram desnaturadas pelo tratamento conjunto com fenol e clorofórmio segregam-se formando uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA, que permanece na fase aquosa. A eficácia da extração fenólica é sensível ao pH. O fenol empregado nesse contexto deve manter um pH próximo de 8,0 (fenol tamponado), uma vez que faixas de pH mais baixo resultam na sedimentação do DNA na interface durante a centrifugação. Em pH igual ou superior a 7,0, o DNA mantém-se na fase aquosa; contudo, em pH inferior a 7,0, ocorre sua desnaturação, fazendo-o migrar para a fase orgânica.

2.5.4 Salting out

É um método rápido, seguro e barato que foi desenvolvido para simplificar o procedimento de desproteinização. Esse método envolve a precipitação das proteínas celulares por desidratação e precipitação com uma solução saturada de NaCl (MILLER et al 1988). Uma vantagem deste método é a não utilização de solventes orgânicos perigosos como fenol e clorofórmio. Porém como não é comumente utilizado para na extração de material genômico de aves, seu desempenho ainda carece de mais estudos.

2.5.5 HotShot

A técnica HotSHOT (TRUETT et al., 2000), uma variação do método de lise alcalina (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), é um método confiável, econômico e simples de extração de DNA que pode ser facilmente adaptado para diversos tipos de amostras. Uma vantagem adicional é que, por ser uma técnica realizada em tubo único, a probabilidade de contaminação cruzada é reduzida (SENNE, 2022).

2.6 Falta de padronização

Nos dias atuais, existe uma grande de protocolos bastante consolidados disponíveis na literatura acerca de extração de DNA de uma grande variedade de amostras. Na busca por um método de extração ideal, deve-se levar em considerações alguns fatores importantes como, ser eficiente, reproduzibilidade, rápido e de fácil execução (CHACON-CORTES & GRIFFITHS, 2014). E o ponto mais importante para a escolha de técnica de extração mais apropriada, ela deve ser capaz de fornecer amostras de DNA de qualidade

e puras, prontas para serem utilizadas em aplicações moleculares (LAHIRI et al, 1992; BOOM et al 1990; PRICE et al 2009).

Foi realizada uma busca na literatura científica disponível no momento da redação desta dissertação, a fim de determinar o melhor método de extração adequado a natureza das amostras utilizadas. Entretanto, não há evidências científicas suficientes que corroborem com um método específico de extração de DNA de amostras de sangue total de aves, sobretudo as armazenadas em cartões FTA®.

CAPÍTULO I

3. DIVERSIDADE GENÉTICA DE PARASITOS DO GÊNERO *Haemoproteus* EM AVES SELVAGENS DA MATA ATLÂNTICA ALTIMONTANA

RESUMO

SILVA, Nelson Meireles. **Diversidade genética de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves selvagens da mata atlântica altimontana.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade do mundo e abriga uma variedade impressionante de aves silvestres. Neste bioma, é estimado que haja ocorrência de 893 espécies de aves, sendo 215 endêmicas. Os parasitos pertencentes ao gênero *Haemoproteus* são classificados na família Haemoproteidae. As características distintas desta família incluem o desenvolvimento de gametócitos dentro de eritrócitos. A reprodução sexuada ocorre em insetos hematófagos das famílias Ceratopogonidae e Hippoboscidae. Baseados nos caracteres morfológicos e nas sequências do gene mitocondrial do citocromo b (*cyt-b*) dos parasitos são reconhecidas atualmente 177 espécies destes parasitos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres. A combinação das análises morfológicas e aquelas baseadas em PCR se complementam e ampliam a importância das pesquisas sobre a diversidade de parasitos hemosporídeos, sendo preferível, principalmente em estudos envolvendo animais selvagens. Desde a popularização do uso da PCR para detecção de hemosporídeos, a grande maioria dos estudos têm utilizado somente o gene *cyt-b* como barcoding. As autorizações e licenças necessárias para a coleta e processamento das amostras foram obtidas junto aos órgãos responsáveis. As coletas foram realizadas em áreas de conservação, dentro do bioma Mata Atlântica no Parque Nacional do Caparaó (MG), no Parque Nacional de Itatiaia e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (RJ), entre 700 e 2500 metros de altitude. As aves foram capturadas por meio de redes de neblina e todas as aves foram identificadas através dos guias de campo, fazendo-se, a seguir, a coleta de sangue em FTA® card e soltura das aves. As amostras foram submetidas a reação de qPCR para hemosporídeos e as positivas foram submetidas a Nested PCR (nPCR) para posterior sequenciamento e caracterização molecular. Dentre as 586 aves amostradas, 140 foram positivas para *Plasmodium/Haemoproteus*, sendo obtida uma prevalência geral de 23,89% (n=140/586). No total, 38 amostras foram enviadas para o sequenciamento. Na análise filogenética as sequências obtidas neste estudo agruparam-se em 6 clados bem suportados. O clado A foi composto por 10 amostras que se agruparam em clado exclusivo, tendo como grupo irmão *Haemoproteus erythrogravidus*. No clado B, quatro amostras se agruparam no grupo de *Haemoproteus erythrogravidus*. No clado C, quatro amostras formaram um grupo exclusivo, tendo como grupo irmão *Haemoproteus zosteropis*. Um total de 13 amostras se agruparam no clado de *Haemoproteus nucleocentralis* (clado D), 5 amostras no clado de *Haemoproteus paraortalidum* (clado E). Foi possível notar uma preferência do clado B pela espécie *Zonotrichia capensis*. As linhagens agrupadas neste clado foram encontradas somente nesta espécie. Foi possível observar influência da altitude nas linhagens encontradas neste estudo, sendo o clado C somente encontrada a 1500 metros de altitude e foi nessa altura que observamos maior diversidade genética. Com relação aos locais amostrados, *H. erythrogravidus* só foi encontrado no Parque Nacional do Caparaó. E neste estudo não foi possível recuperar linhagens de *Haemoproteus paraortalidum* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Todas as outras linhagens demonstraram estar mais distribuídas. Uma prevalência e diversidade genética relativamente alta em aves silvestres foi observada na região estudada. Através dos resultados obtidos neste estudo, enriquecemos o conhecimento sobre a diversidade global de parasitos do gênero *Haemoproteus* em aves endêmicas de diferentes espécies que ocorrem em áreas altimontanas da Mata Atlântica do Brasil.

Palavras-chave: Haemosporida; sequenciamento; *cyt-b*;

ABSTRACT

SILVA, Nelson Meireles. **Genetic diversity of parasites of the genus *Haemoproteus* in wild birds from the Montane Atlantic Forest.** 2023. 116p. Thesis (Master's degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Epidemiology and Public Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The Atlantic Forest is one of the world's most biodiverse biomes, harboring an impressive variety of wild birds. In this biome, it is estimated that there are 893 species of birds, with 215 being endemic. Parasites belonging to the *Haemoproteus* genus are classified in the *Haemoproteidae* family. Distinctive characteristics of this family include the development of gametocytes within erythrocytes. Sexual reproduction occurs in hematophagous insects from the *Ceratopogonidae* and *Hippoboscidae* families. Based on morphological characters and mitochondrial cytochrome b (*cyt-b*) gene sequences, there are currently 177 recognized species of these parasites in various domestic and wild bird species. The combination of morphological and PCR-based analyses complements and enhances the importance of research on hemosporidian parasite diversity, particularly in studies involving wild animals. Since the popularization of PCR for hemosporidian detection, the majority of studies have solely used the *cyt-b* gene as a barcode. Necessary permits and licenses for sample collection and processing were obtained from relevant authorities. Collections were carried out in conservation areas within the Atlantic Forest biome, including the Caparaó National Park (MG), the Itatiaia National Park, and the Serra dos Órgãos National Park (RJ), at altitudes ranging from 700 to 2500 meters. Birds were captured using mist nets, and all birds were identified using field guides. Blood samples were collected on FTA® cards, and the birds were released. The samples underwent qPCR for hemosporidians, and the positive samples were subjected to Nested PCR (nPCR) for subsequent sequencing and molecular characterization. Out of the 586 sampled birds, 140 tested positive for *Plasmodium/Haemoproteus*, resulting in an overall prevalence of 23,89% (n=140/586). A total of 38 samples were sent for sequencing. In the phylogenetic analysis, the sequences obtained in this study grouped into six well-supported clades. Clade A consisted of 10 samples that formed an exclusive clade, with *Haemoproteus erythrogravidus* as the sister group. In clade B, four samples grouped within the *Haemoproteus erythrogravidus* clade. Clade C comprised four samples that formed an exclusive group, with *Haemoproteus zosteropis* as the sister group. A total of 13 samples clustered within the *Haemoproteus nucleocentralis* clade (clade D), and 5 samples within the *Haemoproteus paraortalidum* clade (clade E). There was an apparent preference of clade B for the *Zonotrichia capensis* species, as the lineages grouped in this clade were only found in this species. Altitude was observed to influence the lineages found in this study, with clade C exclusively found at 1500 meters above sea level, where greater genetic diversity was observed. Regarding the sampled locations, *H. erythrogravidus* was only found in the Caparaó National Park. However, this study could not recover *Haemoproteus paraortalidum* sequences in the Serra dos Órgãos National Park. All other lineages appeared to be more widely distributed. A relatively high prevalence and genetic diversity of wild birds in the studied region were observed. The results of this study contribute to our understanding of the global diversity of *Haemoproteus* parasites in endemic birds of different species occurring in high-altitude areas of the Brazilian Atlantic Forest.

Keywords: Haemosporida; sequencing; *cyt-b*;

3.1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um dos cinco principais "hotspots" globais para a conservação biológica (MYERS et al., 2000), devido à sua elevada riqueza de espécies e taxas de endemismo (RIBEIRO et al., 2009). A topografia da Mata Atlântica contribui para a elevada taxa de endemismo, devido ao isolamento geográfico causado pelas montanhas, o qual resulta em restrições ao fluxo gênico e na diferenciação de populações de organismos isolados (MACARTHUR e WILSON, 1967; KITAYAMA, 1996; BARBARÁ, 2007; POREMBSKI, 1998, VASCONCELOS, 2010, PRATES, 2017).

Os hemosporídeos aviários, pertencentes ao filo Apicomplexa e à ordem Haemosporida, englobam quatro famílias distintas, nomeadamente Plasmodiidae, Haemoproteidae, Leucocytozooidae e Garniidae (VALKIUNAS, 2005). Dentre estas famílias, a Haemoproteidae, representada pelo gênero *Haemoproteus*, destaca-se pela sua elevada diversidade, albergando 177 espécies registadas em várias aves domésticas e selvagens por todo o mundo (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; BEN SCH et al., 2009; MANTILLA et al 2016; FERREIRA-JUNIOR et al 2018a; ANJOS et al 2021; VALKIUNAS et al 2021; IEZHOVA, 2022). O ciclo de vida de *Haemoproteus* é heteroxénico, envolvendo uma fase assexuada em eritrócitos e tecidos do hospedeiro vertebrado (aves), e uma fase sexual em dípteros hematófagos das famílias Hippoboscidae e Ceratopogonidae (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). O gênero *Haemoproteus* encontra-se subdividido em dois subgêneros, *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* (BENNETT et al., 1965; GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005), distinguindo-se com base nas espécies de vetores, sendo o subgênero *Haemoproteus* transmitido por moscas da família Hippoboscidae e o *Parahaemoproteus* transmitido por mosquitos da família Ceratopogonidae (VALKIUNAS, 2005; KRIZANAUSKIENE et al., 2013).

Análises filogenéticas recentes, baseadas em quatro genes, revelaram que os hemosporídeos aviários podem ser subdivididos em dois clados semelhantes aos do gênero *Plasmodium*. Um dos grupos parasita as aves da ordem Columbiformes e é transmitido por hipoboscídeos, enquanto o outro é transmitido por mosquitos ceratopogonídeos (MARTINSEN et al. 2008). Estas análises recentes corroboram a proposta de subdivisão do gênero feita por Bennett et al. (1965), mantendo os parasitos transmitidos por hipoboscídeos no gênero *Haemoproteus* e alocando a maioria das espécies possivelmente transmitidas por ceratopogonídeos no gênero *Parahaemoproteus* (MARTINSEN et al. 2008). No entanto, atualmente, esta distinção é estabelecida ao nível

de subgênero (VALKIUNAS 2005). As revisões taxonômicas mais recentes deste gênero foram realizadas por Peirce (2005) e Valkiūnas (2005). Peirce lista 147 espécies ocorrendo em 72 famílias de aves, enquanto Valkiūnas sinónima algumas espécies com base na faixa de hospedeiros e lista 15 espécies a menos que Peirce, deixando 132 espécies válidas. Estudos recentes sobre a diversidade genética destes parasitos sugerem que o verdadeiro número de espécies possa ser maior, com múltiplas linhagens destes parasitos a coexistir no mesmo hospedeiro (BENSCH et al. 2000, 2004; RICKLEFS e FALLON 2002).

Aproximadamente 50% de todas as espécies de *Haemoproteus* descritas parasitam aves da ordem Passeriformes (VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2022). Se tem observado que alguns *Haemoproteus* de passeriformes têm a capacidade de infectar e gerar gametócitos em aves de diferentes famílias, todas pertencentes à mesma ordem (KRIŽANAUSKIENĖ et al, 2006). Isso respalda a informação de que as características taxonômicas do hospedeiro não podem ser consideradas como o principal traço taxonômico do parasito. (VALKIŪNAS, 2002; VALKIŪNAS, 2005). As linhagens podem diferir umas das outras em apenas um único nucleotídeo (por exemplo, uma substituição) do gene do citocromo b mitocondrial (BENSCH et al., 2004; HELLGREN, WALDENSTRÖM & BENSCH, 2004; BENSCH, HELLGREN & PEREZ-TRIS, 2009; Chagas e outros, 2017). Levando em consideração somente a ordem Passeriformes, 1409 linhagens de *Haemoproteus* estão depositadas no banco de dados do MalAvi (BENSCH, 2009), acessado em setembro de 2023. A América do Sul conta com aproximadamente 23,63% de todas as linhagens encontradas no MalAvi, possuindo 333 linhagens de *Haemoproteus*.

Dentro deste cenário, o presente estudo visa investigar a diversidade genética de espécies de *Haemoproteus* em aves selvagens nas áreas montanhosas da Mata Atlântica brasileira.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Autorização para coleta de material biológico

As autorizações e licenças necessárias para a coleta e processamento das amostras foram obtidas junto aos órgãos responsáveis, avaliados e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo nº 4863180222) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 68906-1/2020).

3.2.2 Locais de amostragem

As coletas foram realizadas em áreas de conservação, dentro do bioma Mata Atlântica no Parque Nacional do Caparaó ($20^{\circ} 26' 5''$ S, $41^{\circ} 47' 2''$ W) no estado de Minas Gerais. No Parque Nacional do Itatiaia ($22^{\circ} 22' 31''$ S, $44^{\circ} 39' 44''$ W) e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos ($22^{\circ} 29' 35''$ S, $43^{\circ} 4' 24''$ W), ambos localizados no estado do Rio de Janeiro (Figura 2). Os locais de amostragem são representados por regiões montanhosas inseridas no bioma Mata Atlântica, onde foram realizadas coletas de aves silvestres entre 700 e 2500 metros de altitude acima do nível do mar.

3.2.2.1 Parque Nacional do Caparaó

Segundo a classificação de Köppen, o clima do Parque Nacional do Caparaó é do tipo Cwb, caracterizando-se por ser clima tropical de altitude, onde o relevo assume importância marcante na determinação das diferenças de temperatura na área. A temperatura média anual varia entre os 19°C e os 22°C , com a máxima absoluta atingindo os 36°C e a mínima absoluta os 4°C negativos nos picos mais altos do Parque (IBAMA, 1995; IEF/ TURMINAS/ IBAMA/ GTZ/ IGA, s/data1). A pluviosidade média varia dos 1.000 aos 1.500mm anuais, atingindo 1.750mm na porção norte do Parque. As chuvas concentram-se no trimestre de novembro a janeiro, quando ocorrem de 35% a 50% das precipitações anuais. O período do ano que apresenta as menores médias pluviométricas é aquele entre junho e agosto, embora este fator varie em consequência do relevo local (IBDF, 1981).

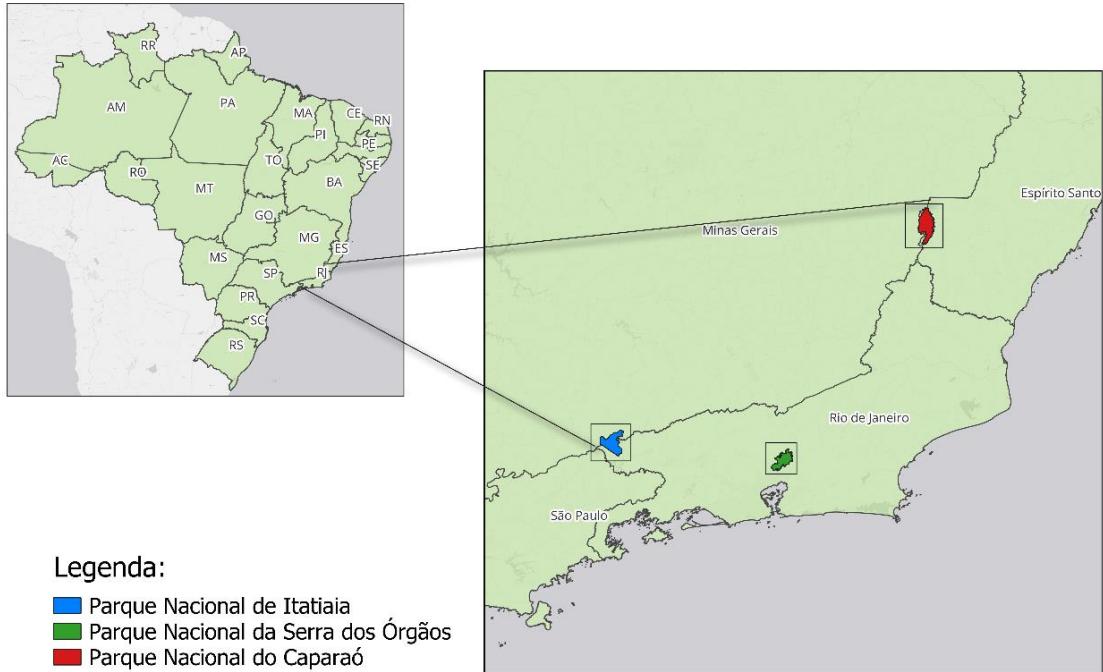
3.2.2.2 Parque Nacional do Itatiaia

Inserido no Bioma Mata Atlântica e situado na Serra da Mantiqueira entre os estados de Minas gerais e Rio de Janeiro, o Itatiaia abrange parte do território dos municípios de Itatiaia/RJ, Resende/RJ, Itamonte/MG e Bocaina de Minas/MG. Sua altitude varia de 540 m, próximo ao Vale do Paraíba, a 2.791 m no Pico das Agulhas Negras, ponto culminante do Estado do Rio de Janeiro e 5º mais alto do Brasil.

3.2.2.3 Parque Nacional da Serra dos Órgãos

A região da Serra dos Órgãos está inserida no domínio morfo-climático Tropical Atlântico. O clima do Parque é tropical superúmido (com 80 a 90% de umidade relativa do ar), com média anual varia de 13º a 23º C (atingindo valores de 38°C a 5°C negativos nas partes mais altas) e variação pluviométrica de 1.700 a 3.600mm, com concentração de chuvas no verão (dezembro a março) e período de seca no inverno (junho a agosto). O Clima, segunda Köppen, é do tipo Cwb - tropical de altitude, com uma curta estação seca. A dinâmica das massas de ar na região se caracteriza pelo domínio da Massa Tropical Atlântica na maior parte do ano. Esta massa apresenta umidade e temperatura relativamente altas. Durante o ano ocorrem entradas da Massa Polar Antártica, de característica seca e fria. Quando da entrada desta massa, há um impacto com a Massa Polar Atlântica e a geração de grandes eventos de precipitação característicos do Estado do Rio de Janeiro e que geram muitos problemas de deslizamentos em Teresópolis e Petrópolis. Um outro fator a afetar a distribuição da precipitação é a altitude. Ao atingirem as áreas mais elevadas, as massas de ar úmidas encontram um ambiente mais frio, onde a umidade tende a se condensar e precipitar.

Devido à proximidade com o mar o maciço rochoso torna-se uma barreira para a entrada das massas de ar vindas do Atlântico. A umidade destas massas faz das vertentes deste maciço voltadas para o oceano mais úmidas que aquelas voltadas para o continente. Isto ocorre porque as massas de ar tendem a perder umidade ao se encontrarem com o maciço, gerando chuvas orográficas, ventos úmidos ou névoa. Portanto, ao atingirem as vertentes opostas, as massas de ar vindas do Atlântico já perderam boa parte de sua umidade, tornando estas vertentes, em geral, mais secas e mais suscetíveis à ocorrência de incêndios.



Fonte de dados: ICMBIO (2023) e IBGE (2020)

Datum: SIRGAS 2000

Elaboração: Nelson Meireles da Silva

Data: 30/09/2023

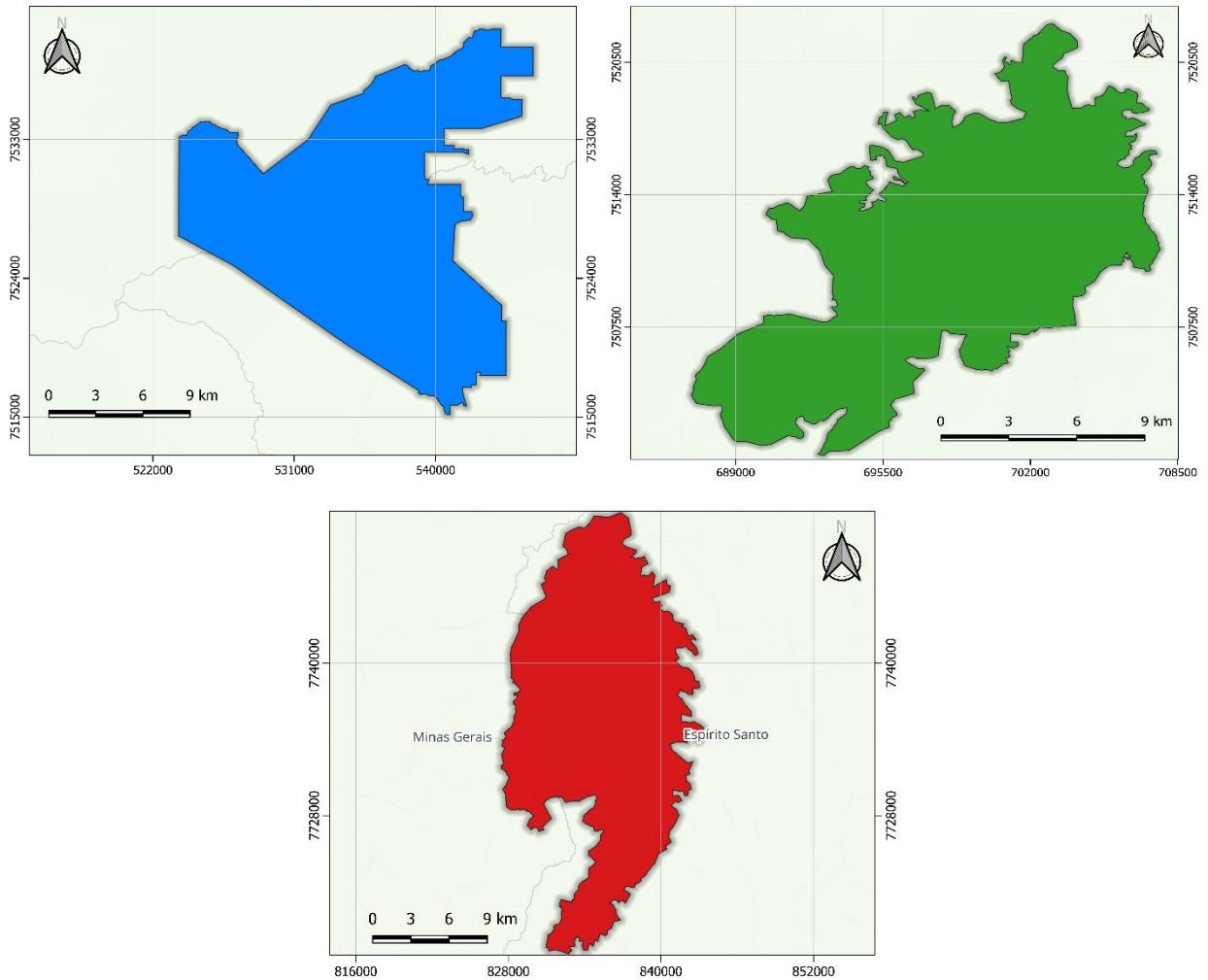


Figura 2: Mapas de localização das áreas de coleta, elaborados no software QGIS 3.3
(Fonte: arquivo pessoal)

3.2.3 Tamanho da amostra de aves

Para a determinação do tamanho da amostra foi levado em consideração parâmetros de uma população infinita para um nível de prevalência esperada de 50%, erro amostral de 5%, de acordo com Fulgêncio, (2006), utilizando a fórmula:

$$n = \frac{p(100 - p)}{(d.p / 100)^2}$$

Sendo: n = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita; p = prevalência esperada; α^2 = fator determinante do grau de confiança; d = erro amostral. Assim, serão coletados um total mínimo de 384 aves.

3.2.4 Coleta e acondicionamento das amostras

As aves foram capturadas por meio de redes de neblina (Figura 3 e 4) com 12 metros de comprimento por 3 metros de altura com 36 milímetros de malha, dispostas em conjuntos lineares de cinco redes totalizando um transecto de 60 metros, sendo estendidas desde antes do nascer do sol até o fim do dia e sendo verificadas a cada 15 minutos. As redes foram trocadas de local a cada três dias a fim de evitar a habituação das aves à armadilha.



Figura 3: Transectos de redes de neblina montados, nota-se que as redes ficam camufladas junto a vegetação. As redes de neblina ficam quase que imperceptíveis como visto na imagem acima (Fonte: arquivo pessoal).



Figura 4: Retirada de aves da rede de neblina e saquinho para transporte seguro dos animais (Fonte: arquivo pessoal)

Após a captura, todas as aves foram identificadas através dos guias de campo (RIDGELY et al. 2009, SIGRIST, 2014), fotografadas, pesadas e medidas para a confirmação da identificação, fazendo-se, a seguir, a coleta de sangue e soltura das aves. A coleta de sangue foi realizada após assepsia da região da veia braquial esquerda, com posterior punção da mesma, sendo realizados esfregaços sanguíneos e o sangue para biologia molecular foi coletado no FTA® card (Figura 5).



Figura 5: Coleta de sangue através da punção da veia braquial para confecção de esfregaço e armazenagem em cartões FTA® (Fonte: arquivo pessoal)

3.2.5 Detecção através do método de esfregaço sanguíneo

Para as análises microscópicas, os esfregaços sanguíneos foram secados ao ar imediatamente após sua confecção e em seguida foram fixados em metanol absoluto durante 3 minutos. Após a fixação em campo os esfregaços sanguíneos foram levados ao laboratório e corados com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em água destilada na proporção de 1:9 durante 40 minutos. A detecção dos parasitos nos esfregaços foi realizada em microscópio de luz Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan) sendo analisados 100 campos microscópicos em ampliação de 1000X para cálculo da prevalência e parasitemia. Os valores de prevalência foram calculados de acordo com BUSH et al. (1997).

3.2.6 Extração do DNA genômico

As amostras foram extraídas utilizando o kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante, porém com algumas modificações. Mais detalhes sobre as modificações realizadas no presente estudos, podem ser consultados no segundo capítulo desta dissertação.

3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR realizada neste estudo foi a descrita por Friedl e Groscurth (2012). Os primers utilizados foram Plasco474for (5'-AGGCTAATCTTTCCGAGAGTCC-3') e Plasco558rev (5'-ACATACTACTGCTTAGGATGCGA3'), os quais amplificam espécies dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. A sonda utilizada foi constituída por um fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e por um Quencher QSY (TaqMan Probe) localizado na extremidade 3' (5'-AAGCCGACATCGAGGTGCCAAAC-3'). As soluções de reação foram preparadas com um volume total de 12 µL, contendo: 1U TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific™, MA, USA), 10 µM de cada primer, 10 µM de sonda e água ultrapura e 2 µL da amostra de DNA. Estas soluções foram pipetadas em placas de 96 poços em duplicata e submetidas à análise no aparelho de PCR em tempo real StepOnePlus Real time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). A reação ocorreu a 50°C por dois minutos e a 95°C por dez minutos, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, totalizando uma hora e vinte e três minutos de reação. Foram consideradas positivas as amostras que obtiveram o valor de $C_q \leq 40$ ciclos. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura. O controle positivo utilizado nas reações foi obtido a partir do cultivo celular de *Plasmodium gallinaceum*, o mesmo utilizado para a cPCR.

3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR)

As amostras foram submetidas a Nested PCR (nPCR) para posterior sequenciamento e caracterização molecular. Um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (*cyt-b*) foi amplificado através de nPCR. Na primeira reação foram utilizados os primers gerais de hemosporídeos aviários (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.) HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-

ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') capazes de amplificar em torno de 618 pares de base (pb) (HELLGREN et al., 2004). O volume final da reação foi de 25 μ L e a concentrações dos reagentes foi, 1X de Tampão de PCR, 1,5U de Platinum™ Taq DNA Polimerase, 0,4 mM de dNTP, 1,0 μ M de cada primer, 3mM de MgCl₂ e 2 μ L de DNA genômico da amostra. Para a segunda reação foram utilizados os primers específicos para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., HaemF (5'-ATGGTGTTCGATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), que amplificam aproximadamente 525 pb do gene *cyt-b* (HELLGREN et al., 2004). A reação de nPCR foi realizada utilizando as mesmas concentrações de reagentes da primeira reação, com exceção da concentração de primers que foi modificado para de 1,0 μ M para 0,5 μ M. Nas duas reações, as condições de termociclagem foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos e extensão final a 72°C durante 10 minutos. Em todas as reações, para controle negativo, foi utilizada água ultrapura. O controle positivo foi DNA genômico extraído de cultivo celular de *Plasmodium gallinaceum*. As reações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems Veriti 96® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos da segunda reação da nPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A corrida do gel foi realizada durante 60 minutos a 75 volts (5 V/cm). Subsequentemente, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta no fotodocumentador E-Gel® Imager (Life Technology – ThermoFisher Scientific). Em todos os géis foi adicionado 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para garantir que o produto amplificado estava na altura correta.

3.2.9 Purificação das amostras

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o kit de ExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup (Thermo Fischer) seguindo as instruções do fabricante.

3.2.10 Sequenciamento de um fragmento do gene *cyt-b*

Os produtos purificados foram sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados na segunda reação da nPCR, em ambos os sentidos. O sequenciamento das amostras foi realizado na plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (RJ), sendo realizado o sequenciamento por eletroforese capilar, método SANGER (SANGER, 1975). Segundo informações do site da plataforma, o equipamento utilizado é o ABI 3730

DNA Analyser, (Life Technologies – Applied Biosystems[®]) e as reações foram realizadas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

3.2.11 Análises filogenéticas

As análises foram realizadas utilizando dois conjuntos de dados contendo sequencias genéticas curadas do gene *cyt-b* de *Haemoproteus* e as sequências obtidas neste estudo. O conjunto de dados continha 115 sequências do gene *cyt-b* de *Haemoproteus* disponíveis no banco de sequências MalAvi (BENSCH et al. 2009) acessado em outubro de 2023. Como grupo externo foram escolhidas sequencias de cinco espécies de *Leucocytozoon* (*L. mathisi*, *L. buteonis*, *L. majoris*, *L. fringillinarum* e *L. polynuclearis*) também obtidas através do banco de dados MalAvi. O conjunto de dados foi alinhado no software MAFFT (KATOH et al., 2019) com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas com a plataforma Gblocks (TALAVERA & CASTRESANA, 2007), obteve-se uma matriz com aproximadamente 479 pb. A inferência das relações filogenéticas de *Haemoproteus* foi conduzida sob uma análise de Máxima Verossimilhança implementada no programa RaxML (STAMATAKIS, 2014), utilizando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (TAVARÉ, 1986; YANG, 1994), que foi escolhido como o melhor modelo de substituição no JmodelTest implementado no MEGA11 (KUMAR et al., 2016). Os valores de suporte dos clados foram avaliados através do teste de bootstrap com 1000 réplicas. Sequências de *Leucocytozoon* spp. foram utilizadas como grupo externo.

3.3 RESULTADOS

No total, 586 aves foram amostradas e a lista das espécies foram agrupadas em uma tabela única (anexo A). Sendo as famílias agrupadas por local de coleta em três gráficos distintos (Figuras 6, 7 e 8).

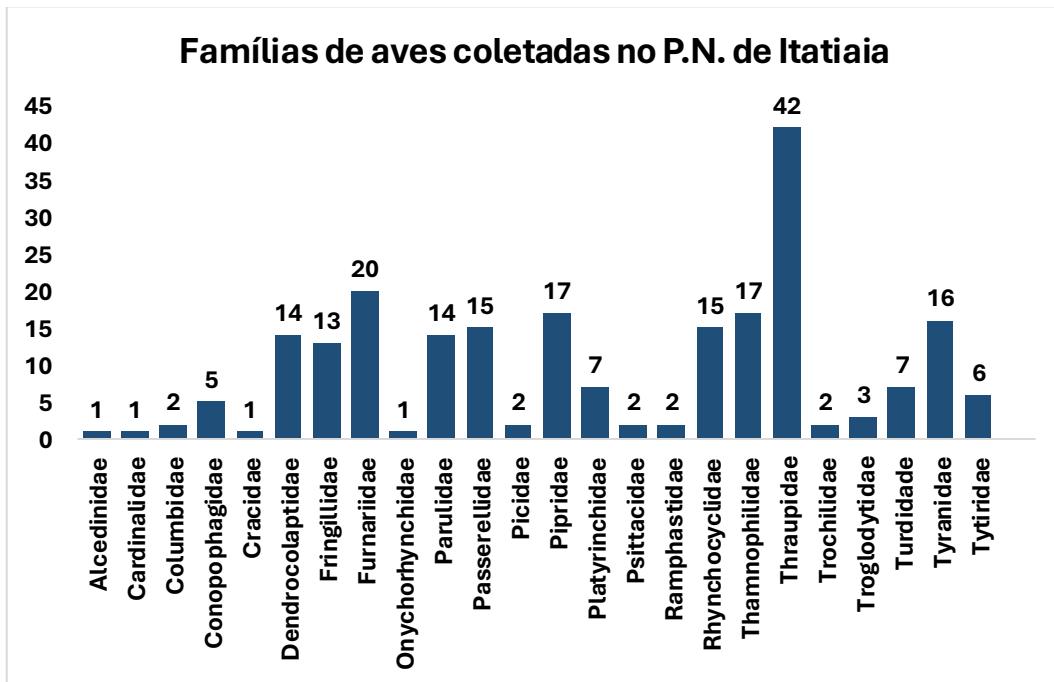


Figura 6: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no Parque Nacional de Itatiaia.

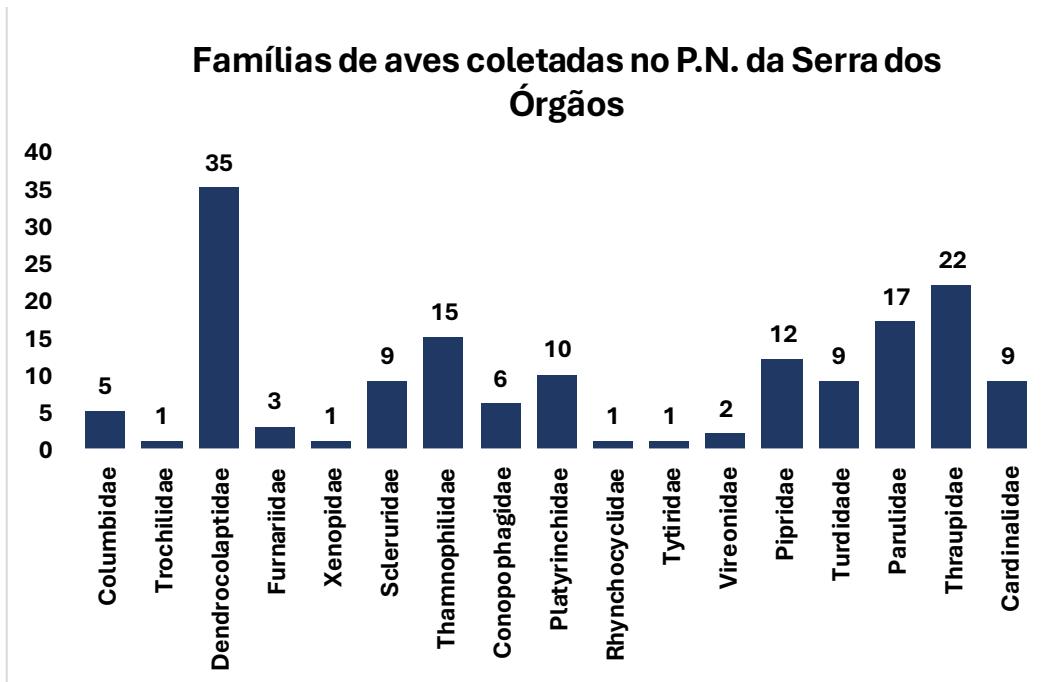


Figura 7: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos

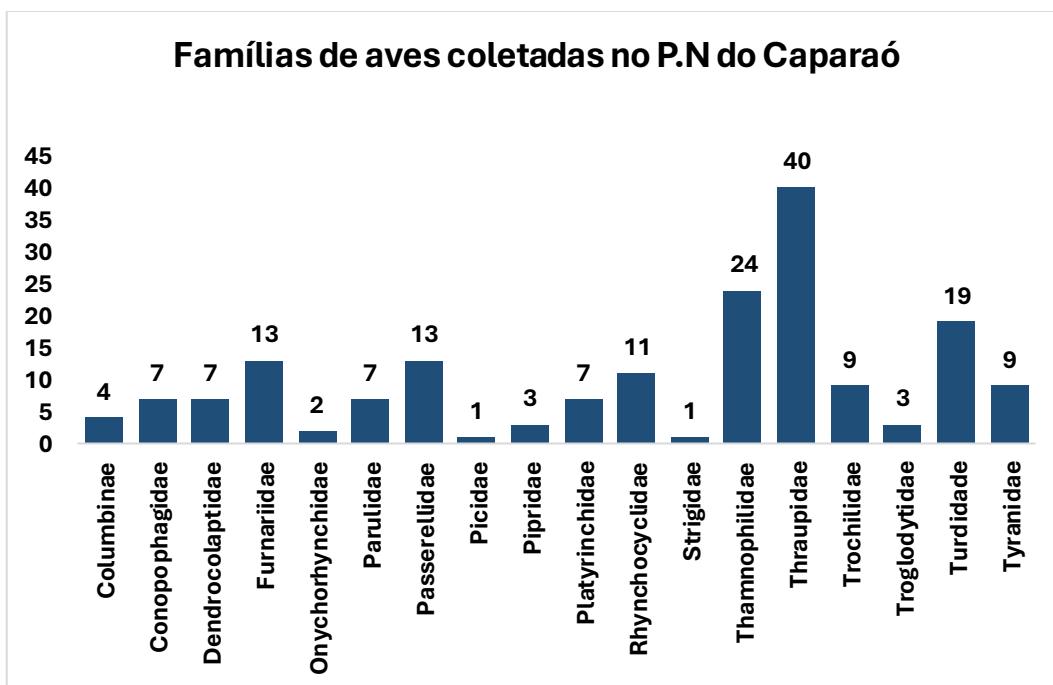


Figura 8: Gráfico da distribuição das famílias de aves coletadas no Parque Nacional do Caparaó

3.3.1 Análises dos esfregaços sanguíneos

Foi registrada a presença de formas evolutivas de parasitos do gênero *Haemoproteus* nos esfregaços sanguíneos de 30 indivíduos dos 586 amostrados, resultando em uma prevalência de infecção por *Haemoproteus* na população de aves estudada de 5,11% (n=74/586)

3.3.2 Análise por qPCR

Já na detecção pela PCR em tempo real, 94 amostras foram diagnosticadas como positivas, obtendo-se uma prevalência de 16,04% (n=94/586).

3.3.3 Análise por nPCR

A *Nested* PCR foi capaz de detectar 140 amostras. Dentre estas, 30 amostras que haviam sido negativas na qPCR, mas positivas no esfregaço sanguíneo, não amplificaram na primeira tentativa de amplificação pela nPCR. Foi necessário aumentar. Entretanto a quantidade de DNA na reação de 2 μ l para 4 μ l, 28 amostras apresentaram positividade como visto na Figura 9.

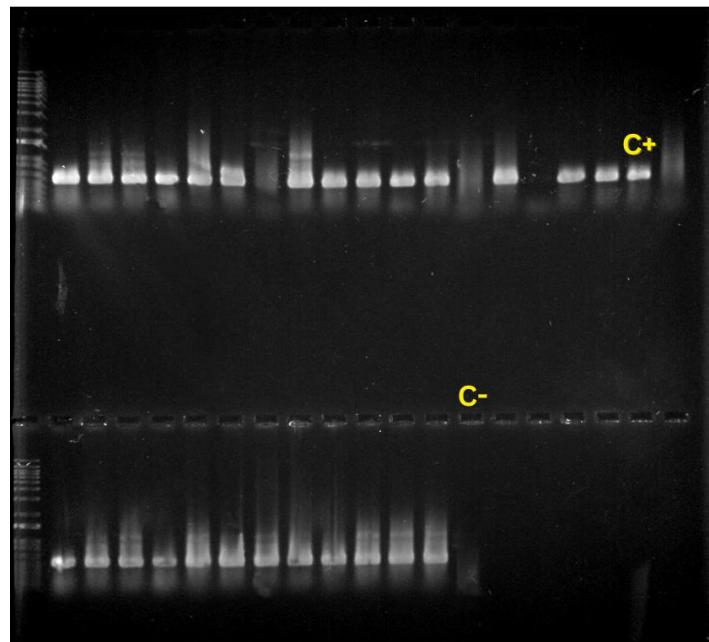


Figura 9: Resultado da nPCR das amostram negativas na qPCR e positivas na lâmina.

3.3.4 Análise filogenética de *Haemoproteus* sp.

As divergências genéticas entre as linhagens utilizadas neste estudo para realizar as análises filogenéticas estão listadas na figura 10.

No clado A, as linhagens apresentaram valores de divergência entre 7,69% a 8,94%. Dentro do clado B, onde foram encontradas as linhagens de *Haemoproteus erythrogravidus*, o percentual de divergência variou entre 8,11% a 8,94%. No clado C, as linhagens apresentaram valores de divergência entre 5,83% a 7,08%. Já as linhagens agrupadas no clado D, onde foram encontradas as linhagens de *Haemoproteus nucleocentralis*, apresentaram divergência genética entre 7,69% e 8,32%. Dentro do clado E, onde foram encontradas as linhagens de *Haemoproteus paraortalidum*, as linhagens apresentaram valores variando de 0 a 0,83%, sendo este o grupo com menor divergência genética entre as linhagens.

Na topologia recuperada através das análises filogenéticas de 38 amostras (Figura 11), foi possível observar diferentes linhagens de *Haemoproteus* isoladas em diferentes hospedeiros. Na análise filogenética as sequências obtidas neste estudo agruparam-se em 6 clados bem suportados. O clado A foi composto por 10 amostras que se agruparam em clado exclusivo, tendo como grupo irmão *H. erythrogravidus*. No clado B, quatro amostras se agruparam no grupo de *H. erythrogravidus*. No clado C, quatro amostras formaram um grupo exclusivo, tendo como grupo irmão *Haemoproteus zosteropis*. Um total de 13 amostras se agruparam no clado de *H. nucleocentralis* (clado D), 5 amostras no clado de *H. paraortalidum* (clado E). Para melhor visualização das linhagens de cada clado, estratificamos a árvore filogenética em clados nos anexos deste trabalho.

Figura 10: Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 479 pb do gene mitocondrial cytb entre diferentes linhagens *Haemoproteus* spp. obtidas a partir de amostras de amostras de sangue de aves silvestres. As análises foram realizadas no software CLC Main Workbench v.7.9. A sequência LEUALB01 foi utilizada como referência.

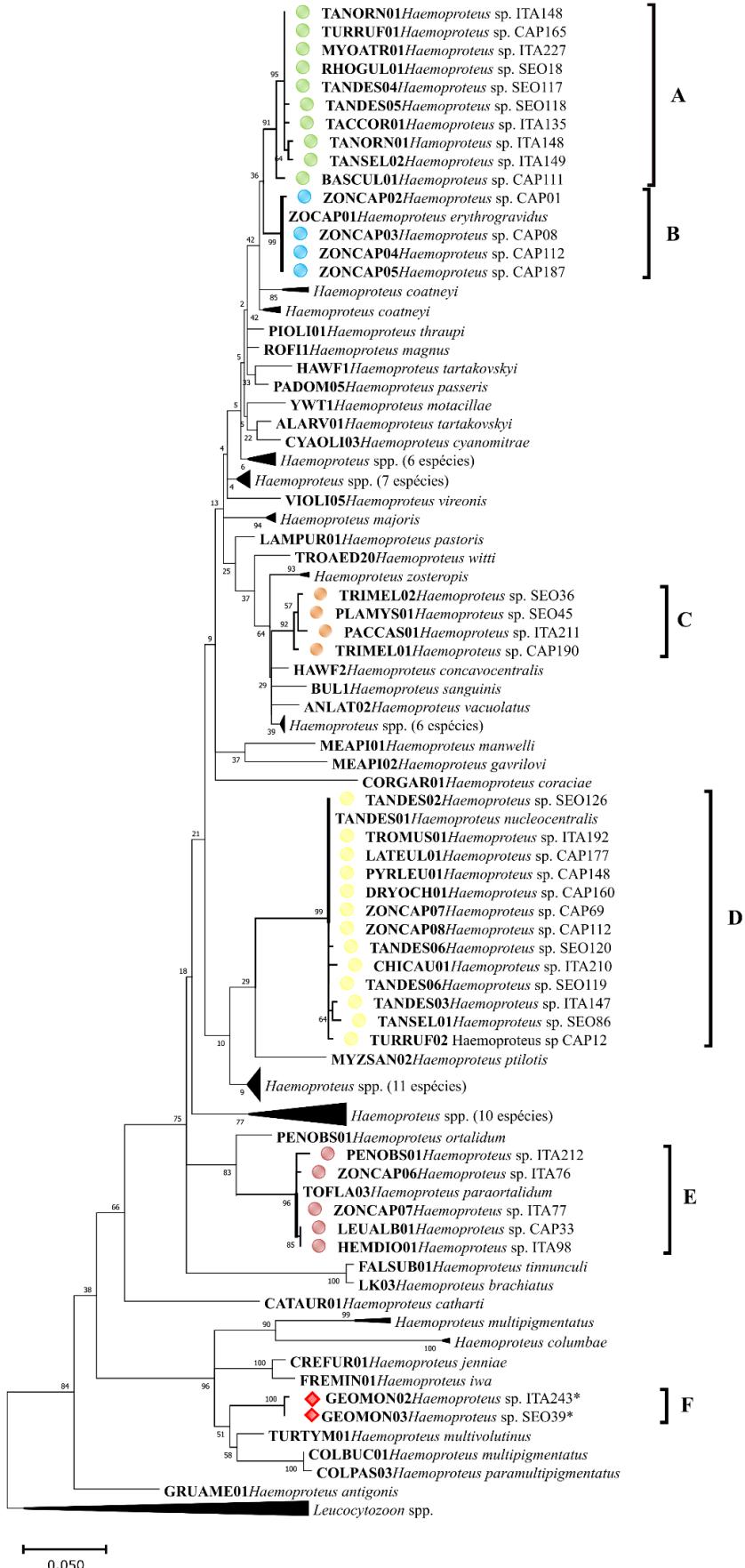


Figura 11: Reconstrução filogenética baseada em um dataset com 477 pares de base da sequência do gene Citocromo b (*cytb*) de espécies do gênero *Haemoproteus*.

O método de reconstrução filogenética foi o Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo General Time Reversible + G + I. O método de Bootstrap com 1000 réplicas foi utilizado para analisar a associação entre os agrupamentos. Sequências de *Leucocytozoon* spp. foram utilizadas como grupo externo. Todas as análises filogenéticas foram conduzidas no software MEGA X. Barra representa 1 substituição por posições de 100 nucleotídeos.

Aves foram capturadas em três níveis de altitude, sendo uma categoria <1000 metros, uma de 1500 metros e outra de 2000 metros. Das 38 amostras sequenciadas, seis linhagens de *Haemoproteus* sp. foram obtidas de aves capturadas abaixo de 1000 metros, 25 linhagens a 1500 m e sete linhagens a 2000 metros. A partir da distribuição de frequência foi possível observar que abaixo de 1000 metros, 66,7% das linhagens foram de *Haemoproteus nucleocentralis* (n=4/6) e 33,3% delas foram do clado A (n=2/6). Já na altura de 1500 metros foi possível observar todos os clados encontrados neste estudo, sendo 32% pertencentes ao clado A (n=8/25), 8% do grupo *Haemoproteus erythrogravidus* (n=2/4), 16% do clado C (n=4/25), 32% do grupo *H. nucleocentralis* (Clado D), (n=8/25) e 4% do grupo *Haemoproteus paraortalidum* (Clado E) (n=1/25). Os outros 8% são referentes a duas sequências de uma nova espécie que no momento da redação desta dissertação estavam em processo de publicação (Clado F) (JARDIM, 2022). E por fim, na altitude de 2000 metros foi possível observar que das linhagens encontradas, 28,6% eram pertencentes ao clado de *H. erythrogravidus* (n=2/7) 14,3% de *Haemoproteus nucleocentralis* (n=1/7) e 57,8% de *Haemoproteus paraortalidum* (n=4/7). Vale ressaltar que as amostras que formaram o clado C só foram encontradas em 1500 metros de altitude (Figura 12).

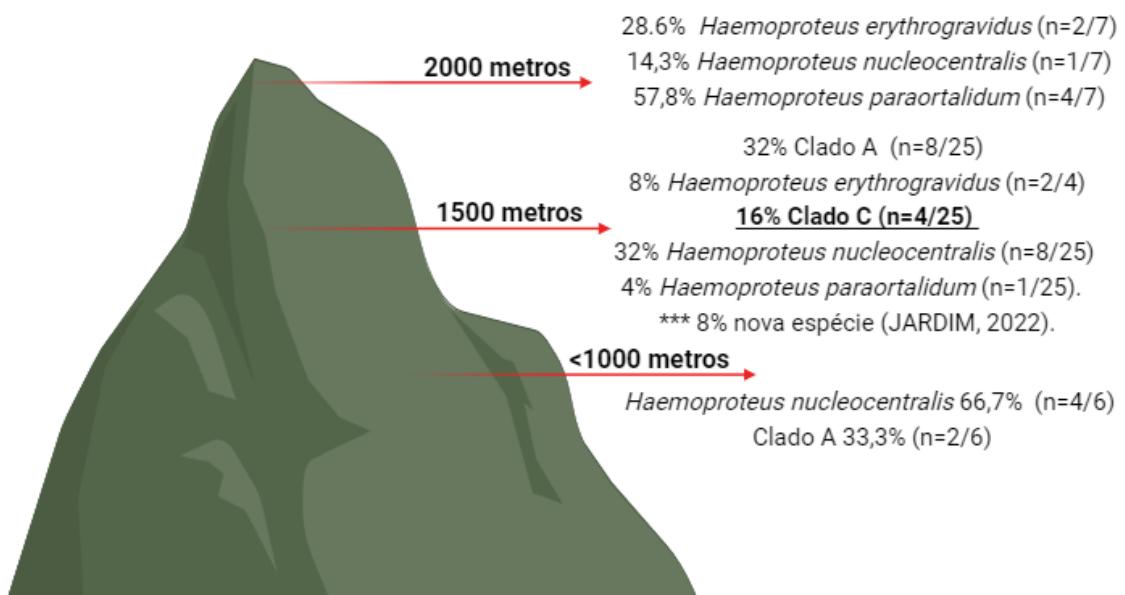


Figura 12: Estratificação altitudinal das linhagens de *Haemoproteus* spp. encontradas em aves selvagens nos Parques Nacionais de Itatiaia, a Serra dos Órgãos e Caparaó da mata atlântica dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Referente as espécies hospedeiras, foi possível observar uma preferência de pela espécie *Zonotrichia capensis* por 100% das linhagens de *Haemoproteus erythrogravidus* (n=4/4). No clado A foi possível evidenciar as seguintes espécies: 10% *Basileuterus culicivorus* (n=1/10), 10% *Myiobius atricaudus* (n=1/10), 10% *Rhopias gularis* (n=1/10), 10% *Tachyphonus coronatus* (n=1/10); 20% *Tangara desmaresti* (n=2/10); 20% *Tangara ornata* (n=2/10); 10% *Tangara seledon* (n=1/10), 10% *Turdus rufiventris* (n=1/10). Já no Clado C, 25% das espécies encontradas eram *Pachyramphus castaneus* (n=1/4), outros 25% de *Platyrinchus mystaceus* (n=1/4) e 50% *Trichothraupis melanops* (n=2/4). No caso do grupo de *Haemoproteus nucleocentralis*, a distribuição de espécies foi de 7,7% de *Chiroxiphia caudata* (n=1/13), 7,7% de *Drymophila ochropyga* (n=1/13), 7,7% de *Hylophilus poicilotis* (n=1/13), 7,7% de *Lathrotriccus euleri* (n=1/13), 7,7% de *Pyriglena leucoptera* (n=1/13), 23,1% de *Tangara desmaresti* (n=3/13), 7,7% de *Tangara seledon* (n=1/13), 7,7% de *Troglodytes musculus* (n=1/13), 7,7% de *Turdus rufiventris* (n=1/13) e 7,7% de *Zonotrichia capensis* (n=1/13). E por fim o grupo de *Haemoproteus paraortalidum* foi composto por 40% de *Zonotrichia capensis* (n=2/5),

20% de *Penelope obscura* (n=1/5), 20% de *Leucochloris albicollis* (n=1/5) e 20% de *Hemitriccus diops* (n=1/5).

A distribuição entre as áreas de conservações amostradas ocorreu da seguinte maneira, 14 delas foram do Parque Nacional de Itatiaia, 14 do Parque Nacional do Caparaó e 10 do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. A distribuição detalhada pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das linhagens de Haemoproteus nos locais de coleta

	<i>Haemoproteus erythrogravidus</i>	<i>Haemoproteus</i> sp. nov.	<i>Haemoproteus nucleocentralis</i>	<i>Haemoproteus paraortalidum</i>	<i>Haemoproteus</i> sp. Clado A	<i>Haemoproteus</i> sp. Clado C
Parque Nacional da Serra dos Órgãos	0%	50% (n=1/2)	30.8% (n=4/13)	0%	30% (n=3/10)	50% (n=2/4)
Parque Nacional de Itatiaia	0%	50% (n=1/2)	23.1% (n=3/13)	80% (n=4/5)	50% (n=5/10)	25% (n=1/4)
Parque Nacional do Caparaó	100% (n=4/4)	0%	46.2% (n=6/13)	20% (n=1/5)	20% (n=2/10)	25% (n=1/4)

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi possível evidenciar uma prevalência geral de 23,89% de *Plasmodium* spp. / *Haemoproteus* spp. (n=14/586) quando associamos dois métodos de diagnóstico, a microscopia óptica e a PCR. Diversos estudos corroboram que a prevalência estimada destes parasitos se mostrou maior quando as duas técnicas foram utilizadas de forma conjunta e não isoladas (GARAMSZEGI, 2010).

No bioma Mata Atlântica, Sebaio et al. (2010) analisou esfregaços sanguíneos de 436 aves a fim de verificar se a prevalência de hemoparasitos nestes animais estaria relacionada a fragmentação do habitat. Os autores encontraram uma prevalência de 12,4% de hemosporídeos.

Fecchio e colaboradores 2017, coletaram 2.661 amostras no bioma amazônico e obtiveram prevalência de apenas 2,4%. No cerrado, Fecchio (2011) encontraram prevalência de 10,8% para *Haemoproteus* e 3,6% para *Plasmodium*. Apesar de vários trabalhos desenvolvidos no bioma Mata Atlântica, as áreas de maior altitude ainda são insuficientemente exploradas.

Rodríguez-Hernández et al. (2021) avaliam a distribuição de hemosporídeos em diferentes níveis de altitude, obtendo prevalência geral de 32,3%. Neste estudo realizado no México, as áreas de coleta variaram de locais a nível do mar até 2800 metros de altitude. Em resumo, os resultados obtidos por Santiago-Alarcon e Marzal (2020) sugerem que parasitos do gênero *Haemoproteus* estão amplamente distribuídos e que os habitats de altitude média a elevada com temperaturas mais frias proporcionam condições ambientais adequadas para esses parasitos.

De forma geral, nos nossos resultados, a qPCR foi mais sensível quando comparada a análise de esfregaço, sendo capaz de detectar mais amostras positivas. Valkiūnas e colaboradores, 2008 destacam o fato de que os exames de esfregaços de sangue muitas vezes subestimam a prevalência da infecção, sobretudo quando a intensidade da infecção é baixa sendo a PCR nestes casos, mais sensível. Além de disso, outros estudos demonstram a sensibilidade das análises moleculares. (RICHARD et al. 2002; WALDENSTRÖM et al. 2004; GARAMSZEGI 2010). Nossos resultados corroboram com os demonstrados por estes autores.

Apesar da popularização do uso da PCR em tempo real em várias áreas, sua aplicação para hemosporídeos aviários ainda está restrita a determinação de parasitemia. (BENTZ, 2006; ZEHTINDJIEV, 2008; KNOWLES, 2011). Friedl, e Groscurth, 2012 relata que seu uso ainda é pouco explorado como ferramenta de triagem em larga escala para DNA de hemosporídeos em amostras de sangue de aves. A pesquisa desenvolvida por Bell e colaboradores (2015) foi responsável por desenvolver uma nova reação de qPCR capaz de detectar três gêneros de hemosporídeos (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*), mesmo em amostras com coinfeção. Além disso, também se mostrou tão efetiva quanto os protocolos de PCR e nPCR já amplamente utilizados na detecção destes parasitos. Como neste estudo somente utilizamos a nPCR para confirmação das positivas na triagem da qPCR não foi possível avaliar se há diferença entre as duas técnicas.

Em contrapartida, outros autores relatam que a PCR pode gerar falsos negativos especialmente em aves com baixa parasitemia e em casos de coinfeções, reforçando a necessidade de também realizar um exame microscópico (VALKIŪNAS et al. 2006, 2009b, MARTÍNEZ et al. 2009, ZEHTINDJIEV et al. 2011). No estudo de Valkiūnas e colaboradores (2009a), o exame microscópico foi mais sensível do que a PCR para a detecção de coinfeções. Outros autores também destacaram a concordância na prevalência de infecção entre análises moleculares e morfológicas (PERKINS e SCHALL 2002, KRIŽANAUSKIENĖ et al. 2006, 2010, HELLGREN et al. 2007, PALINAUSKAS et al. 2007, VALKIŪNAS et al. 2008, 2009a, 2014, BRAGA et al. 2011).

Um dado interessante é que algumas amostras foram positivas no esfregaço sanguíneo, no entanto negativas na qPCR. No estudo de Tostes et al. (2015), também houve amostras positivas na microscopia, mas negativas na PCR. Onde atribuíram essa negatividade ao fato de que as hemácias de aves serem nucleadas e por consequência as amostras extraídas destes animais geram maior concentração de DNA, podendo inibir a PCR gerando falsos negativos. Esses achados corroboram com os descritos por Palinauskas et al. (2013b). Porém, em nossas análises, fizemos a padronização da concentração de DNA das amostras em 60ng/μl e acredita-se que a negatividade na PCR não tenha sido causada pelo excesso de material genético. Além desses, outros estudos também apresentaram resultados similares em suas pesquisas (BEADELL et al., 2004; VALKIUNAS et al., 2006; CANNELL et al., 2013). Entretanto, este não pareceu ser o caso em nosso estudo, já que nossas amostras foram extraídas com qualidade excelente e guardadas de maneira adequada. Só sendo retiradas no freezer na hora de pipetar elas na

reação e já eram guardadas, além disso, as amostras foram armazenadas em cartões FTA® e só extraídas pouco antes das análises de PCR serem iniciadas. Outro ponto importante levantado por Valkiunas et al. (2006) é o fato de que infecções mistas podem acabar resultando na amplificação preferencial do DNA do parasito com maior nível de parasitemia.

As nossas amostras que foram negativas na qPCR e positivas no exame microscópico, foram submetidas a alguns testes utilizando diferente concentrações de DNA das aves na nPCR. Ao todo foram conduzidos três testes e com exceção de duas amostras, todas se mostraram positivas quando aumentamos a quantidade de DNA utilizado para 4 μ l. Acredita-se que neste caso pode ser por conta da baixa parasitemia.

Ademais, acredita-se que haja grande variabilidade genética em hemosporídeos nas áreas de montanhas da Mata Atlântica e que os primers utilizados na qPCR nestes estudos talvez não tenham sido capazes amplificar essas linhagens ainda desconhecidas pela comunidade científica. Dito isso, é de suma importância que utilizem primers que amplifiquem regiões de diferentes genes é necessária, porque um único gene pode ser insuficiente para o diagnóstico.

As linhagens agrupadas no Clado A, este composto por 10 amostras. Sedano-Cruz et al. (2019) fizeram um estudo na Ilha de Gorgona na Colômbia envolvendo a variabilidade genética de hemoparasitos na ilha. Com níveis diferentes de identidade, as linhagens encontradas no presente estudo (BASCUL01, TURRUF01, TANORN01, TANSEL02, TACCOR01, MYOATR01, TANDES04, TANDES05) obtiveram maior proximidade a sequência MF990727.1 depositada no GenBank. Com TACCOR01, MYOATR01, TANDES04 apresentando maior porcentagem de 99,80% de identidade. A linhagem TANORN02 apresentou 99.58% de identidade com a sequência MT724554 depositada por Fecchio et al. (2021). E a linhagem RHOGUL01 apresentou percentual de identidade de 100% com a linhagem MT724554 descrita por estes autores. Porém as linhagens agrupadas neste clado parecem ainda não estar associadas à nenhuma morfoespécie caracterizada.

As linhagens agrupadas no clado B formaram um grupo irmão com as linhagens do clado A. Em estudo desenvolvido por Mantilla e colaboradores em 2016, foi descoberta de uma nova espécie de *Haemoproteus* na Mata Atlântica intimamente relacionado a *Haemoproteus coatneyi*. Neste estudo, várias espécies de aves foram coletadas no Equador e na Colômbia, porém esta nova espécie chamada de *Haemoproteus*

erythrogravidus, só foi observada na espécie *Zonotrichia capensis*. Este estudo corrobora com os achados do presente estudo, já que só conseguimos observar presença de *H. erythrogravidus* na espécie *Z. capensis*. Das quatro linhagens encontradas, todas elas foram oriundas de deste espécies, não sendo encontradas em nenhuma outra.

Marzal et al. (2015) avaliaram que este parasito também está distribuído em outras populações de *Z. capensis* no Peru. Por conta da similaridade morfológica entre *H. coatneyi* e a então nova espécie *H. erythrogravidus*, acreditava-se que as linhagens encontradas em seus estudos eram pertencentes a espécie mais consolidada. Jones e colaboradores 2013, avaliaram a presença de hemosporídeos em diferentes níveis de altitude do Peru, demonstrando positividade para hemosporídeos em altitudes de até <4000 metros acima do nível do mar. Os autores relatam um pico de infecção no transecto de 2000 metros. Nossos achados mostraram que das quatro aves parasitadas por *H. erythrogravidus*, duas foram capturadas a 1500 metros e duas a 2000 metros de altitude, sendo um resultado bastante similar ao encontrado por Marzal et al (2015).

Clado C foi composto por 4 sequências, tendo como grupo mais próximo o grupo de *Haemoproteus zosteropis*. As sequências TRIMEL02, PLAMYS01, TRIMEL01 apresentaram 98,39%, 98,99% e 98,05% de identidade, respectivamente, com a sequência GU252004 descrita por WALSTROM e OUTLAW (2016). Já a PACCAS01 apresentou 99,12% de percentual de identidade com a sequência KU364576.1 depositada no Genbank por. Neste estudo o autor relata que esta sequência está intimamente relacionada a espécie *Haemoproteus tartakovskyi* e forma um clado mais generalista. Até o momento as linhagens agrupadas neste clado também não foram associadas a nenhuma morfoespécie.

O clado D foi composto de 13 amostras que se alinharam intimamente ao grupo de *Haemoproteus nucleocentralis*, essa espécie foi descrita por Anjos e colaboradores, 2021. Neste estudo, a nova espécie de *Haemoproteus* foi descrita em *Tangara desmaresti* do Parque Estadual da Serra do Mar, no estado de São Paulo. Até o momento da redação desta dissertação, de acordo com as informações presentes no banco de dados MalAvi (acessado em outubro de 2023), esse é o único relato de ocorrência desta espécie a nível mundial. Em nossa pesquisa, três parques nacionais diferentes foram amostrados, e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos foram encontrados 4 indivíduos parasitados por *Haemoproteus nucleocentralis*, todos pertenciam a espécie *T. desmaresti*. Levando somente este parque em consideração neste estudo, poderíamos sugerir a possibilidade desta espécie de parasito ser específica a essa espécie. Porém, quando analisamos os

outros locais amostrados, outras espécies de passeriformes também apresentaram linhagens que se agruparam no mesmo clado. No Parque Nacional de Itatiaia só foram sequenciadas 3 amostras e nenhuma delas era pertencente a espécie encontrada por Anjos (2021). As amostras oriundas do Parque Nacional do Caparaó, seguiram o mesmo padrão de Itatiaia, dentre as seis linhagens que se agruparam ao clado de *H. nucleocentralis*, nenhuma das espécies era *T. desmaresti*. Ainda não se tem conhecimento científico disponível na literatura para afirmar se essa nova espécie de hemosporídeo está amplamente distribuída ou não. Neste clado a maioria das sequências obteve percentual de identidade com sequências MT724554.1 depositada por Fecchio et al. (2021) e MF990727.1 depositada por Sedano-Cruz et al. (2019).

Clado E foi composto por *Haemoproteus paraortalidum*, uma linhagem relativamente nova descrita por Ferreira-Junior et al. (2018a) em *Aburria jacutinga* cativa do CRAX - Sociedade de Pesquisa da Fauna Silvestre em Contagem, MG. Os autores relatam ainda que esta mesma sequência já havia sido encontrada por MOTTA et al. (2013), neste mesmo local e na mesma espécie. Além de ter sido detectada por Lacorte et al. (2013) em dois indivíduos de *Tolmomyias flaviventris* amostrados na cidade de Aracruz (ES). Em nosso estudo, foi encontrado um indivíduo parasitado por *Haemoproteus paraortalidum*, este pertencente também integrante da Ordem Galliformes e família Cracidae (FERREIRA-JUNIOR et al. 2018a) contudo a espécie amostrada aqui foi *Penelope obscura*. Sendo esse o primeiro relato de ocorrência desta em território nacional. A linhagem que está intimamente ligada a *H. paraortalidum* é a de *H. ortalidum*, esta última a única espécie de *Haemoproteus* relatada parasitando cracídeos sendo caracterizada a nível morfológico e molecular por Chagas et al. (2017). Estudo desenvolvido por Freitas et al. (2023) encontrou presença tanto de *H. paraortalidum* quanto de *H. ortalidum* numa subespécie de *Penelope obscura* e estes achados corroboram os achados de Chagas et al. (2017). Na Amazônia peruana em estudo envolvendo aves terrestres, González-Olvera et al 2022 encontrou sequências correspondentes a *H. paraortalidum* e *H. ortalidum*.

Além da espécie de cracídeo amostrada em nosso estudo, também observamos ocorrência de *H. paraortalidum* em outras espécies, *Leucochloris albicollis*, *Zonotrichia capensis* e *Hemitriccus diops*, estas ainda sem relatos de ocorrência na literatura disponível. Sendo este o único relato presente na literatura em território nacional.

Nossas sequências LEUALB01 e HEMDIO01 apresentaram percentual de identidade de 99,37% com a sequência de *H. paraortalidum* encontrado por Ferreira-

Junior et al. (2018a) e a encontrada por Lacorte et al. (2013). Já a PENOBS01 apresentou 99,16%, a ZONCAP06 apresentou de tendo 99,58%, ZONCAP07 contou com 99,79% sendo este o maior percentual de encontrado para esse clado.

No clado F se encontram duas amostras que não serão discutidas nesta dissertação, pois estão em processo de publicação (JARDIM, 2022).

Levando em consideração as altitudes de nossas amostras foram coletadas e os dados fornecidos pela construção da árvore filogenética, foi possível perceber uma certa tendência de algumas espécies. Um fato interessante a ser salientado é que as linhagens que se agruparam no clado C, só estavam presentes a 1500 metros de altitude, não sendo encontradas em nenhuma outra altitude amostrada no presente estudo. E foi nessa altitude que houve maior diversidade genética de *Haemoproteus* spp, encontramos representantes de todos os clado mencionados neste estudo.

Esses achados podem estar relacionados com a distribuição dos vetores (Valkiunas, 2005) relatam que existe uma faixa de gradiente de distribuição de vetores de hemosporídeos e com isso amostragem em diferentes níveis de altitude podem favorecer a detecção destes parasitos. Rooyen et al. (2013) relatam que a prevalência de *Haemoproteus* vai aumento de acordo com a elevação do relevo, mas tende a diminuir a níveis maiores que 2000 metros. DOUSSANG et al. (2019) relatam que a prevalência de *Plasmodium* aumentou em altitudes mais baixas, enquanto a prevalência de *Haemoproteus* aumentou em altitudes mais elevadas.

Clark et al. (2014) demonstrou que houve uma tendência para os *hotspots* continentais de diversidade aviária terem estimativas mais altas de riqueza de linhagem em comparação com os *não-hotspots* aviários e áreas oceânicas para *Haemoproteus* spp. Corroborando com nossos achados, onde houve uma grande variabilidade de linhagens para a espécie.

González-Quevedo et al. (2016) encontraram prevalências mais altas de *Haemoproteus* em altitudes mais elevadas com temperaturas mais frias. No total, os resultados sugerem que os parasitos *Haemoproteus* estão amplamente distribuídos (SANTIAGO-ALARCON e MARZAL, 2020) e que os habitats de altitude média e elevada com temperaturas mais frias proporcionam condições ambientais adequadas para o ciclo de vida desses parasitos.

3.5 CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu conhecimento acerca da diversidade genética de *Haemoproteus* sp. em aves selvagens de áreas de diferentes unidades de conservação na Mata Atlântica da região sudeste do Brasil. Através desse, foi possível evidenciar a presença de novas linhagens algumas já descritas a nível de espécie e outras que ainda não foram relacionadas a nenhuma morfoespécie conhecida. Algumas das linhagens encontradas neste estudo foram encontradas em espécies de aves diferentes daquelas que o parasito foi inicialmente descrito.

CAPÍTULO II

4. PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE ARMAZENADO EM CARTÕES FTA®

RESUMO

SILVA, Nelson Meireles. **Padronização de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue armazenado em cartões FTA®.** Capítulo I Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O cartão FTA® é uma matriz de celulose impregnada com um agente caotrópico usado para coletar amostras biológicas e permite coletar amostras sem refrigeração durante o transporte. Diversos protocolos e kits estão disponíveis para extração de DNA, mas a qualidade do DNA isolado influencia diretamente os resultados da pesquisa subsequente. A seleção de um método de extração de DNA ideal deve levar em conta fatores como sensibilidade, consistência, rapidez e facilidade de execução. A literatura carece de evidências suficientes para apoiar a escolha de um método específico para extraer DNA de amostras de sangue total de aves. Foram realizados testes de padronização de extração de DNA a partir dos cartões FTA®. Sangue de Codorna doméstica (*Coturnix coturnix coturnix*) foi coletado e 3 μ L desse foram adicionados a cartões FTA® previamente cortados com punchs estéreis de 3mm. Foram testados 5 protocolos diferentes, cada um com 15 replicatas. Foram eles o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot e Fenol-clorofórmio. A partir de cada extração foi realizada a quantificação e verificação da qualidade do material genético extraído, utilizando aparelhos como o Nanodrop® e Qubit® e eletroforese em gel de agarose. No Nanodrop, o kit da Qiagen apresentou média de 84,05 ng/ μ L e valores de AD_{280/260} e AD_{260/230} tiveram média de 1,88 e 2,06 respectivamente. Já no Qubit 2.0 a média foi de 42,15 ng/ μ L. O kit da Invitrogen dispôs de 89,19 ng/ μ L de média e média dos valores de AD_{280/260} e AD_{260/230} foram 1,90 e 2,43, respectivamente, já no Qubit foi de 73,25 ng/ μ L. No método HotShot só foi possível quantificar através da fluorimetria (Qubit 2.0), tendo média de 6,48 ng/ μ L. Salting out teve como média 33,35 ng/ μ L no Nanodrop, enquanto os valores AD_{280/260} e AD_{260/230} tiveram média de 1,99 e 1,62 e no Qubit a média foi de 18,31 ng/ μ L. O Fenol-clorofórmio obteve de média 6,06 ng/ μ L de DNA e os valores de AD_{280/260} e AD_{260/230} foram 5,67 e 1,49, respectivamente. No Qubit a média foi de 4,43 ng/ μ L. Na eletroforese, todas os métodos apresentaram bandas de íntegras e sem arraste, com exceção do método de HotShot onde não foi possível visualizar material genético. As amostras extraídas protocolo do Kit Comercial “PureLink Genomic DNA Mini” apresentaram características visivelmente melhores quanto aos parâmetros avaliados comparada com as demais, obtendo então melhor resultado e maior eficiência, porém no teste de inibição houve um destaque para o kit da Invitrogen e do método de Salting out pois ambos apresentaram médias de Cq mais baixa (p-valor 0,0568). Porém o kit apresentou menor valor de desvio padrão, sendo então o protocolo indicado nesse estudo, podendo ser utilizado para reações posteriores como a PCR. As amostras extraídas protocolo do Kit Comercial “PureLink Genomic DNA Mini” apresentaram pureza, concentração e integridade do DNA genômico de aves visivelmente melhores quanto comparado com os demais métodos, obtendo então melhor resultado e maior eficiência, sendo, portanto, o protocolo indicado nesse estudo. Este estudo fornece base científica para a extração de DNA genômico de alta qualidade a partir de quantidades tão pequenas quanto 3 μ L de sangue de aves, quando as amostras são armazenadas em cartões FTA®.

Palavras-chave: material genético, kit comercial

ABSTRACT

SILVA, Nelson Meireles. **Standardization of a protocol for genomic DNA extraction from blood stored on FTA® cards.** Chapter I. 2023. Thesis (Master's degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The FTA® card is a matrix of cellulose impregnated with a chaotropic agent used for collecting biological samples, allowing for sample collection without refrigeration during transport. Various protocols and kits are available, but the quality of the isolated DNA directly influences the results of subsequent research. The selection of an ideal DNA extraction method should take into account factors such as sensitivity, consistency, speed, and ease of execution. The literature lacks sufficient evidence to support the choice of a specific method for extracting DNA from whole bird blood samples. Standardization tests for DNA extraction from FTA® cards were performed. Domestic Quail (*Coturnix coturnix coturnix*) blood was collected, and 3µL of it were added to FTA® cards that had been previously cut with sterile 3mm punches. Five different protocols were tested, each with 15 replicates, including the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot, and Phenol-Chloroform methods. After each extraction, quantification and verification of the quality of the extracted genetic material were performed using instruments such as Nanodrop® and Qubit®, as well as agarose gel electrophoresis. In the Nanodrop, the Qiagen kit had an average of 84.05 ng/µl, with average values of AD 280/260 and AD 260/230 at 1.88 and 2.06, respectively. In the Qubit 2.0, the average was 42.15 ng/µl. The Invitrogen kit had an average of 89.19 ng/µl, with average values of AD 280/260 and AD 260/230 at 1.90 and 2.43, respectively. In the Qubit, the average was 73.25 ng/µl. The HotShot method could only be quantified using fluorimetry (Qubit 2.0), with an average of 6.48. Salting Out had an average of 33.35 ng/µl in the Nanodrop, with AD 280/260 and AD 260/230 values averaging 1.99 and 1.62, and an average of 18.31 ng/µl in the Qubit. Phenol-Chloroform yielded an average of 6.06 ng/µl of DNA, with AD 280/260 and AD 260/230 values of 5.67 and 1.49, respectively. In the Qubit, the average was 4.43 ng/µl. In the electrophoresis, all methods showed high-quality bands, except for the HotShot method, where genetic material was not visible. The samples extracted using the Commercial Kit "PureLink Genomic DNA Mini" protocol exhibited visibly better characteristics regarding the evaluated parameters compared to the others, thus achieving better results and greater efficiency. However, in the prevention test, the Invitrogen kit and the Salting out method stood out as both had lower Cq averages (p-value 0.0568). Yet, the kit presented a lower standard deviation value, making it the protocol indicated in this study and can be used for subsequent reactions such as PCR. Therefore, this protocol is recommended in this study and can be used for subsequent reactions such as PCR. This study provides a scientific basis for the extraction of high-quality genomic DNA from quantities as small as 3 µL of bird blood when samples are stored on FTA® cards. This is particularly beneficial for avian research, given the significant variation in sizes and weights among species. In conclusion, protocol standardization plays a crucial role in molecular biology since efficient extraction of genetic material is essential for the success of subsequent analyses.

Keywords: genetic material, molecular diagnosis,

4.1 INTRODUÇÃO

Na coleta de sangue de aves, surgem desafios adicionais devido ao tamanho reduzido desses animais e, consequentemente, ao volume sanguíneo limitado. A quantidade de sangue a ser coletada está diretamente relacionada ao tamanho e peso da ave, assim como à sua condição geral de saúde, conforme destacado por LUMEIJ (1997). Em relação à maioria das espécies de aves, considera-se seguro realizar a coleta de sangue correspondente a aproximadamente 1% ou 2% do peso corporal (CAMPBELL e ELLIS 2007).

Os métodos de extração de DNA seguem alguns procedimentos comuns com o objetivo de alcançar a efetiva ruptura das células, desnaturação dos complexos nucleoproteicos, inativação de nucleases e outras enzimas, remoção de contaminantes biológicos e químicos e, por fim, precipitação do DNA. (TAN et al, 2009). Muitos protocolos foram publicados com relação ao isolamento de DNA a partir do sangue (ANGELINI et al, 2002; ALBARINO, 1994, PARZER, 1994; ROBBINS et al 1995, RUDBECK, 1998). Alguns desses protocolos aplicaram enzimas e solventes orgânicos para obter DNA de alta qualidade, livre de inibidores de PCR, enquanto outros, incluindo procedimentos de precipitação salina, visaram obter rendimentos de DNA mais elevados (CASTELLA et al, 2006; CATTANEO et al, 2007). Assim, alguns protocolos são dispendiosos e consomem tempo, (NASIRI, 2005) enquanto outros comprometem a qualidade do DNA (EL BALI et al, 2014; CHACON-CORTES et al 2012; SANTOS et al, 2010).

Os cartões FTA são matrizes de filtro tratadas quimicamente para extração e armazenamento de DNA (AYE et al., 2011; LANGE et al., 2014; LIANG et al., 2014). O cartão FTA tem sido utilizado para a extração rotineira de ácido nucleico a partir de sangue total, células vegetais, células de cultura de tecidos e microrganismos. Ele imobiliza o DNA para produzir uma estrutura semelhante a uma teia ao redor das matrizes de filtro e protege o DNA da oxidação, nucleases, danos causados pela radiação UV ou contaminação microbiana (BECKETT et al., 2008). Os detritos celulares, inibidores e produtos químicos estabilizadores podem ser facilmente lavados com um tampão de lavagem (GOLDSBOROUGH e FOX, 2006). O DNA pode ser armazenado na forma de manchas secas de sangue total por pelo menos 7,5 anos em temperatura ambiente, eliminando assim a necessidade de equipamento de centrifugação e refrigeração (PEZZOLI et al., 2007). Portanto, com a técnica simples de armazenamento, o cartão

FTA pode ser enviado para os laboratórios para análise subsequente por meio de serviço postal regular, tornando-os uma ferramenta muito atraente para a coleta de amostras nos trabalhos a campo (LANGE et al., 2014; LIANG et al., 2014).

Saber a quantidade e a qualidade do DNA extraído é requisito para alcançar o nível desejado de reproduzibilidade, precisão e eficiência de muitas das técnicas utilizadas na biologia molecular. Como diretriz prática, preparações de DNA com uma razão (A260/A280) entre 1.7 e 2.0. Na quantificação de DNA em eletroforese em gel de agarose, as amostras de boa qualidade formam bandas íntegras, enquanto amostras degradadas ou com presença de moléculas de RNA apresentam rastros ao longo do gel. A quantificação é feita pela comparação entre a intensidade da banda das amostras extraídas e o marcador de massa molecular (*Ladder*) (LEI, 2012).

A padronização assegura que os procedimentos sejam realizados de maneira uniforme, minimizando a variabilidade entre diferentes laboratórios e experimentadores. Isso é crucial para permitir comparações precisas entre estudos e replicação de resultados. Protocolos padronizados reduzem o tempo e os recursos necessários para otimizar constantemente os métodos de extração. Uma vez estabelecido um protocolo eficiente, o trabalho subsequente pode ser executado de maneira mais eficaz. Em resumo, a padronização da extração de DNA é uma prática essencial para a pesquisa científica, promovendo consistência, reproduzibilidade e qualidade dos resultados. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a concentração, pureza e integridade do DNA obtido a partir do sangue coletado de aves selvagens em FTA® Card através dos métodos de Fenol Clorofórmio, Hotshot, Salting Out, DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) e PureLink Genomic DNA mini Kit (Invitrogen®)

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Autorização para coleta de material biológico

As autorizações e licenças necessárias para a coleta e processamento das amostras foram obtidas junto aos órgãos responsáveis, avaliados e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo nº 4863180222) e pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) (nº 68906-1/2020).

4.2.2 Amostragem

Para que a escolha do protocolo de extração fosse mais fidedigna à natureza das amostras, foram feitos testes de padronização de extração de DNA a partir dos cartões de FTA®. Para esta padronização, foi coletado sangue de *Coturnix coturnix coturnix* (Codorna doméstica) através da punção da veia cefálica e 3µL deste sangue foram adicionados à cartões de FTA® previamente cortados com auxílio de *punchs* estéreis de 3mm (Figura 1). Ao todo, 75 cartões foram impregnados com o sanguineo da ave, sendo 15 deles para cada método de extração de DNA. Ao todo foram testados cinco protocolos diferentes, sendo dois kits comerciais e três métodos manuais. Dentre os métodos escolhidos para extração de DNA estão, o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot e Fenol-Clorofórmio.

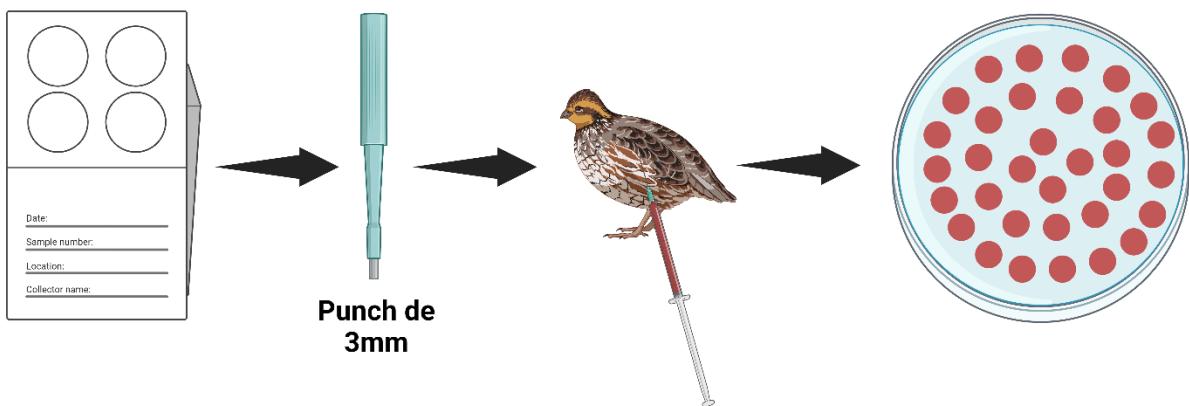


Figura 13: Ilustração do fluxo de atividades feitos para se realizar a padronização (Fonte: Elaborado pelo autor pelo Biorender®).

4.2.3 Processamento inicial

Um ponto importante para a padronização, antes de cada protocolo, as amostras foram preparadas da mesma maneira, elas foram submetidas a um processamento inicial em um disruptor de células e tecidos – L-BEADER 6 (Loccus, São Paulo). As amostras foram acondicionadas em tubos de rosca de 2 mL junto com três *beads* de aço inoxidável e acrescidas de 200 µL de Tampão Fosfato Salino (PBS) e foram submetidas a 2 ciclos de 1 minuto sob agitação de 3400 rpm para que os cartões fosses dissolvidos e assim pudessem ser transferidos para um novo tubo de 2,0 mL. Esse processo foi realizado para diminuir o tempo de incubação das amostras e para descartar a necessidade de se fazer incubação *overnight*.

4.2.4 Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)

No novo tubo contendo o conteúdo dos FTAs dissolvidos, foi pipetado 20 µL de proteinase K (20mg/mL), junto com 200 µL da solução Tampão AL. As amostras foram bem homogeneizadas por vórtex e então incubadas no termobloco sob agitação a 650rpm e a 56°C por 1 hora e 30 minutos (aqui houve modificação no protocolo original que sugere incubação de apenas 10 minutos). Terminado o tempo de incubação, foi adicionado 200 µL de etanol gelado (100%) e as amostras foram novamente bem homogeneizadas por vórtex. As amostras foram então transferidas para as colunas

DNeasy Mini colocada em um tubo de coletor de 2 mL. Feito isso, foram centrifugadas a 6000 x g durante 1 minuto e o tubo coletor foi descartado. As colunas foram colocadas em um novo tubo coletor, foram adicionados 500 µL do Tampão AW1. Feito isso, as amostras foram novamente centrifugadas a 6000 x g durante 1 minuto e o tubo coletor foi descartado. As colunas foram colocadas em novo tubo coletor, adicionados 500 µL de Tampão AW2 e centrifugadas por 3 minutos a 20.000 x g. Os tubos coletores foram descartados e coluna transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, onde o DNA extraído seria armazenado. O DNA foi eluido adicionando 30 µL de tampão AE ao centro da membrana da coluna, incubado durante 1 minuto à temperatura ambiente (25°C) e então centrifugado por 3 minutos a 8.000 x g.

4.2.5 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

No tubo de 2mL, foram adicionados 20µL de Proteinase K (20mg/mL), e 20µL de RNase A. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de tampão Genomic Lysis/Binding, com posterior homogeneização em vórtex. Uma vez homogeneizadas, as amostras foram incubadas no termobloco sob agitação a 650rpm e a temperatura de 56°C, durante 1 hora e 30 minutos (Aqui também houve alteração no tempo de incubação a fim de ser ter um resultado mais comparável com o do outro kit). Feito isso, foram adicionados 200µL de etanol gelado (100%) e as amostras foram vortexadas até sua homogeneização. O lisado foi então adicionado a coluna de sílica contendo tubo coletor, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. O tubo coletor foi descartado e as colunas foram adicionadas em novos tubos coletores. O passo seguinte foi adicionar 500µL da solução Wash Buffer 1 (AW1), seguido de centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Novamente o tubo coletor foi descartado e adicionado um novo a coluna. Em seguida, foram adicionados 500µL da solução Wash Buffer 2 (AW2), as amostras foram centrifugadas a 18.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente, descartando o tubo coletor. A coluna foi então transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Por último foram adicionados 30 µL de Genomic Elution Buffer, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 18.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente.

4.2.6 Salting Out

Em um microtubo de 2mL, foram adicionados 200 µL da solução de lise (400 mM de NaCl; 20 mM de tris-HCl com pH 8; 10 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%. Acrescido de 20 µL de proteinase k (150 mg/ml) a cada tudo e incubados durante 1 hora e 30 minutos em estufa a 60 °C. Terminado o período de incubação, foram adicionados 220 µL de 5 M de NaCl e as amostras foram centrifugadas a 19.000 x g durante 20 minutos. Aproximadamente, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1.5 mL, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol em cada um deles. As amostras foram incubadas a -20°C durante 1 hora e depois centrifugadas por 20 minutos a 19.000 x g. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol gelado 70%, centrifugados por 5 min a 19.000 x g. O etanol foi descartado e os tubos foram invertidos na bancada para secagem por aproximadamente 1 hora. Após secagem, as amostras foram eluidas com 30 µL de tampão de eluição.

4.2.7 HotSHOT

Foram adicionados 75 µL da solução de lise (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA; 40 mM tris-HCl pH 8) e incubadas a 95°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas ao freezer -20 °C por 5 minutos e então foram centrifugadas a 19.000 x g por 5 minutos. O conteúdo foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 75 µl da solução de neutralização (40 µM tris-HCl pH 8). Vale ressaltar que este método de extração não apresenta etapas de lavagem e o material genético fica pronto para ser utilizado logo após a etapa de neutralização.

4.2.8 Fenol-Clorofórmio

Protocolo retirado do site do fabricante dos cartões FTA®

Em microtubo de 2 mL, foram adicionados 500 µL do tampão de extração (10 mM de Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0; 100 mM de cloreto de sódio; e SDS 2%) e 20 µL de proteinase K (20mg/mL). Os microtubos foram vortexados até homogeneizar e incubados a 56° por 1 hora e 30 minutos sob agitação a 650rpm. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume (870 µL) de fenol pH 8.0, levados ao vórtex e centrifugados por 10 minutos na velocidade máxima em microcentrífuga 16.000 x g. O sobrenadante

foi transferido para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio, os tubos foram vortexados vigorosamente e então centrifugados por 10 minutos sob velocidade máxima. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 50 µL de acetato de sódio a 3 M e pH 5.2. Para precipitação do DNA foram adicionados 800 µL de etanol 100%, vortexadas e as amostras foram deixadas no freezer a -20 °C durante 1 hora e 30 minutos. A recuperação do DNA foi feita por centrifugação por 10 minutos na velocidade máxima e descartando o sobrenadante. A lavagem do *pellet* formado foi feita com 1 mL de etanol 70% e centrifugados por 10 minutos na velocidade máxima. Os tubos foram invertidos na bancada para secagem do *pellet* e as amostras foram eluidas em 30 µL de TE.

4.2.9 Quantificação e avaliação de qualidade das amostras

Para determinar a concentração e a qualidade do DNA extraído, foram utilizadas duas metodologias, a espectrofotometria e a fluorimetria. Através da espectrofotometria, a concentração e qualidade das amostras foram analisadas utilizando o Nanodrop (ThermoFisher) e as razões entre as leituras das absorbâncias 260/280nm também foram obtidas. Apenas com uma ressalva que as amostras oriundas do método de HotShot não foram possíveis de serem quantificadas neste equipamento. Já através do método fluorimétrico, a concentração do DNA foi determinada no equipamento Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) utilizando o kit Qubit dsDNA BR assay, seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.10 Eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de avaliar a integridade do DNA extraído por todos os métodos, 40 ng do DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%. A corrida do gel foi realizada durante 60 minutos a 75 volts (5 V/cm). Subsequentemente, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta no fotodocumentador E-Gel® Imager (Life Technology – ThermoFisher Scientific). Em todos os géis foi adicionado 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). O DNA extraído por todos os métodos foram submetidos as mesmas condições de eletroforese, coloração e visualização em transiluminador UV.

4.2.11 Teste de inibição através da qPCR

O teste de inibição foi realizado adicionando ao qPCR um DNA exógeno proveniente da clonagem de *Babesia vogeli*, conforme descrito por Baneth et al. (2009). Uma curva de diluição (5:1) foi construída utilizando DNA extraído de *E. canis* com uma concentração de 60 ng/μl. O penúltimo ponto de amplificação desta curva com uma concentração de DNA de 7×10^{-3} ng/μl foi usado para realizar o teste de inibição. Os valores de quantificação do ciclo (Cq) dos ensaios de qPCR realizados com o DNA obtido a partir de diferentes protocolos de extração foram comparados entre si. O ensaio de qPCR foi realizado em um volume total de 12 μl, utilizando: 1x SYBR Green® Master Mix (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), 0,5 mM do mix de iniciadores, 3 μl de DNA exógeno e 1μl de DNA de codorna adicionado ao qPCR para avaliar a presença de inibidores na reação. As reações de qPCR foram realizadas no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem utilizadas foram 95°C por 20 segundos para desnaturação inicial, 40 ciclos a 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. A linha de limiar foi padronizada entre as placas de qPCR.

4.2.11.1 Criação do controle positivo de *B. vogeli*

Em uma padronização de técnica de qPCR, é necessário ter abundância de controle positivo para realizar todas as reações de validação da técnica, e que ele seja estável, além de cada amostra ter uma quantidade de cópias conhecida, calculada por um método que apresente uma margem de erro mínima. Portanto, foi utilizado o método de clonagem de um fragmento amplificado de DNA contendo o alvo de interesse com um vetor plasmidial (Pgem®-T), inserido em uma linhagem de *E. coli* (DH5-alfa) em um meio ágar LB contendo ampicilina, X-Gal e IPTG para diferenciação das colônias positivas para o plasmídeo modificado.

4.2.11.2 Obtenção da amostra positiva para *B. vogeli*.

A amostra positiva para *B. vogeli* foi cedida gentilmente pela integrante da equipe do laboratório LABVET (UFRRJ) Dra. Agatha Xavier. A amostra havia sido coletada de um animal com histórico de infestação por carrapatos e queixa de inapetência, prostração e urina escura, sendo observadas mucosas ictericas no exame físico e constatada anemia grave ao realizar o hemograma do mesmo, assim como a visualização direta do protozoário no esfregaço sanguíneo. Uma alíquota de 200 μl da amostra de

sangue foi submetida à extração de DNA utilizando o aparelho de extração automática Extracta®16 (Loccus do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil), obtendo-se uma amostra de DNA que foi então congelada a -20 ° C até o próximo passo.

4.2.11.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Todos os iniciadores foram desenhados manualmente através do alinhamento das sequências do gene que codifica para a subunidade 18S do RNA ribossomal de *B. Vogeli* (18S rRNA) no programa MEGA11®: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura, Stecher, and Kumar 2021) obtidas pelo Genbank com os códigos de acesso AY371194.1, AY371195.1 e AY371196.1. Foram escolhidos trechos de 18 a 30 pares de base com um resíduo de citosina ou guanidina na extremidade 3' e com a temperatura de anelamento entre 55 e 60° C, e que não gerassem estruturas secundárias nem se anelassem com eles mesmos ou com o seu par correspondente, sendo essas características analisadas através do programa Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer (RRID: SCR_001363).

4.2.11.4 Amplificação do gene de interesse

Os iniciadores para esta reação (Forward 3'-TTGCTGACCCCTTCAGG-5' e Reverse 3'-GGAAAAGCCACAGTCCG-5') foram utilizados para amplificar um fragmento de 636 pb do gene 18S rRNA de *B. vogeli* em uma reação de PCR convencional com volume total de 25 µL, contendo 2,5 µL de Tampão 10X Platinum® Taq DNA Polymerase, 2,0 µL de cloreto de magnésio a 2,5 mM, 1 µL de dNTPs a 2,5 µM, 1,25 µL da solução de trabalho contendo os dois primers a 10 pmol/µL, 0,2 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase 5 U/µL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 16,05 µL de água ultrapura para PCR e 2 µL da amostra de DNA. As condições de termociclagem foram: pré-aquecimento à 94° C por cinco minutos, 40 ciclos constituídos por três etapas, a primeira de 94° C por um minuto, a segunda de 53° C por um minuto e 15 segundos e a terceira de 72° C por um minuto e 30 segundos, seguidos de uma etapa final de alongamento de sete minutos à 72° C.

4.2.11.5 Avaliação e purificação do produto amplificado

Para avaliar a eficácia da reação, um volume de 5 µL do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando um tampão de corrida Tris-Aacetato EDTA (TAE) (0,5X = 20 mM de Tris-base, 10 mM de ácido acético;

0,5 mM de EDTA – pH 8) em voltagem constante de 5 V/cm durante 45 minutos. A determinação dos tamanhos dos produtos foi feita através da comparação visual com marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, código 13-4007-01, LGC tecnologia, São Paulo, Brasil). Os géis foram corados através de submersão em brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante dez minutos, submergidos em água durante 30 minutos, depois observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume restante foi purificado com o kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega e imediatamente utilizado na reação de ligação com o vetor Pgем®-T.

4.2.11.6 Clonagem em vetor plasmidial

O processo de clonagem com o kit PGem®-T Vector Systems (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) requer a amplificação de um fragmento de DNA contendo a região de interesse para a reação a ser padronizada através de uma enzima que tenha ação de adenilação (adição de um resíduo de adenosina mono fosfato, AMP) no fragmento amplificado, como a Taq DNA Polimerase. Essa condição existe pois o vetor linearizado do kit possui um resíduo de timina livre em cada uma de suas extremidades, possibilitando a ligação do inserto ao vetor na presença da enzima T4 ligase.

A reação de ligação foi realizada utilizando o kit T4 DNA Ligase da Transgen Biotech de acordo com as instruções do fabricante (anexo). A reação foi realizada em duas etapas no termociclador. A primeira, durante três horas à 15° C e a segunda à 4° C até o dia seguinte.

4.2.11.7 Transformação de bactérias E. coli DH5-alfa

O produto da reação de ligação foi utilizado em seguida para a transformação de bactérias E. coli eletrocompetentes, sendo adicionados 2 ul da reação à 50 ul de um concentrado de bactérias previamente produzido e armazenado em glicerol a -80° C. Essa preparação foi pipetada em uma cubeta de eletroporação e colocada no aparelho de eletroporação por micropulso da Bio-Rad®. Após receber o pulso, adiciona-se à cubeta 800 ul de meio SOC de crescimento bacteriano, homogeneiza-se com uma pipeta de 1000 ul e aspira-se o conteúdo, colocando-o rapidamente em um tubo falcon, que por sua vez é colocado em um agitador à 37° C durante uma hora.

4.2.11.8 Preparo do meio sólido e incubação

Durante esse período, foi preparada 50 ml de uma solução de LB sólido, adicionando 50 ul de Xgal a 50 mM, 50 ul de IPTG a 100 mM e 50 ul de ampicilina a 100 mg/ml, sendo este último reagente adicionado após a solução de LB sólido ter esfriado a uma temperatura suportável ao toque, pois esse reagente é termolábil. Esse meio é em seguida vertido igualmente em duas placas de petri estéreis. Após a incubação, 150 ul do conteúdo do tubo falcon é pipetado nas duas placas de petri com o meio LB sólido adicionado de ampicilina, X-Gal e IPTG. As placas foram seladas com esparadrapo e incubadas em uma estufa à 37° C com a placa contendo o meio virada para cima até o dia seguinte.

4.2.11.9 Seleção

No dia seguinte, as placas foram retiradas da estufa e o crescimento bacteriano foi avaliado. O plasmídeo inserido nas bactérias contém um gene para resistência à ampicilina. Este plasmídeo se encontra linearizado antes da reação de ligação, e a integração de um fragmento de DNA ao plasmídeo impede a expressão do gene para a beta-galactosidase, conferindo a cor branca para a colônia. Se o plasmídeo se fechar na reação de ligação sem o fragmento, o gene para a galactosidase se integra e a bactéria transformada passa a ter capacidade de degradar o X gal, conferindo a cor azul à colônia. Portanto, para propagar as colônias brancas, é utilizada uma ponteira de 10 ul, encostando-a na colônia selecionada e transferindo-a para um tubo falcon contendo 5 ml de meio LB líquido com 5 ul de ampicilina a 100 mg/ml. Selecionou-se ao menos três colônias que foram propagadas em tubos falcon distintos que foram incubados em um agitador a 37° C até o dia seguinte (GREEN e SAMBROOK, 2019).

4.2.11.10 Extração de DNA plasmidial e confirmação através de cPCR

O meio de cultura foi submetido à extração de DNA plasmidial com o kit High Pure Plasmid Isolation Kit® (Roche, São Paulo, São Paulo, Brasil). Para a confirmação da presença do fragmento de interesse ao plasmídeo, foi realizada uma PCR convencional com os mesmos iniciadores e nas mesmas condições utilizadas para obter o fragmento utilizado para a clonagem.

4.2.11.11 Quantificação do DNA plasmidial

Para quantificação da amostra de DNA obtida da extração de DNA plasmidial, foi utilizado um método de fluorescência relativa com o aparelho Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachussets, EUA). O valor de quantificação obtido foi colocado na fórmula com o objetivo de estabelecer o número de moléculas na amostra analisada.

4.2.11.12 Linearização do plasmídeo

Devido à formação de estruturas secundárias do plasmídeo (HIGGINS e VOLOGODSKII, 2016), foi necessária suaa linearização com uma enzima de restrição PdmI (Xmn I) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachussets, EUA) para garantir a exposição do alvo na reação de qPCR. A reação de restrição foi realizada segundo as instruções do fabricante, utilizando 500 ng de DNA plasmidial, e incubando a 37 ° C por 3 horas e a 4 ° C por uma hora.

4.2.11.13 Teste de sensibilidade dos iniciadores

A amostra foi diluída de acordo com o cálculo de cópias acima para que chegasse a uma concentração de uma cópia por microlitro na última diluição

4.2.12 Análise estatística

A média dos valores de Cq, da quantificação do Nanodrop® e do Qubit® de cada método de extração foi testada através do método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls, admitindo um erro de 5%. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade, Lilliefors e os dados foram não paramétricos.

4.3 RESULTADOS

Foram extraídas 75 amostras de sangue de codorna doméstica armazenado em cartões FTA®. Sendo 15 replicatas testadas para cada um dos métodos de extração de DNA genômico utilizados no presente estudo. Os métodos testados foram, o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), Salting Out, Hotshot e Fenol-Clorofórmio. As extrações de DNA realizadas com os kits comerciais foram relativamente mais fáceis e rápidas de serem realizadas, pois quase todos os ingredientes já estão presentes dentro dos kits. Além disso, por utilizarem coluna diminuem as chances de se descartar o *pellet* formado no tubo como no caso das extrações manuais. As amostras extraídas através dos protocolos manuais foram mais trabalhosas, pois requerem preparo prévio dos reagentes utilizadas e os mesmos precisam ser feitos com bastante cuidado. Com exceção do HotShot, Salting out e Fenol-Clorofórmio apresentaram tempo de execução bastante superior quando comparados os kits comerciais.

4.3.1 Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)

As amostras extraídas com o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) mostraram valores de concentração entre 40,1 ng/µL e 124 ng/µL, tendo como média 84,05 ng/µL e desvio padrão de 22,9. Enquanto que os valores AD_{280/260} e AD_{260/230} tiveram média de 1,88 e 2,06 respectivamente. Já na quantificação realizado pelo Qubit, a média foi de 42,15 ng/µL e desvio padrão de 12,6. Todos os valores detalhados podem ser analisados na tabela 2.

4.3.2 Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

As amostras extraídas utilizando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) apresentaram valores de concentração entre 41,1 e 140,6 ng/µL, dispondo de 89,19 ng/µL de média e desvio padrão de 27,6. A média dos valores de AD_{280/260} e AD_{260/230} foram 1,90 e 2,43, respectivamente. A média de quantificação no Qubit foi de 73,25 ng/µL e desvio padrão de 54,2 (Tabela 3).

4.3.3 HotSHOT

As amostras extraídas com este protocolo HotShot não foram avaliadas a partir da espectrofotometria pois as amostras extraídas por esse método não podem ser quantificadas pois não há etapa de eluição nesse método, sendo impossível então calibrar adequadamente o equipamento para análise da extração por essa técnica. Sendo assim, só foi possível quantificar através da fluorimetria (Qubit 2.0), tendo média de 6,48 ng/µL e desvio padrão de 5,16 (Tabela 4).

4.3.4 Salting Out

As amostras extraídas com o protocolo Salting Out mostraram valores de concentração entre 40,1 ng/µL e 124 ng/µL, tendo como média 33,35 ng/µL e desvio padrão de 71,7. Enquanto os valores AD_{280/260} e AD_{260/230} tiveram média de 1,99 e 1,62, respectivamente. Já na quantificação realizado pelo Qubit, a média foi de 18,31 ng/µL e desvio padrão de 12,1, todos os valores detalhados podem ser analisados na tabela 5.

4.3.5 Fenol-Clorofórmio

Finalmente, as amostras extraídas utilizando o protocolo de Fenol-Clorofórmio, apresentaram valores de concentração entre 1,7 e 10,7ng/µL dispondendo de 6,06 ng/µL de média e desvio padrão de 2,42. A média dos valores de AD_{280/260} e AD_{260/230} foram 5,67 e 1,49, respectivamente. E a média de quantificação no Qubit foi de 4,43 ng/µL e desvio padrão de 2,02 (Tabela 6).

Tabela 2: Quantificação e frações de pureza do Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen®)

Amostra	Nanodrop ng/µL	Nanodrop 260/280	Nanodrop 260/230	Qubit ng/µL
1	61,3	1,88	2,37	31,3
2	77,0	1,87	2,45	37,1
3	80,6	1,89	2,29	43,0
4	81,2	1,87	1,88	45,8
5	105,6	1,88	1,60	34,4
6	92,1	1,86	2,32	44,3
7	121,9	1,87	1,63	60,7
8	89,6	1,86	21,6	59,7
9	81,5	1,89	2,11	41,7
10	103,5	1,88	2,10	58,2
11	66,6	1,91	2,52	34,5
12	70,4	1,90	1,50	18,5
13	40,1	1,88	1,52	28,5
14	65,4	1,90	2,16	36,7
15	124,0	1,90	2,29	57,8
Média	84,05	1,88	2,06	42,15
Desvio padrão	22,9	0,02	5,06	12,6

Tabela 3: Quantificação e frações de pureza do Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

Amostra	Nanodrop ng/µL	Nanodrop 260/280	Nanodrop 260/230	Qubit ng/µL
46	59,0	1,92	2,22	56,5
47	79,4	1,88	2,59	27
48	98,7	1,93	2,6	16,3
49	41,1	2,0	2,72	25,2
50	59,6	1,94	2,41	63,5
51	126,5	1,89	2,49	99,1
52	102,1	1,87	2,34	58,7
53	94,1	1,89	2,47	46,9
54	87,7	1,89	2,50	143
55	96,6	1,89	2,45	44,6
56	71,5	1,92	2,37	28,4
57	140,6	1,89	2,48	216
58	114,1	1,88	2,25	113
59	112,2	1,82	1,98	110
60	64,2	1,95	2,68	50,5
Média	89,2	1,90	2,43	73,2
Desvio padrão	27,6	0,04	0,19	54,2

Tabela 4: Quantificação do protocolo HotShot pelo Qubit 2.0

Amostra	Qubit ng/µL
31	5,22
32	2,17
33	2,77
34	2,8
35	4,41
36	8,83
37	5,3
38	18,7
39	2,36
40	6,59
41	4,15
42	3,78
43	2,1
44	15,3
45	12,7
Média	6,48
Desvio padrão	5,16

Tabela 5: Quantificação e frações de pureza do protocolo de Salting out

Amostra	Nanodrop ng/µL	Nanodrop 260/280	Nanodrop 260/230	Qubit ng/µL
61	48,0	2,24	0,88	3,5
62	234,0	2,00	1,71	30,8
63	127,0	2,09	1,47	9,1
64	212,0	1,97	1,56	15,6
65	115,0	2,17	1,25	35,4
66	152,0	2,02	1,29	4,55
67	33,1	1,91	1,78	13,2
68	47,2	1,93	2,04	39,6
69	56,6	1,91	1,99	4,89
70	34,4	1,88	1,82	23,9
71	177,0	1,99	1,83	12,9
72	119,4	1,87	1,83	18,5
73	220,0	1,98	1,86	11,4
74	63,1	1,90	1,80	36,4
75	179,0	1,95	1,21	14,9
Média	33,35	1,99	1,62	18,31
Desvio padrão	71,7	0,11	0,33	12,1

Tabela 6: Quantificação e frações de pureza do protocolo de Fenol-Clorofórmio

Amostra	Nanodrop ng/µL	Nanodrop 260/280	Nanodrop 260/230	Qubit ng/µL
16	5,5	2,98	8,7	6,12
17	1,7	-1,9	10,13	4,12
18	3,7	-7,94	4,8	3,8
19	9,3	2,4	7,6	1,85
20	7,1	2,28	9,9	4,11
21	5,9	2,86	6,8	1,6
22	7,0	1,95	8,4	2,56
23	6,2	2,45	11,2	6,01
24	5,9	2,64	8,8	5,03
24	6,9	2,73	14,5	2,73
26	8,3	1,99	9,6	3,08
27	10,7	1,77	13	9,44
28	5,8	3,11	7,7	5,57
29	4,8	7,26	8,3	5,58
30	2,1	56,66	2,8	4,89
Média	6,06	5,67	1,49	4,43
Desvio padrão	2,42	14,5	2,91	2,02

4.3.6 Eletroforese

Na figura 14 é possível observar o gel de agarose com as amostras extraídas com os kits comerciais, o Kit DNeasy Blood & Tissue da Qiagen (A) e o Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen (B). É possível notar que ambos apresentam banda íntegra e de qualidade, sendo as do kit Invitrogen as bandas do Invitrogen um pouco mais intensas.

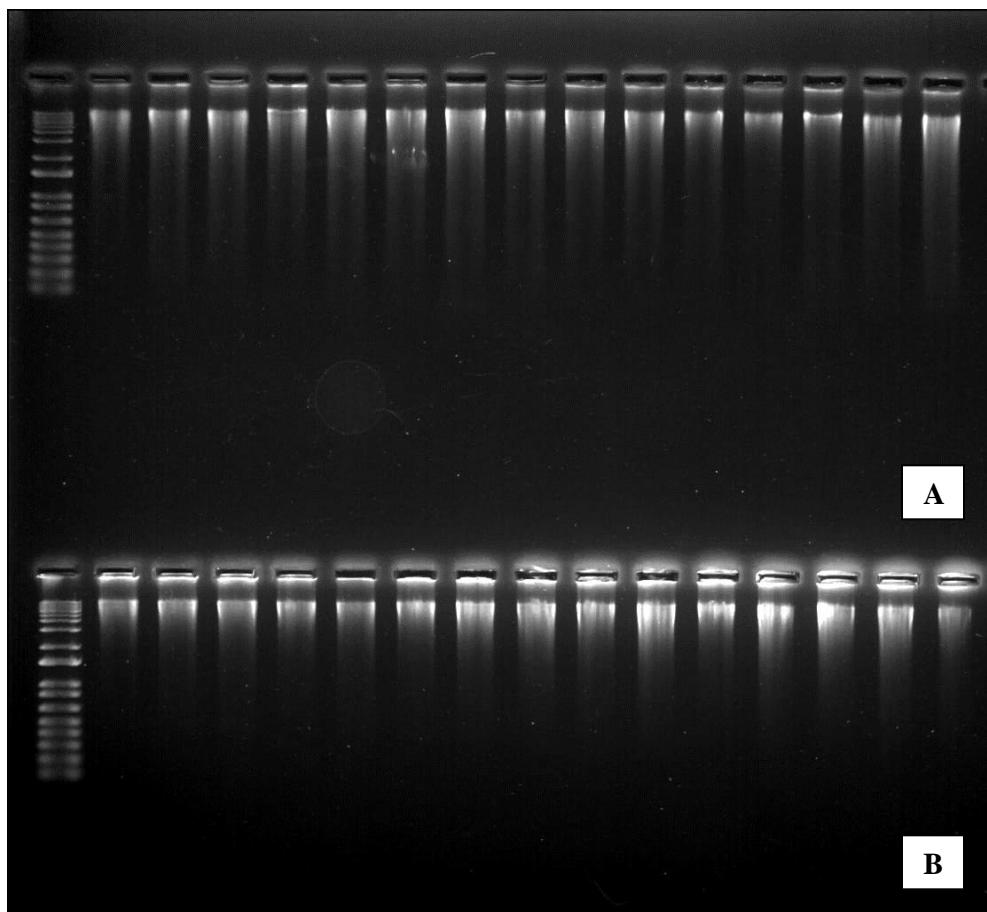


Figura 14: Gel de agarose das bandas de DNA. A – Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen (A) e o PureLink® Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen (B).

Na figura 15, estão as amostras extraídas pelos protocolos orgânicos HotShot (A) e Salting out (B). Como é possível observar, as amostras extraídas pelo protocolo HotShot não foram visualizadas no gel de agarose, estando visível apenas arraste. Em contrapartida, as amostras extraídas com o protocolo Salting out apresentaram boa

qualidade na eletroforese. Elas apresentaram bandas de boa qualidade e de grande intensidade e quase não apresentou arraste.

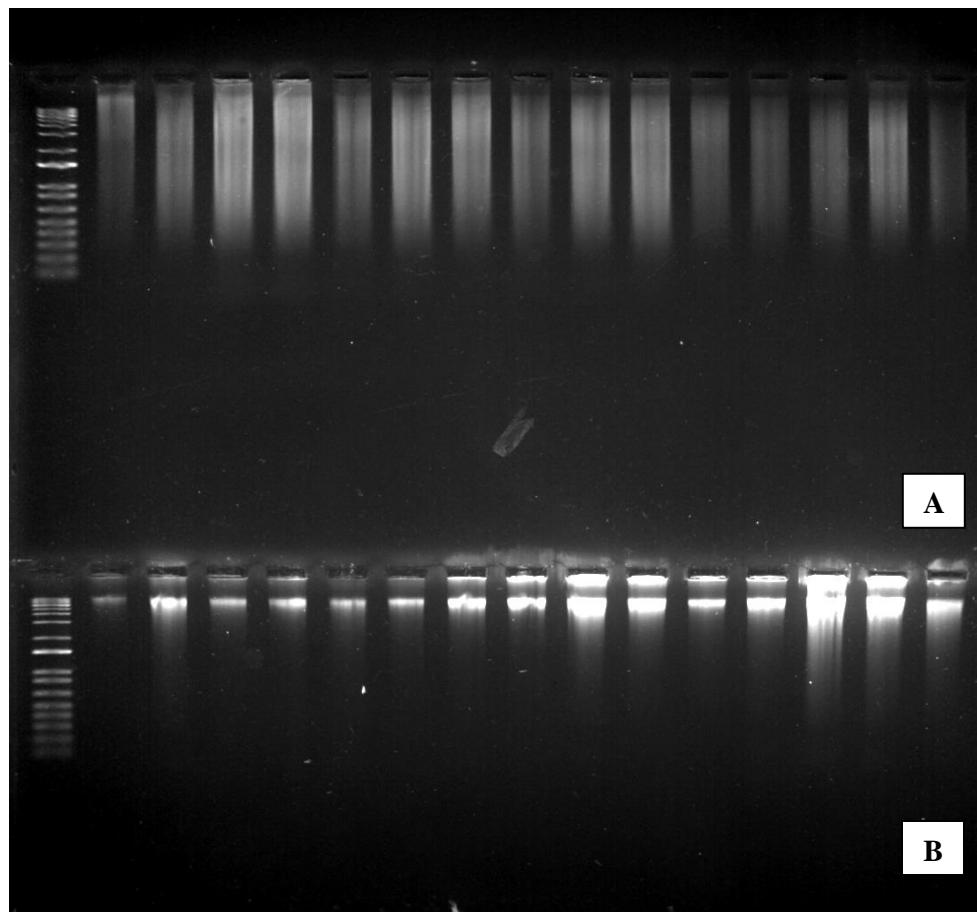


Figura 15: Gel de agarose das bandas de DNA. A – Protocolo HotShot; B – Protocolo Salting out.

E por fim, as amostras extraídas com o método Fenol-clorofórmio (Figura 5) apresentaram bandas únicas e sem arraste com menor intensidade quando comparadas com os outros métodos, sugerindo que a quantidade de DNA nessas amostras é inferior a presente nas outras.

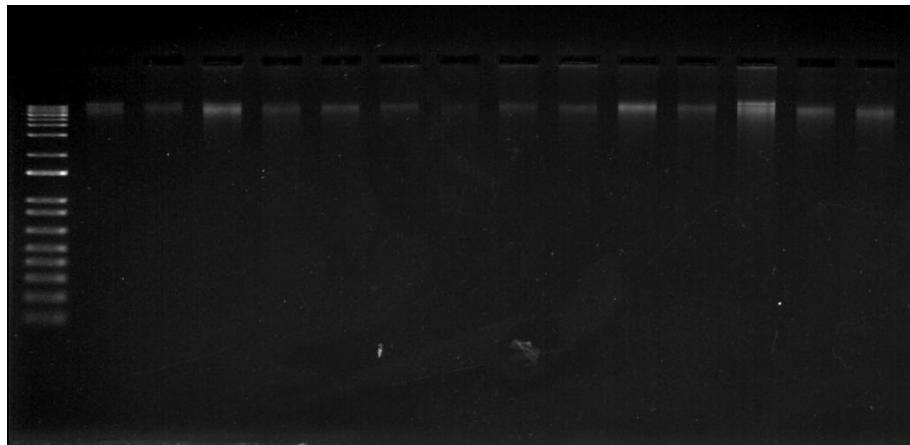


Figura 16: Gel de agarose do protocolo de Fenol-clorofórmio

4.3.7 Análise estatística

Os valores obtidos em cada método de extração foram comparados entre si, sendo calculada a média e o desvio padrão para cada um deles. Levando em consideração os valores obtidos na fluorimetria (Qubit®), os resultados obtidos pelo protocolo Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen foram bastante diferentes dos obtidos pelos métodos de Fenol-clorofórmio e HotShot (p-valor de < 0.0001 para ambos). Comparando os resultados obtidos pelo Kit Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen e do Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen nota-se que os valores de concentração obtidos foram bastante parecidos, sendo considerados estatisticamente iguais (p-valor de 0,5271). Já em comparação entre o Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen e o protocolo de Salting out, os valores de concentração também foram diferentes (p-valor de 0,0079). Os protocolos de Fenol-clorofórmio e HotShot apresentaram valores aproximados de material genômico extraído (p-valor de 0,763), com desvio padrão de 2,4. Os valores obtidos pelo do Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen em comparação com os obtidos pelos do Fenol-clorofórmio e do HotShot foram bastante distintos (p-valor de < 0.0001 em ambos os casos). E por último, na comparação entre os valores obtidos pela extração realizada com Salting out e os do Fenol-clorofórmio, HotShot e Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen, a diferença estatística variou (p-valor de 0,0418, 0,0194 e 0,001 respectivamente).

Os valores obtidos através da espectrofotometria (Nanodrop®) para cada protocolo de extração, com exceção do HotShot, também foram analisados entre si. Comparando os

valores de concentração de DNA obtidos pelo o Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen e os obtidos pelo protocolo de Fenol-clorofórmio foram distintos (p -valor < 0,001). Já os valores do Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen e do Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen podem ser considerados estatisticamente iguais (p -valor de 0,709). Em comparação entre Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen e Salting out forma diferentes estatisticamente (p -valor de 0,02). Já os valores obtidos por Fenol-clorofórmio se comparados com o Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen e com Salting out, apresentaram diferença estatística (p -valor de < 0,001). E entre Kit PureLink® Genomic DNA Mini da Invitrogen e Salting out também houve diferença estatística (p -valor de 0,0475).

4.3.8 Teste de inibição

Os valores de quantificação do ciclo (Cq) dos ensaios de qPCR para detecção de *Ehrlichia canis* realizados com o DNA de ave obtido a partir de diferentes protocolos de extração foram comparados entre si, sendo calculada a média e o desvio padrão para cada um deles. Protocolos de extração com valores de Cq maiores indicam um maior nível de inibição da qPCR (Figura 17).

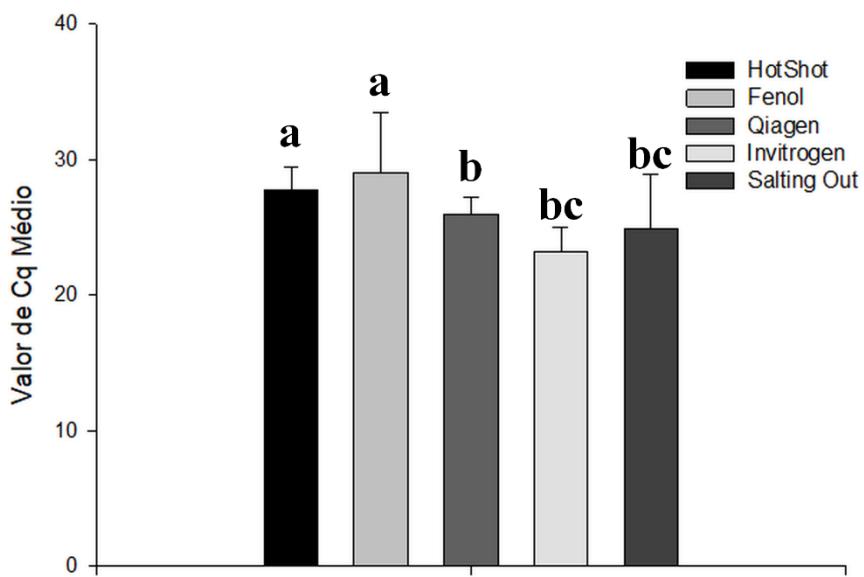


Figura 17: Valores médios do Ciclo de Quantificação (Cq) obtidos a partir da PCR em tempo real com DNA exógeno de *Ehrlichia canis* e amostras de DNA de ave obtidos pelos métodos de extração Hotshot, Fenol-clorofórmio, Qiagen, Invitrogen e Salting Out.

As amostras extraídas pelo método de HotShot (a) apresentaram média de Cq de 27,80 e desvio padrão de 1,61. As que foram extraídas com o protocolo de fenol-clorofórmio (a) obtiveram média de Cq de 29,04 e desvio padrão 4,42. As extraídas com o Dneasy Blood and Tissue Kit da Qiagen apresentou média de Cq de 26,00, tendo desvio padrão de 1,26. O PureLink® Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen apresentou média de Cq de 23,25 e desvio padrão de 1,75. Já as amostras provenientes da extração pelo método de Salting out obtiveram média de Cq de 24,92 e desvio padrão 3,99.

Ambas apresentaram níveis de inibição parecidas, sendo consideradas estatisticamente iguais (*p*-valor de 0,8283). O método de HotShot (a) quando comparado aos demais métodos apresentou maior nível de inibição da qPCR. Entre HotShot (a) e Qiagen (b) houve grande diferença (*p*-valor de 0,0039), entre HotShot e Invitrogen (*p*-valor de < 0,0001) e entre HotShot e Salting out (*p*-valor de < 0,0001). O método de fenoclorofórmio apresentou um maior potencial de inibição quando comparado ao kit da Qiagen (*p*-valor de 0,0077), entre fenoclorofórmio e Salting out e o kit da Invitrogen a

diferença estatística foi ainda maior (p-valor de < 0,0001). Os protocolos Invitrogen e Salting out (bc) foram considerados estatisticamente iguais (p-valor de 0,0568), todavia o protocolo de Salting out apresentou maior desvio padrão (3,99), ao passo que o kit da Invitrogen apresentou desvio de 1,75. Por este motivo, o kit da Invitrogen foi o que demonstrou melhor desempenho no teste de inibição, uma vez que os valores de Cq são mais homogêneos do que aqueles obtidos a partir do método de Salting out.

4.4 DISCUSSÃO

Muito se sabe sobre a importância que o DNA pode fornecer informações valiosíssimas para os pesquisadores, como a identificação de espécies, detecção de táxons, hibridização, análises genéticas de populações e filogenética (ANDREWS et al. 2018). Segundo Smith e Burgoyne (2004) o cartão FTA® é bastante adequado para a coleta e purificação de ácidos nucleicos de amostras biológicas oriundas de uma ampla variedade de espécies de animais silvestres e que essa tecnologia torna a coleta e o armazenamento das amostras muito mais simples. O uso de FTA já está bastante difundido na literatura (PURVIS, 2006; PEROZO, 2007; KEELER, 2012; GONZÁLEZ-OLVERA, 2022; THOMAS, 2022; ALVAREZ-LONDOÑO, 2022; HERDER, 2023; SMITH, 2023;).

GONZÁLEZ-OLVERA et al. (2022) utilizaram três cartões diferentes para coleta de amostras, entre eles Papel de filtro Whatman nº 3, cartões FTA® ou cartões de proteção de proteína. Dos três diferentes cartões de amostragem utilizados neste estudo, os cartões FTA® produziram uma melhor taxa de sucesso nos testes, pelo que a sua utilização é recomendada para estudos futuros.

Para Junior et al. (2015) as menores concentrações de DNA em seu estudo foram obtidas ao utilizar o FTA card no protocolo. Julga-se que esses resultados poderiam ser oriundos da etapa de purificação do DNA, que após as etapas de lavagem para remoção de proteínas e reagentes utilizados no processo, ocorre uma perda de parte do DNA da amostra. Dove et. al., (2010) utilizou em seu estudo a medida de 2 mm de FTA card para coleta e armazenamento do material genético. Na análise da densidade de amostragem, os “punches” classificados como pesados superaram os classificados como leves. Embora o protocolo a base de tecido seco tenha obtido mais sucesso no experimento por Dove et. al., (2010), o FTA Card apresentou um resultado de 63% de sucesso com amostragens de aves. Houve diferença significativa dos resultados entre os protocolos adotados no presente estudo, tanto na quantidade quanto na qualidade do DNA obtido. Verificou-se nesse experimento que o material genético foi extraído com êxito mesmo em baixo volume (3 µl) e a partir de pequenos fragmentos de FTA Card (3 mm). Sendo assim, o comparativo de protocolos a partir de um mesmo tipo de amostra é eficaz para adequar o melhor método de processamento.

As espécies de aves possuem tamanho e pesos extremamente variáveis, sendo assim a escolha de um pequeno fragmento para o fracionamento do FTA Card foi devido a padronização ter sido pensada para obtenção de amostras de DNA provenientes de diferentes espécies de aves silvestres. Dessa forma, Smith e Burgoyne (2004) observaram que o sangue aviário pode realmente conter muito DNA para que mesmo os menores discos perfurados sejam usados diretamente em reações de PCR porque contém glóbulos vermelhos nucleados e pode criar um desafio para o DNA mitocondrial. Segundo Thomas et. al., (2022), todos os formatos de FTA Card capturam ácidos nucleicos e os preservam à temperatura ambiente, tornando este sistema ideal para coleta de amostras em campo e preservação durante o armazenamento e transporte. Dove et. al., (2010) considerou em seu estudo o FTA Card como método de coleta, transporte, armazenamento e purificação de DNA de aves com objetivo de identificar espécies de aves, o que é fundamental para implementação de todas as questões de manejo e mitigação envolvendo colisões entre aves e aeronaves (colisões de aves). Levando isso em consideração, a padronização dos protocolos para a extração do DNA obtido a partir do sangue dessas aves se faz necessária visto que a literatura acerca desse tema é escassa e carece desse tipo de estudo.

A relação 230/280 é considerada um parâmetro que avalia o nível de pureza da amostra, sendo assim os valores de razão de absorbância precisam estar em torno de 1,8, até 2 no máximo, quando superiores ou inferiores a esse padrão significa que ocorreu contaminação na amostra. Quando esses valores não estão satisfatórios, não deve ser feita a PCR dessas amostras. Caldart et. al., (2011) observou que a pureza relacionada a proteínas em extração de FTA Card foi de 1,84, apresentando então um padrão inferior ao do experimento em questão onde a média

Para Senne et al. (2022), o método de extração que apresentou a melhor qualidade de DNA foi o fenol-clorofórmio, demonstrando que este protocolo de extração de DNA pode ser aplicado em investigações científicas para extrair material genético de flebotomíneos não ingurgitados e avaliar essas amostras individualmente. Porém no presente estudo o protocolo fenol-clorofórmio apresentou grau de pureza insatisfatório e baixa quantificação de material genético.

Em contrapartida, Posnett et. al., (1991), a extração do DNA pelo método que utiliza o fenol-clorofórmio pode acarretar em perda do material genético, podendo gerar resultados falso-negativos. No presente trabalho de fato a extração pelo protocolo fenol-

clorofórmio não foi satisfatória, resultando em um rendimento de DNA com baixa quantificação e baixa qualidade do material extraído em comparação às demais técnicas.

Caldart et. al., (2011) em seu estudo utilizou para eluir a partir de amostras de FTA Card um volume indicado pelo fabricante de 200 µl e obteve um percentual de amplificação e contração de DNA significativamente maior do que amostras em que o DNA foi eluído em volume de 50 µl. Porém no presente estudo, na etapa de eluição que precede a quantificação via espectrofotômetro, foram utilizados volumes de 30 µl para eluir a amostra, sendo este fracionado em 15 µl com centrifugação por 3 minutos e repetição desse processo. A quantificação a partir dessa eluição, mesmo que em volume baixo, foi satisfatória, apresentando um valor padrão de DNA extraído.

Para Mullis (1990), o DNA extraído deve permanecer em sua forma íntegra ou viável durante o maior período de meses possível para que de uma única extração possam ser aproveitadas as amostras obtidas em diversas atividades pelo laboratório de pesquisa, desde amplificação por PCR até mesmo o uso de marcadores moleculares. Sendo assim, o protocolo de HotShot não apresenta benefícios visto que as amostras obtidas por esse método de extração possuem uma curta vida útil do DNA extraído.

A avaliação referente ao tempo despendido para realização de cada protocolo também é de grande importância para o estudo comparativo visto que um menor tempo resulta em menor degradação do material. Sendo assim, o método HotShot apresentou o menor tempo de processo com aproximadamente 40 minutos, porém não apresentou bons resultados nos demais parâmetros, seguido do kit comercial demonstrou ser um método rápido e eficaz totalizando aproximadamente 1 hora total, após teria o protocolo de Salting out e finalizando com fenol-clorofórmio que necessitou da maior carga horária para realização e na alteração de tempo referente a esse protocolo, ele não apresentou resultado eficaz.

Em um estudo que comparou diversos protocolos de extração de DNA em aves, conduzido por Júnior et al. (2015), foi observado que os protocolos que incluíam etapas de purificação do material genético, em média, resultavam em concentrações de DNA mais baixas quando comparados aos protocolos que se encerravam com a etapa de lavagem. No entanto, as amostras com concentrações de DNA mais elevadas tendiam a ter níveis significativamente menores de pureza. Isso poderia resultar em uma menor durabilidade do DNA extraído e, ao mesmo tempo, tornar mais desafiante a amplificação

da região de interesse através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém, no presente estudo foi testado um método que não utiliza lavagem para purificação do material genético, porém o HotShot não gerou quantidade de DNA significativa.

Sendo assim, no presente estudo foram avaliados comparativamente dois parâmetros a partir das amostras extraídas do DNA por cinco diferentes protocolos, e foi observado sobre a qualidade e a integridade do material genético, que são índices de suma importância para o êxito da otimização da PCR. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que essa avaliação comparativa dos protocolos é de grande importância para principalmente para a área da Biologia Molecular otimizando então a técnica de extração de DNA a partir do sangue de aves em FTA Card. As amostras extraídas protocolo do Kit Comercial “PureLink Genomic DNA Mini” apresentaram características visivelmente melhores quanto aos parâmetros avaliados comparada com as demais, obtendo então melhor resultado e maior eficiência, sendo então o protocolo indicado nesse estudo, podendo ser utilizada para reações posteriores como a PCR.

4.5 CONCLUSÃO

As amostras extraídas protocolo do Kit Comercial “PureLink Genomic DNA Mini” apresentaram pureza, concentração e integridade do DNA genômico de aves visivelmente melhores quanto comparado com os demais métodos, obtendo então melhor resultado e maior eficiência, sendo, portanto, o protocolo indicado nesse estudo, podendo ser utilizada para reações posteriores como a PCR. Este estudo fornece base científica para a extração de DNA genômico de alta qualidade a partir de quantidades tão pequenas quanto 3 µL de sangue de aves, quando as amostras são armazenadas em cartões FTA®. Conclui-se que a padronização de protocolos desempenha um papel fundamental na biologia molecular, uma vez que a extração eficiente de material genético é essencial para o sucesso das análises subsequentes.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados encontrados aqui aumentam o conhecimento geral sobre a diversidade genética de parasitos do gênero *Haemoproteus* em áreas da Mata Atlântica altimontana. Contribui também para o aperfeiçoamento das técnicas moleculares a fim de ser desenvolver marcadores moleculares mais fidedignos a diversidade encontra em nosso território. Além disso, o presente estudo foi capaz de fornecer dados suficientemente embasados para escolha de um método de extração de DNA genômico de aves selvagens sendo evidenciado por meio deste, que uma quantidade tão pequena quanto 3 µL de sangue serem suficientes para uma boa extração de DNA quando essas amostras são armazenadas em cartões FTA®.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIZER, S.; FOUFOPOULOS, J.; GAGER, A. Diseases and conservation. Encyclopedia of Biodiversity. **Academic Press**, v. 2, p. 10 –126, 2001.
- ALVAREZ-LONDOÑO, Johnathan et al. Avian haemosporidian (Haemosporida: *Plasmodium* and *Haemoproteus*) in the department of Arauca, Colombian Orinoquia region. **Parasitology Research**, v. 121, n. 6, p. 1775-1787, 2022.
- ANJOS, C.; CHAGAS, C.; FECCHIO, A.; SCHUNCK, F.; COSTA-NASCIMENTO, M.; MONTEIRO, E.; MATHIAS, B.; BELL, J.; VALKIUNAS, G.; KIRCHGATTER, K. Avian Malaria and Related Parasites from Resident and Migratory Birds in the Brazilian Atlantic Forest, with Description of a New *Haemoproteus* Species. **Pathogens**, v. 10(2), p. 103–110, 2021.
- ANJOS, Carolina C. et al. Avian malaria and related parasites from resident and migratory birds in the Brazilian Atlantic Forest, with description of a new *Haemoproteus* species. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 103, 2021.
- ATKINSON, C.T. & VAN Riper III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. Bird-parasite interactions. Oxford, **Oxford University Press**, p. 19–48, 1991.
- ATKINSON, C.T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. Parasitic Diseases of Wild Birds. **John Wiley & Sons**, 2008. 608p.
- ATKINSON, C.T.; 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.
- AYE KS, Matsuoka M, Kai M, Kyaw K, Win AA, Shwe MM et al. FTA card utility for PCR detection of Mycobacterium le- prae. *Jpn. J Infect. Dis.* 2011;64(3):246-248
- BAIROLIYA, Sakcham; KOH ZHI XIANG, Jonas; CAO, Bin. Extracellular DNA in environmental samples: Occurrence, extraction, quantification, and impact on microbial biodiversity assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 3, p. e01845-21, 2022.

BARBARÁ, T.; MARTINELLI, G.; FAY, M.F.; MAYO, S.J.; LEXER, C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude "inselbergs" *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1981–1992, 2007.

BARINO, G.; ROSSI, M.; OLIVEIRA, L.; REIS, J.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. *Haemoproteus syrnii* (Haemosporida: Haemoproteidae) in owls from Brazil: morphological and molecular characterization, potential cryptic species, and exo-erythrocytic stages. **Parasitology Research**, v. 120(1), p. 243–255, 2021.

BEADELL, Jon S.; FLEISCHER, Robert C. A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 683-685, 2005.

BEADELL, Jon S.; FLEISCHER, Robert C. A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 683-685, 2005.

BECKETT SM, Laughton SJ, Pozza LD, McCowage GB, Marshall G, Cohn RJ et al. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiologic studies examining paediatric populations. **Am. J Epidemiol.** 2008;167(10):1260-1267.

BEJČEK, Vladimír; ŠTASTNÝ, Karel. **Enciclopédia das Aves: as várias espécies e seus habitats**. Livros e Livros, 2002.

BELL, J.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; TKACH, V. "Haemosporidian Parasites of Chilean Ducks: the Importance of Biogeography and Nonpasserine Hosts," **Journal of Parasitology**, v. 106(2), p. 211-220, 2020.

BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T.; REIS, S.E.; RICKLEFS, R.O.; BRAGA, E.M. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct Cerrado habitats in Brazil. **PLoS ONE**, v. 6(3), e17654, 2011.

BENNET, G. & LOPES, O. S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 117–134, 1980.

BENNETT, G. F.; GARNHAM, P.C.C.; FALLIS, A.M. On the status of the genera Leucocytozoon Ziemann, 1898 and Haemoproteus Kruse, 1890 (Haemosporidiida:

Leucocytozooidea and Haemoproteidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 43, p. 927–932, 1965.

BENNETT, G.; PIERCE, M. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). **J Nat Hist**, v. 24, p. 311-325, 1990.

BENSCH S, HELLGREN O. The use of molecular methods in studies of avian haemosporidians. In: Santiago-Alarcon D, Marzal A, editors. Avian malaria and related parasites in the tropics: ecology, evolution and systematics. Berlin: Springer; 2020. p. 113–36.

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.

BENSCH, S.; PÉREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, v. 58, p. 1617–1621, 2004.

BENTZ, S. et al. Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. **Parasitology**, v. 133, n. 6, p. 685-692, 2006.

BOOM R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**. 1990;28(3):495–503.

BRAGA EM, SILVEIRA P, BELO NO, VALKIŪNAS G. Recent advances in the study of avian malariae: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2011;106(1):3–11.

BRAGA, E.M.; BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T. **Técnicas para estudos de hemoparasitos em aves. Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, p. 395–412, 2010.

BUSH, A.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al., revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83(4), p. 575–583, 1997.

CAMPBELL, T.W. **Avian haematology and cytology**. Ames: Iowa State University Press, p. 104, 1995.

CAMPBELL, Terry W.; ELLIS, C. K. **Hematology of birds**. Veterinary hematology and clinical chemistry, p. 225-258, 2007.

CANNELL, B. L. et al. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 74-84, 2013.

CEDROLA, F.; MARTINELE, I.; SENRA, M.; FURTADO, E.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. Rediscovery of *Plasmodium* (Huffia) *huffi* (Apicomplexa, Haemosporida): a lost lineage from toucans. **Parasitology Research**, v. 120, p. 3287–3296, 2021.

CHACON-CORTES, D., & Griffiths, L. R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, 1-9.

CHAGAS, C.R.F.; GUIMARÃES, L.O.; MONTEIRO, E.F.; VALKIŪNAS, G.; KATAYAMA, M.V.; SANTOS, S.V.; GUIDA, F.J.V.; SIMÕES, R.F.; KIRCHGATTER, K. Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. **Parasitology Research**, v. 115(4), p. 1443–1452, 2015.

CHAGAS, C.R.F; VALKIŪNAS, G.; GUIMARÃES, L.O.; MONTEIRO, E. F.; GUIDA, F.J.; SIMÕES, R.F; RODRIGUES, P.T.; LUNA, E.J.A.; KIRCHGATTER, K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria Journal**, v. 16(83), p. 1–20, 2017.

CHATHURANGA, W.; KARUNARATNE, S.; FERNANDO, B.; DE SILVA, W.P.P. Diversity, distribution, abundance, and feeding pattern of tropical ornithophilic mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 43, p. 158–167, 2018.

CHAVES, A.V.; FREITAS, G.H.S.; VASCONCELOS, M.F.; SANTOS, F.R. Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountaintops: a review. **Systematics and Biodiversity**, v. 13, p. 1–16, 2015.

CLARK, N.J.; CLEGG, S.M.; LIMA, M.R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. **International Jounal for Parasitology**, v. 44(5), p. 329–338, 2014.

CLARK, Nicholas J.; CLEGG, Sonya M.; LIMA, Marcos R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights

from molecular data. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 5, p. 329-338, 2014.

COELHO, E. G. A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 111-115, 2004.

DE FREITAS, Rafaela Venançoni Matoso et al. Insights on the taxonomy of *Haemoproteus* parasites infecting cracid birds. **Parasitology International**, v. 94, p. 102730, 2023.

DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D.A.; DE JUANA, E. **Handbook of the Birds of the World Alive**. Lynx Edicions, Barcelona, 2018.

DEVELEY PF, DA SILVA JMC. **Birds of the Atlantic Forest of Brazil: status and conservation**. São Paulo: Editora Horizonte; 2003.

DIMITROV, D.; ZEHTINDJIEV, P.; BENSCH, S.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T.; VALKIŪNAS, G. Two new species *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporida, Haemoproteidae) from European birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. **Systematic Parasitology**, v. 87, p. 135–151, 2014.

DOUSSANG, Daniela et al. Spatial distribution, prevalence and diversity of haemosporidians in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2019.

EJIRI, H.; SATO, Y.; KIM, K.S.; TSUDA, Y.; MURATA, K.; SAITO, K.; WATANABE, Y.; SHIMURA, Y.; YUKAWA, M. Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro Wetland, a subarctic zone of Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 48(4), p. 904–908, 2011.

FECCHIO, A.; BELL, J.A.; BOSHOLN, M.; VAUGHAN, J.A.; TKACH, V.V. et al. An inverse latitudinal gradient in infection probability and phylogenetic diversity for *Leucocytozoon* blood parasites in New World birds. **Journal of Animal Ecology**, v. 89(2), p. 423–435, 2019.

FECCHIO, A.; BOSHOLN, M.; TKACH, V.V.; BELL, J.A. First Record of *Leucocytozoon* (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: evidence for rarity in neotropical lowlands or lack of sampling for this parasite genus? **Journal of Parasitology**, v. 104(2) p. 168–172, 2017.

FECCHIO, A.; CHAGAS, C.R.F.; BELL, J.A.; KIRCHGATTER, K. Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. **Acta Tropica**, v. 204, e105364, 2020.

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

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

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

FECCHIO, Alan et al. Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 9, p. 719-728, 2021.

FERRAGUTI, M.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; BEN SCH, S.; ROIZ, D.; RUIZ, S.; VIANA, D.S.; SORIGUER, R.C.; FIGUEROLA, J.; DUNN, J. Ecological determinants of avian malaria infections: An integrative analysis at landscape, mosquito and vertebrate community levels. **Journal of Animal Ecology**, v. 87, p. 727–740, 2018.

FERREIRA-JUNIOR, Francisco C. et al. *Haemoproteus paraortalidum* n. sp. in captive Black-fronted Piping-guans *Aburria jacutinga* (Galliformes, Cracidae): high prevalence in a population reintroduced into the wild. **Acta tropica**, v. 188, p. 93-100, 2018.

FILION, A.; DESCHAMPS, L.; NIEBUHR, C.N.; POULIN, R. Anthropogenic landscape alteration promotes higher disease risk in wild New Zealand avian communities. **PLoS ONE**, v. 17(3), e0265568, 2022.

FRIEDL, Thomas WP; GROSCURTH, Elisabeth. A real-time PCR protocol for simple and fast quantification of blood parasite infections in evolutionary and ecological studies and some data on intensities of blood parasite infections in a subtropical weaverbird. **Journal of Ornithology**, v. 153, p. 239-247, 2012.

GARAMSZEGI, L.Z.; ZAGALSKA-NEUBAUER, M.; CANAL, D.; MARKÓ, G.; SZÁSZ, E.; ZSEBŐK, S.; SZÖLLŐSI, E.; HERCZEG, G.; TÖRÖK, J. Malaria parasites,

immune challenge, MHC variability, and predator avoidance in a passerine bird, **Behavioral Ecology**, v. 26(5), p. 1292–1302, 2015.

GARAMSZEGI, László Zsolt. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.

GARCIA-LONGORIA, L.; HELLGREN, O.; BENSCH, S.; DE LOPE, F.; MARZAL, A. Detecting transmission areas of malaria parasites in a migratory bird species. **Parasitology**, v. 142(9), p. 1215–1220, 2015.

GARCIA-LONGORIA, L.; MØLLER, A.P.; BALBONTÍN, J.; DE LOPE, F.; MARZAL, A. Do malaria parasites manipulate the escape behaviour of their avian hosts? An experimental study. **Parasitology research**, v. 114(2), p. 4493–4501, 2015.

GARNHAM, P.C. **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 1132, 1966.

GIL-VARGAS, D.L. & SEDANO-CRUZ, R.E. Genetic variation of avian malaria in the tropical Andes: a relationship with the spatial distribution of hosts. **Malaria Journal**, v. 18(129), p. 1–9, 2019.

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

GOLDSBOROUGH, Mindy D, Donna K. Fox. "Methods for the storage and synthesis of nucleic acids using a solid support." U.S. Patent 7122304, 2006.

GONZÁLEZ QUEVEDO, Catalina; PABÓN VIDAL, Adriana Lucía; RIVERA GUTIÉRREZ, Héctor Fabio. Prevalence of haemosporidians in a Neotropical endemic bird area. 2016.

GONZÁLEZ-OLVERA, Merit et al. Haemosporidians from a Neglected Group of Terrestrial Wild Birds in the Peruvian Amazonia. **Ecohealth**, v. 19, n. 3, p. 402-416, 2022.

GONZALEZ-QUEVEDO, C.; DAVIES, R.G.; RICHARDSON, D.S. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. **Journal of Animal Ecology**, v. 83, p. 1091–1102, 2014.

GRAHAM, C.H.; CARNAVAL, A.C.; CADENA, C.D.; ZAMUDIO, K.R.; ROBERTS, T.E.; PARRA, J.L.; MCCAIN, C.M.; BOWIE, R.C.K.; MORITZ, C.; BAINES, S.B.; SCHNEIDER, C.J.; VANDERWAL, J.; RAHBEK, C.; KOZAK, K.H.; SANDERS, N.J. The origin and maintenance of montane diversity: integrating evolutionary and ecological processes. **Ecography**, v. 37, p. 711–719, 2014.

HAFFER, J. Avian species richness in tropical South America. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 25(3), p. 157–183, 1990.

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. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 797–802, 2004.

HERDER, Elizabeth A. et al. Body size poorly predicts host-associated microbial diversity in wild birds. **Microbiology Spectrum**, p. e03749-22, 2023.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Relevo Região Sudeste do Brasil**, 2006. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/geomorfologia/15827-unidades-de-relevo.html?=&t=acesso-ao-produto>. Acesso em: 29 nov. 2022.

INGS, K. & DENK, D. Avian Malaria in Penguins: Diagnostics and Future Direction in the Context of Climate Change. **Animals**, v. 12(600), p. 1–11, 2022.

INPE, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Sistema de Informações Espaciais – SIE. Monitoramento das temperaturas do Sudeste Brasileiro: **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, 2021.

ISAKSSON, C.; SEPIL, I.; BARAMIDZE, V.; SHELDON, B.C. Explaining variance of avian malaria infection in the wild: the importance of host density, habitat, individual life-history and oxidative stress. **BMC Ecology**, v. 13(15), p. 1–11, 2013.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20(4), p. 1160–1166, 2019.

KEELER, Shamus P. et al. Use of FTA® sampling cards for molecular detection of avian influenza virus in wild birds. **Avian diseases**, v. 56, n. 1, p. 200-207, 2012.

KITAYAMA, K. Patterns of species diversity on an oceanic versus a continental island mountain: a hypothesis on species diversification. **Journal of Vegetation Science**, v. 7, p. 879–888, 1996.

KNOWLES, S.C.L.; WOOD, M.J.; ALVES, R.; SHELDON, B.C. Dispersal in a patchy landscape reveal contrasting determinants of infection in a wild avian malaria system. **Journal of Animal Ecology**, v. 83, p. 429–439, 2014.

KNOWLES, Sarah CL et al. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 5, p. 1062-1076, 2011.

KNOWLES, Sarah CL et al. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 5, p. 1062-1076, 2011.

KORNER, C. & SPEHN, E.M. **Mountain biodiversity: a global assessment**. London: Routledge, 2002. 350 p.

KRIZANAUSKIENE, A.; IEZHOVA, T.A.; SEHGAL, R.N.M.; CARLSON, J.S.; PALINAUSKAS, V.; BEN SCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular characterization of *Haemoproteus sacharovi* (*Haemosporida*, *Haemoproteidae*), a common parasite of columbiform birds, with remarks on classification of haemoproteids of doves and pigeons. **Zootaxa**, v. 3613(1), p. 85–94, 2013.

KRIŽANAUSKIENĖ, Asta et al. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome B gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1319-1324, 2006.

KUECKER, Z.; SOBERANES, C.; RODRÍGUEZ-FLORES, C.; ARIZMENDI, M.; JOHNSON, T. Ruddy Quail-Dove (*Geotrygon montana*). **Birds of the World**. 10.2173/bow.ruqdo.01. 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

L. J. Cseke, P. B. Kaufman, G. K. Podila, and C.-J. Tsai. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, **CRC Press**, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition, 2004.

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

LACORTE, G.A.; FÉLIX, G.M.F.; PINHEIRO, R.R.B.; CHAVES, A.V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F.S.; LEITE, L.O.; SANTOS, F.R.; BRAGA, E.M. Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites— a molecular survey from southeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 8(3), e57770, 2013.

LAHIRI DK, Bye S, Nurnberger JI Jr, Hodes ME, Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods*. 1992;25(4):193–205.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; HUMPHREY, P.S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the Área de Pesquisas Ecológicas do Guamá, Belém, Pará, Brasil. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 197–198, 1970.

LANGE V, Arndt K, Schwarzel C, Boehme I, Giani AS, Schmidt AH et al. High-density FTA plates serve as efficient long-term sample storage for HLA genotyping. *Tissue Antigens*. 2014;83(2):101-105.

LAPOINTE D.A.; ATKINSON, C.T.; SAMUEL, M.D. Ecology and conservation biology of avian malaria. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1249, p. 211–226, 2012.

LEE, Jong-Han et al. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. **Yonsei medical journal**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2010.

LEE, Pei Yun et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 62, p. e3923, 2012.

LIANG X, Chigerwe M, Hietala SK, Crossley BM. Evaluation of fast technology analysis (FTA) cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with bovine respiratory disease complex. *J Virol. Methods*. 2014;202:69-72.

LIAO, W.; ATKINSON, C.T.; LAPOINTE, D.A.; SAMUEL, M.D. Mitigating Future Avian Malaria Threats to Hawaiian Forest Birds from Climate Change. **PLoS ONE**, v. 12(1), e0168880, 2017.

LIMA, M. L. **Aves da Mata Atlântica: riqueza, composição, status, endemismo e conservação.** 2013. 256 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Zoologia) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LUCENA, D.T. Lista dos protozoários hemoparasitas de aves da região neotrópica. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 2(1), p. 33–66, 1941.

LYNTON-JENKINS, Joshua G. et al. Parasite detection and quantification in avian blood is dependent on storage medium and duration. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 2, p. e9819, 2023.

MACARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. **The theory of island biogeography.** Princeton: Princeton University Press, 1967. 224 p.

MACHADO ABM, Drummond GM, Paglia AP. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Volume II - Mamíferos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2008.

MANDAL, F.B. Hurdle in taxonomy: A case of malaria parasites and other Haemosporidia. **Open Veterinary Science**, v. 2(1), p. 40–54, 2021.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ, A.D.; VALKIŪNAS, G. et al. Description and molecular characterization of *Plasmodium (Novyella) unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. **Parasitology Research**, v. 112, p. 4193–4204, 2013.

MARTINSEN, E.; PAPERNA, I.; SCHALL, J. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: An exploration of three species concepts. **Parasitology**, v. 133(3), p. 279–288, 2006.

MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MOLLER, A.P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, v. 142, p. 541–545, 2005.

MARZAL, A.; GARCÍA-LONGORIA, L.; CÁRDENAS-CALLIRGOS, J.M. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. **Biological Invasions**, v. 17, p. 39–45, 2015.

MATOSO, R.; CEDROLA, F.; BARINO, G.; DIAS, R.; ROSSI, M.; D'AGOSTO, M..

New morphological and molecular data for *Haemoproteus* (H.) *paramultipigmentatus* in the Atlantic Forest of Brazil. **Parasitology international**, v. 84, p. 102375, 2021.

MCNEW, S.; BARROW, L.; WILLIAMSON, J.; GALEN, S.; SKEEN, H.; DUBAY, S.; GAFFNEY, A.; JOHNSON, A.; BAUTISTA, E.; ORDOÑEZ, P.; WITT, C. Contrasting drivers of diversity in hosts and parasites across the tropical Andes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 23, p. 118(12):e2010714118, 2021.

MEISTER, Seraina L. et al. Avian haemosporidian parasites in captive and free-ranging, wild birds from zoological institutions in Switzerland: Molecular characterization and clinical importance. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 20, p. 46-55, 2023.

MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R.A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C.F. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**, v. 33, p. 329–340, 2008.

MERCK. **Reliable DNA extraction from Whatman® FTA® cards.** Acessado em setembro de 2022. Disponível em <<https://www.sigmadralich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/genomics/dna-and-rna-purification/whatman-reliable-extraction-of-dna>>

MIRANDA PAEZ, A.; CHALKOWSKI, K.; ZOHDY, S. et al. Management of avian malaria in populations of high conservation concern. **Parasites Vectors**, v. 15(208), p. 1–6, 2022.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. 2022. Disponível em <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 29 nov. 2022.

MOENS, M.A.J.; PÉREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 41–49, 2015.

MOENS, Michael AJ et al. Parasite specialization in a unique habitat: hummingbirds as reservoirs of generalist blood parasites of Andean birds. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 5, p. 1234-1245, 2016.

MUKHIN, A.; PALINAUSKAS, V.; PLATONOVA, E.; KOBYLKOV, D.; VAKOLIUK, I; VALKIŪNAS, G. The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. **PLoS ONE**, v. 11(7), e0159216, 2016

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA G.A.B.; KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NIEBUHR, C.N., Blasco-Costa, I. Improving detection of avian malaria from host blood: a step towards a standardised protocol for diagnostics. *Parasitol Res* **115**, 3905–3911 (2016).

NJABO, K.Y.; CORNEL, A.J.; SEHGAL, R. N. M.; LOISEAU, C.; BUERMANN, W.; HARRIGAN, R.J.; POLLINGER, J.; VALKIŪNAS, G.; SMITH, T.B. Coquillettidia (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. **Malaria Journal**, v. 8(193), p. 1–12, 2009.

OLIVEIRA, Katrine. **Hábito alimentar e história evolutiva moldam a forma do bico dos passeriformes da Mata Atlântica**. Orientador: Dr. Nilton Carlos Cáceres53p. 2018. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

OLIVEIRA, L.; BARINO, G.T.M.; ROSSI, M.F.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R.J.P.; SANTOS, H.A. Morphological and molecular characterization of *Haemoproteus coatneyi* and *Haemoproteus erythrogravidus* (Haemosporida: Haemoproteidae) in Passeriformes in Brazil's Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29(4), e011520, 2020.

OLIVEIRA, L.; CEDROLA. F.; SENRA, M.V.X.; SCOPEL, K.K.G.; MARTINELE, I.; TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; D'AGOSTO, M. Polymorphism evidence in *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 (Apicomplexa, Haemosporida) isolated from Brazilian wild birds. **Parasitology International**, v. 70, p. 70-76, 2019.

OLIVEIRA, MC de S. et al. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. 2007.

OMS, Organização Mundial da Saúde. ONU - Organização das Nações Unidas. **Relatório Mundial da Malária**, 2022.

OUTLAW, D. & RICKLEFS, R. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): How to move forward in the molecular era. **Parasitology**, v. 141(10), p. 1223–1232, 2014.

PACHECO JF, Fonseca PS, Laps RR, et al. A avifauna da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Rev Bras Ornitol.* 2010;18(2):142-183.

PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee—second Edition. **Ornithology Research**, v. 29, p. 94–105, 2021.

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

PEZZOLI N, Silvy M, Woronko A, Le Treut T, LevyMozziconacci A, Reviron D et al. Quantification of mixed chimerism by real time PCR on whole blood impregnated FTA cards. *Leuk. Res.* 2007;31(9):1175- 1183.

POREMBSKI, Stefan et al. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. **Diversity and distributions**, v. 4, n. 3, p. 107-119, 1998.

PRATES, Ivan et al. Biogeographic links between southern Atlantic Forest and western South America: Rediscovery, re-description, and phylogenetic relationships of two rare montane anole lizards from Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 113, p. 49-58, 2017.

PRICE, Carol W.; LESLIE, Daniel C.; LANDERS, James P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 17, p. 2484-2494, 2009.

REEVES, Lawrence E. et al. Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

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

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

RICHARD, F. Alexander et al. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 819-822, 2002.

RICKLEFS, R.E. & SHELDON, K.S. Malaria prevalence and white blood cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. **The Auk**, v. 124(4), p. 1254–1266, 2007.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Karla et al. Haemosporidian prevalence, parasitaemia and aggregation in relation to avian assemblage life history traits at different elevations. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 5, p. 365-378, 2021.

ROLDÁN-ZURABIÁN, F.; JOSÉ RUIZ-LÓPEZ, M.; DE LA PUENTE, J.M. et al. Apparent absence of avian malaria and malaria-like parasites in northern blue-footed boobies breeding on Isla Isabel. **Scientific Reports**, v. 12(6892), p. 1–6, 2022.

ROOYEN, Juan van et al. Altitudinal variation in haemosporidian parasite distribution in great tit populations. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

RUDBECK, Lars; DISSING, Jørgen. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **Biotechniques**, v. 25, n. 4, p. 588-592, 1998.

SÁ, M.R. Studies of avian malaria and Brazil in the international scientific contexto (1907-1945). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**. v. 18, p. 499–518, 2011.

SANGER, Fred; COULSON, Alan R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANTIAGO Merino; Janos Hennicke; Javier Martínez; Katrin Ludynia; Roxana Torres; Thierry M. Work; Stedson Stroud; Juan F. Masello; Petra Quillfeldt. Infection by *Haemoproteus* Parasites in Four Species of Frigatebirds and the Description of a New Species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **J Parasitol** (2012) 98 (2): 388–397.

SANTIAGO-ALARCON, D.; OUTLAW, D.C.; RICKLEFS, R.E.; PARKER, P.G. Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. **International Journal for Parasitology**, v. 40(4), p. 463–470, 2010.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H.M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. **Biological Reviews**. v. 87(4), p. 928–64, 2012.

SANTIAGO-ALARCON, Diego; MARZAL, Alfonso. Research on avian haemosporidian parasites in the tropics before the year 2000. **Avian malaria and related parasites in the tropics: ecology, evolution and systematics**, p. 1-44, 2020.

SCHOENLE, L. A.; KERNBACH, M.; HAUSSMANN, M. F.; BONIER, F.; MOORE I. T. An experimental test of the physiological consequences of avian malaria infection. **Jounal Animal Ecology**. v.86(6), p.1483-1496, 2017.

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

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

SEDANO-CRUZ, Raul; CASTILLO, Andres; GIL-VARGAS, Diana Lorena. Molecular identification of Haemosporidia in avian endemics of Gorgona Island within a context for the eastern tropical Pacific region. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 104123, 2020.

SEHGAL, R. N. Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 4(3), p. 421–430, 2015.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**, edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 1997. 912p.

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

SMITH, L. M.; BURGOYNE, Leigh Alexander. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. **BMC ecology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2004.

SMITH, William J. et al. Parasite exchange and hybridisation at a wild-feral-domestic interface. **International Journal for Parasitology**, 2023.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**. v. 30(9), p. 1312–1313, 2014.

STARKLOFF, N. C.; KIRCHMAN, J. J.; JONES, A. W.; et al. Drivers of community turnover differ between avian hemoparasite genera along a North American latitudinal gradient. **Ecology Evolution**. v.10, p. 5402– 5415, 2020.

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

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**. v. 56, p. 564-577, 2007.

TAN, Siun Chee et al. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **BioMed Research International**, v. 2009, 2009.

TAVARÉ, S. "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences". Lectures on Mathematics in the Life Sciences. **American Mathematical Society**. v. 17, p. 57–86. 1986.

THOMAS, Rebecca C. et al. Successful storage of *Trichomonas gallinae* on Whatman FTA cards following culture. **Conservation Genetics Resources**, v. 14, n. 2, p. 225-229, 2022.

TOSTES, R.; DIAS, R. J.; DAEMON, E. P.; D'AGOSTO, M. Malária em aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais mantidas em cativeiro: diagnóstico parasitológico e molecular, e caracterização bioquímica e histopatológica. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Seropédica. v. 25: p. 7-15. 2015.

TRUETT, Gary E. et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). **Biotechniques**, v. 29, n. 1, p. 52-54, 2000.

VALKIŪNAS G, ATKINSON CT. Introduction to life cycles, taxonomy, distribution and basic research techniques. In: Santiago-Alarcon D, Marzal A, editors. Avian malaria and related parasites in the tropics: ecology, evolution and systematics. **Springer**; 2020. p. 45–80.

VALKIUNAS G, DUC M, IEZHOVA TA. Increase of avian *Plasmodium circumflexum* prevalence, but not of other malaria parasites and related haemosporidians in northern Europe during the past 40 years. **Malar J.** 2022;21:105.

VALKIŪNAS, G. & IEZHOVA, T. A. Keys to the avian malaria parasites. **Malaria Journal.** v.17, p. 212, 2018.

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

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian *Haemoproteus* parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). **Malarian Journal**, v. 21, p. 269, 2022.

VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; BERNOTIENĖ, R.; KAZLAUSKIENĖ, R.; IEZHOVA, T.A. Further observations on in vitro hybridization of hemosporidian parasites: patterns of ookinete development in *Haemoproteus* spp. **The Journal of Parasitology**, v. 99(1), p. 124–136, 2013.

VALKIŪNAS, Gediminas 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, n. 2, p. 418-422, 2006.

VALKIŪNAS, Gediminas; ATKINSON, Carter T. Introduction to life cycles, taxonomy, distribution, and basic research techniques. **Avian malaria and related parasites in the tropics: ecology, evolution and systematics**, p. 45-80, 2020.

VALKIŪNAS, Gediminas; IEZHOVA, Tatjana A. Keys to the avian *Haemoproteus* parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). **Malaria journal**, v. 21, n. 1, p. 269, 2022.

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

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

VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; BHERING, R. C. C.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; JUNIOR, F. C. F.; BRAGA, E. M.; & CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. **Veterinary Research**. v.46, p. 30, 2015.

VASCONCELOS, M. e RODRIGUES, M. "Patterns of geographic distribution and conservation of the open-habitat avifauna of southeastern Brazilian mountaintops (campos rupestres and campos de altitude)". **Papéis Avulsos de Zoologia**. v.50, p. 1-29, 2010.

WALDENSTRÖM, Jonas 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, n. 1, p. 191-194, 2004.

WALSTROM, V. Woody; OUTLAW, Diana C. Distribution and prevalence of haemosporidian parasites in the Northern Cardinal (*Cardinalis cardinalis*). **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 63-68, 2017.

WALTHER, E. L.; VALKIUNAS, G.; GONZÁLEZ, A. D.; MATTA, N. E.; RICKLEFS R. E.; CORNEL, A.; SEHGAL, R. N. Description, molecular characterization, and patterns of distribution of a widespread New World avian malaria parasite (Haemosporida: Plasmodiidae), *Plasmodium (Novyella) homopolare* sp. nov. **Parasitology Research**, v.67, p 37-75, 2014.

WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNETT, G.; F. Prevalence of avian Haematozoa in São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84(4), p. 515-526, 1989.

YABSLEY, Michael J. et al. A single *Haemoproteus plataleae* haplotype is widespread in white ibis (*Eudocimus albus*) from urban and rural sites in southern Florida. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 21, p. 269-276, 2023.

YANG Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p. 568-573, 1998.

ZEHTINDJIEV, Pavel et al. Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 1, p. 99-110, 2008.

7. ANEXOS

Anexo A – Lista de espécies amostradas

Anexo B – Árvore filogenética com clados estratificados

ANEXO A - LISTA DE ESPÉCIES AMOSTRADAS

Distribuição das famílias e espécies de aves coletadas no presente estudo.

Ordem/Família/Espécie	Nome popular	Total
Galliformes		
Cracidae		
<i>Penelope obscura</i>	Jacuguaçu	1
Columbiformes		
Columbidae		
<i>Geotrygon montana</i>	Pariri	3
<i>Leptotila rufaxilla</i>	Juriti-de-testa-branca	3
<i>Leptotila verreauxi</i>	Juriti-pupu	1
<i>Patagioenas plumbea</i>	Pomba-amargosa	2
Passeriformes		
Dendrocolaptidae		
<i>Dendrocincla turdina</i>	Arapaçu-liso	7
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Arapaçu-grande	1
<i>Lepidocolaptes falcinellus</i>	Arapaçu-escamoso-do-sul	1
<i>Lepidocolaptes squamatus</i>	Arapaçu-escamoso	3
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	Arapaçu-verde	21
<i>Xiphocolaptes albicollis</i>	Arapaçu-de-garganta-branca	2
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Arapaçu-rajado	33
Furnariidae		
<i>Anabazenops fuscus</i>	Trepador-coleira	3
<i>Asthenes moreirae</i>	Garrincha-chorona	8
<i>Cranioleuca pallida</i>	Arredio-pálido	3
<i>Lochmias nematura</i>	João-porca	3
<i>Dendroma rufa</i>	Limpa-folha-de-testa-baia	1
<i>Philydor atricapillus</i>	Limpa-folha-coroado	2
<i>Synallaxis cinerascens</i>	Pi-puí	5
<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Pichororé	9
<i>Synallaxis spixi</i>	João-teneném	2
<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	Trepador-quiete	1
Xenopidae		
<i>Xenops minutus</i>	Bico-virado-miúdo	1

Tabela 6: Distribuição das famílias e espécies de aves coletadas no presente estudo (continuação)

Scleruridae		
<i>Sclerurus scansor</i>	Vira-folha	9
Thamnophilidae		
<i>Drymophila genei</i>	Choquinha-da-serra	4
<i>Drymophila ochropyga</i>	Choquinha-de-dorso-vermelho	1
<i>Dysithamnus mentalis</i>	Choquinha-lisa	7
<i>Mackenziaena leachii</i>	Borralhara-assobiadora	1
<i>Mackenziaena severa</i>	Borralhara	1
<i>Myrmotherus loricatus</i>	Formigueiro-assobiador	1
<i>Pyriglena leucoptera</i>	Papa-taoca-do-sul	24
<i>Rhopias gularis</i>	Choquinha-de-garganta-pintada	12
<i>Thamnophilus caerulescens</i>	Choca-da-mata	4
<i>Thamnophilus ruficapillus</i>	Choca-de-chapéu-vermelho	2
Grallaridae		
<i>Grallaria varia</i>	Tovacuçu	1
Conopophagidae		
<i>Conopophaga lineata</i>	Chupa-dente	14
<i>Conopophaga melanops</i>	Cuspidor-de-máscara-preta	4
Tyranidae		
<i>Elaenia chiriquensis</i>	Chibum	1
<i>Elaenia mesoleuca</i>	Tuque	4
<i>Elaenia obscura</i>	Tucão	2
<i>Elaenia parvirostris</i>	Tuque-pium	1
<i>Knipolegus cyanirostris</i>	Maria-preta-de-bico-azulado	5
<i>Knipolegus nigerrimus</i>	Maria-preta-de-garganta-vermelha	4
<i>Lathrotriccus euleri</i>	Enferrujado	5
<i>Megarynchus pitangua</i>	Neinei	1
<i>Myiarchus swainsoni</i>	Irré	1
<i>Myiophobus fasciatus</i>	Filipe	1
<i>Phyllomyias fasciatus</i>	Piolhinho	1
Platyrinchidae		
<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Patinho	26
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Bico-chato-de-orelha-preta	6

Tabela 6: Distribuição das famílias e espécies de aves coletadas no presente estudo (continuação)

Rhynchocyclidae		
<i>Corythopis delalandi</i>	Estalador	1
<i>Hemitriccus diops</i>	Olho-falso	4
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Cabeçudo	7
<i>Mionectes rufiventris</i>	Abre-asa-de-cabeça-cinza	5
<i>Myiornis auricularis</i>	Miudinho	1
<i>Phylloscartes difficilis</i>	Estalinho	2
<i>Todirostrum poliocephalum</i>	Teque-teque	2
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Bico-chato-de-orelha-preta	2
Onychorhynchidae		
<i>Myioibius atricaudus</i>	Assanhadinho-de-cauda-preta	3
Tytiridae		
<i>Pachyramphus castaneus</i>	Caneleiro	1
Vireonidae		
<i>Hylophilus poicilotis</i>	Verdinho-coroadinho	2
Pipridae		
<i>Chiroxiphia caudata</i>	Tangará	21
<i>Ilicura militaris</i>	Tangarazinho	11
<i>Manacus manacus</i>	Rendeira	2
<i>Neopelma chrysolophum</i>	Fruxu	2
<i>Schiffornis virescens</i>	Flautim	5
Troglodytidae		
<i>Troglodytes musculus</i>	Corruíra	6
Turdidae		
<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira	5
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá-poca	2
<i>Turdus flavipes</i>	Sabiá-una	6
<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	3
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	18
<i>Turdus subalaris</i>	Sabiá-ferreiro	1
Parulidae		
<i>Basileuterus culicivorus</i>	Pula-pula	32
<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	Pula-pula-assobiador	18

Tabela 6: Distribuição das famílias e espécies de aves coletadas no presente estudo (continuação)

Thraupidae		
<i>Coereba flaveola</i>	Cambacica	1
<i>Embernagra platensis</i>	Sabiá-do-banhado	2
<i>Haplospiza unicolor</i>	Cigarra-bambu	6
<i>Microspingus lateralis</i>	Quete-do-sudeste	13
<i>Castanozoster thoracicus</i>	Peito-pinhão	3
<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro	6
<i>Stephanophorus diadematus</i>	Sanhaço-frade	12
<i>Tachyphonus coronatus</i>	Tiê-preto	12
<i>Tangara desmaresti</i>	Saíra-lagarta	24
<i>Thraupis ornata</i>	Sanhaço-de-encontro-amarelo	3
<i>Tangara seledon</i>	Saíra-sete-cores	5
<i>Trichothraupis melanops</i>	Tiê-de-topete	30
Cardinalidae		
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	1
<i>Habia rubica</i>	Tiê-de-bando	9
<i>Spinus magellanicus</i>	Pintassilgo	7
Fringillidae		
<i>Euphonia pectoralis</i>	Ferro-velho	6
Passerellidae		
<i>Arremon semitorquatus</i>	Tico-tico-do-mato	2
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	28
Total		586

ANEXO B - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM CLADOS ESTRATIFICADOS

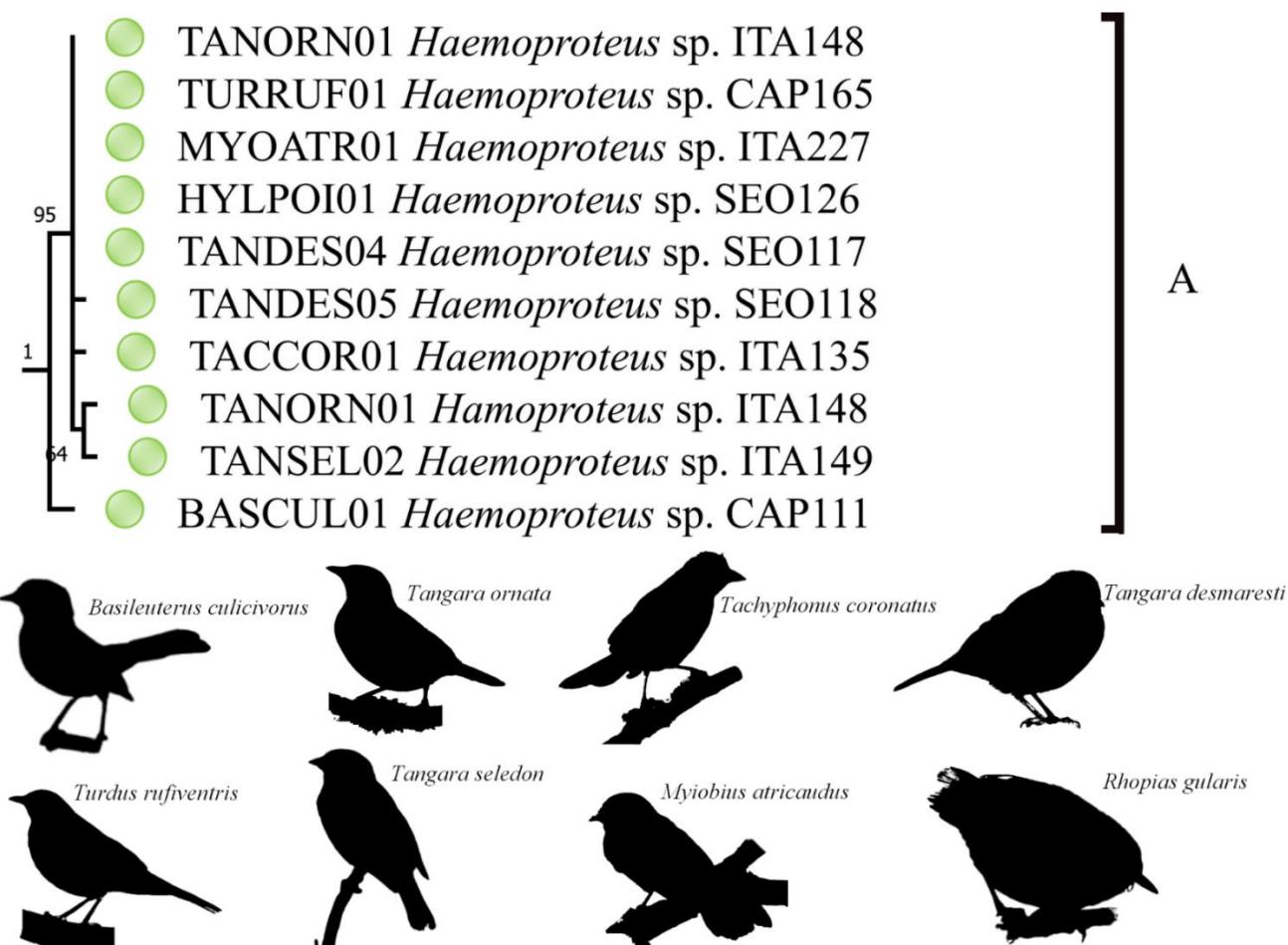
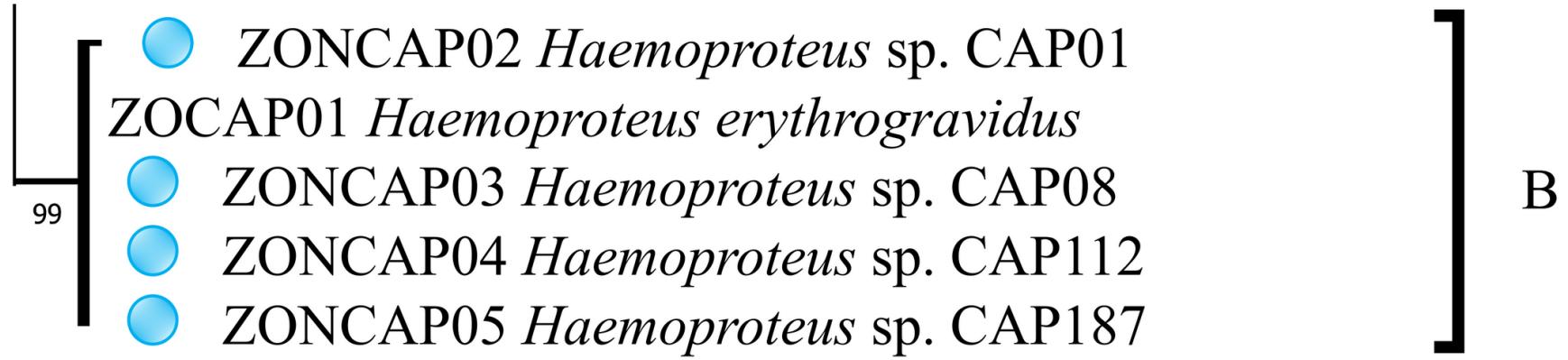


Figura 1: Linhagens do Clado A, com as espécies encontradas no presente estudo



Zonotrichia capensis

Figura 2: Linhagens do Clado de *Haemoproteus erythrogravidus* na única espécie de ocorrênci encontrada em nosso estudo.

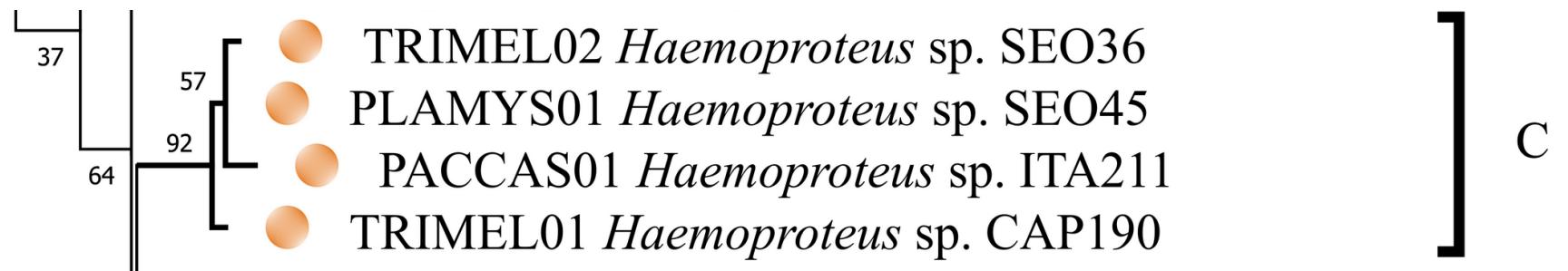


Figura 3: Linhagens do Clado C, com as espécies encontradas no presente estudo.

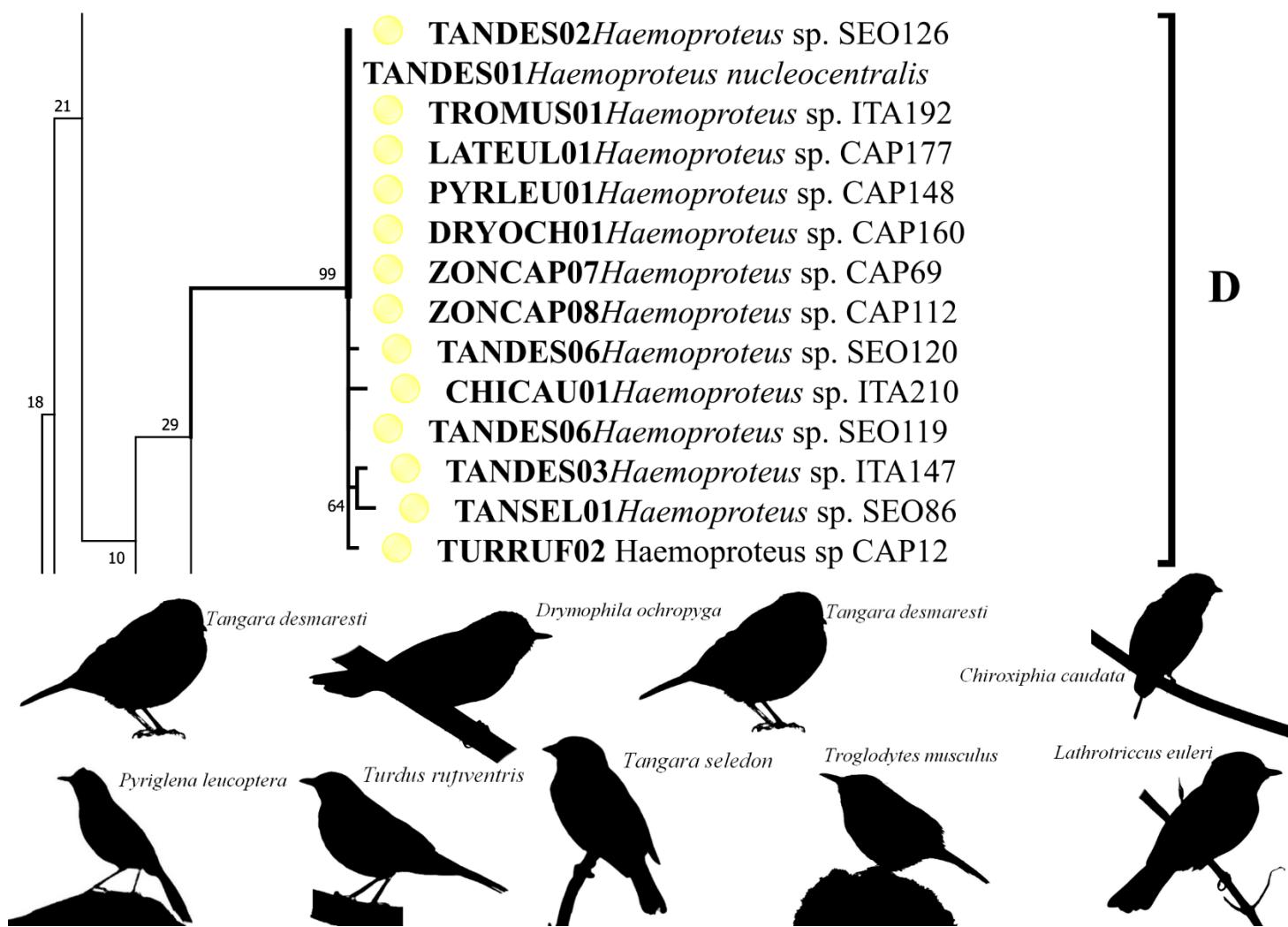


Figura 4: Linhagens do Clado D (*H. nucleocentralis*), com as espécies encontradas no presente estudo

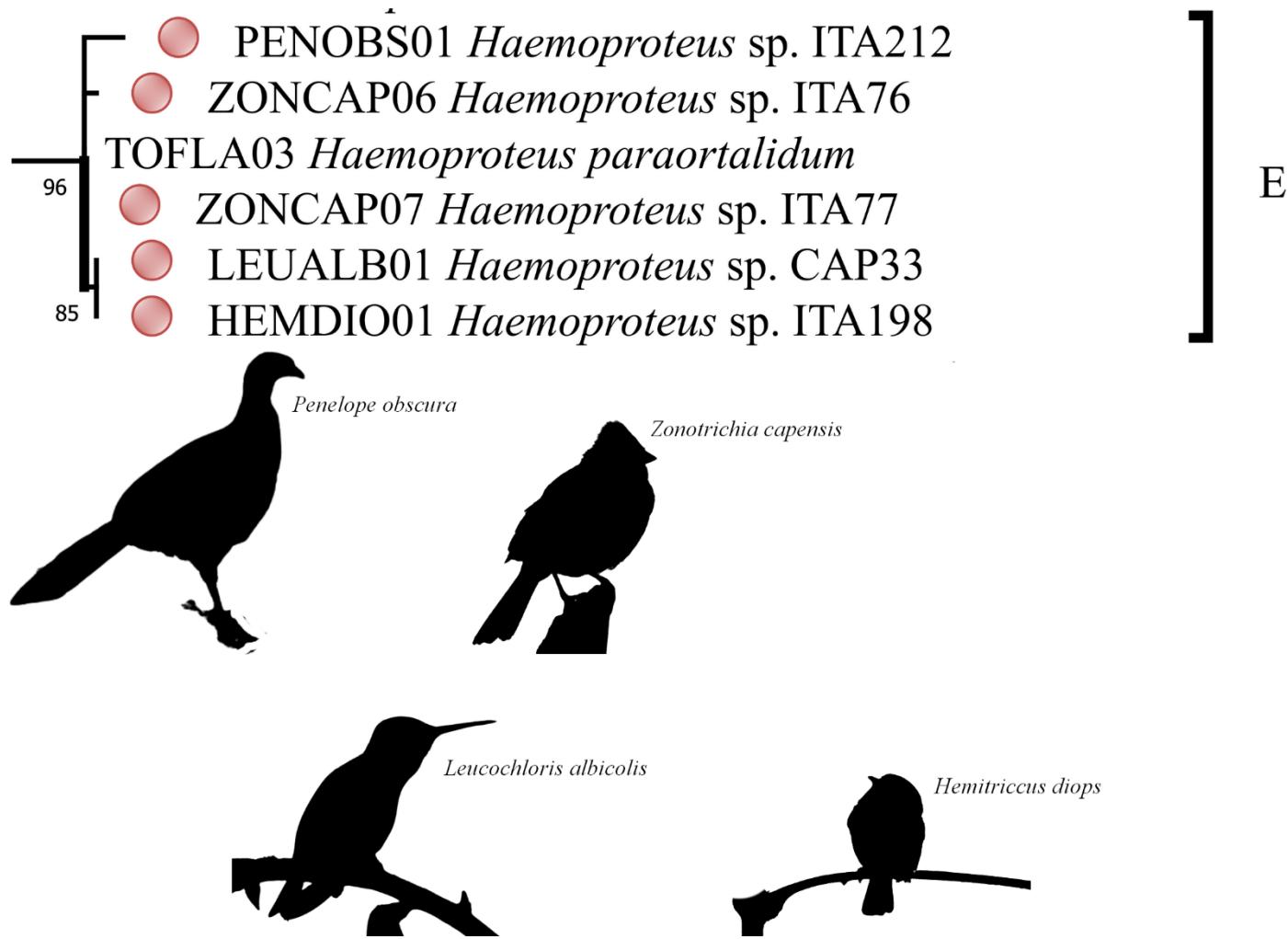


Figura 5: Linhagens do Clado E (*H. paraortalidum*), com as espécies encontradas no presente estudo