

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

TESE

DIVERSIDADE DE *HAEMOPROTEUS* spp. EM AVES *THAMNOPHILUS CAERULESCENS* E *PENELOPE OBSCURA* DA MATA ATLÂNTICA EM MINAS GERAIS, BRASIL: MORFOLOGIA, TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES

RAFAELA VENANÇONI MATOSO DE FREITAS

SETEMBRO

2022

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

DIVERSIDADE DE *HAEMOPROTEUS* spp. EM AVES *THAMNOPHILUS CAERULESCENS* E *PENELOPE OBSCURA* DA MATA ATLÂNTICA EM MINAS GERAIS, BRASIL: MORFOLOGIA, TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES

RAFAELA VENANÇONI MATOSO DE FREITAS

Sob a Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação da Professora
Marta Tavares D'Agosto

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

Seropédica, RJ
Setembro de 2022

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

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

F862d Freitas, Rafaela Venançoni Matoso de , 1987-
DIVERSIDADE DE HAEMOPROTEUS SPP. EM AVES
THAMNOPHILUS CAERULESCENS E PENELOPE OBSCURA DA MATA
ATLÂNTICA EM MINAS GERAIS, BRASIL: MORFOLOGIA,
TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES / Rafaela Venançoni
Matoso de Freitas. - Juiz de Fora, 2022.
62 f.: il.

Orientadora: Carlos Luiz Massard.
Coorientadora: Marta Tavares D'Agosto .
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2022.

1. malária aviária, Hemosporídeos, aves silvestres,
Mata Atlântica, cyt b.. I. Luiz Massard, Carlos, 1947
, orient. II. Tavares D'Agosto , Marta, -, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

ATA N° 4206/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.056976/2022-83

Seropédica-RJ, 14 de setembro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RAFAELA VENANÇONI MATOSO

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

TESE APROVADA EM 13/09/2022

(Assinado digitalmente em 23/09/2022 08:54)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ####034#8

(Assinado digitalmente em 21/09/2022 15:59)

PATRICIA SILVEIRA
CPF: #####.526-##

(Assinado digitalmente em 21/09/2022 11:15)

FRANCIANE CEDROLA VALE
CPF: ####.###.836-##

(Assinado digitalmente em 20/09/2022 22:37)

ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS
CPF: ####.###.906-##

(Assinado digitalmente em 21/09/2022 18:49)

MARTA TAVARES D AGOSTO
CPF: ####.###.276-##

*Dedico esse trabalho à minha família,
pelo incentivo e ajuda para chegar até o
fim!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir chegar até aqui e me manter firme no propósito.

Aos meus pais **Robson Matoso** e **Vanise Venançoni Matoso**, pela educação, carinho, amor, ajuda, força, ensinamentos e por serem minha base.

Às minhas filhas **Laura Venançoni Matoso** e **Luísa Venançoni Matoso de Freitas** que são minha vida, minha maior alegria, amigas, força e incentivo.

Ao meu marido **Edgard Bruno de Freitas Silva** por todo amor, companheirismo, incentivo, ajuda, paciência e por ser meu porto seguro.

Ao meu irmão **Gabriel Venançoni Matoso** por nossos momentos felizes.

Ao professor **Carlos Luiz Massard** pela oportunidade em fazer parte de sua equipe, por todo carinho e atenção.

À professora **Marta D'Agosto** por ter me dado estímulo, apoio, por toda empatia e confiança.

Ao professor **Huarrisson Azevedo Santos** pelo conhecimento compartilhado, atenção e dedicação.

Ao professor **Roberto Dias** pelos ensinamentos.

À professora **Mariana Rossi** pela contribuição.

Aos parceiros de trabalho do “LabProto”: **Elen Furtado**, **Fabiola Silva**, **Felipe Santos**, **Franciane Cedrola**, **Glauber Barino**, **Jéssica Andrade Vilas Boas**, **Luísa Oliveira**, **Priscila Fregulia**, **Roberto Marchesini**, **Talys Assumpção**, **Yasmine Moreira**, **Zacarias Rosalina**, **Wellington Ouverney**, **Maryana de Andrade**, **Pedro Mendes**, **Thais Pezenti**, **Luana Carvalho**, **Mylena Barros**, **Thaís Gomes**, **Saulo Moreira** pela contribuição profissional, pelos bons momentos no laboratório e pelas experiências.

Aos colegas e parceiros do “LAP”, por toda contribuição.

Aos parceiros do LHV da UFRRJ **Maristela Peckler**, **Cláudia Bezerra**, **Renata Lins**, **Rodrigo Gredilha**, **Miguel Mota**, **Leonardo Paulis**, **Patrícia Gonzaga**, **Fabrício Amaral**, por todo suporte, mesmo estando todos tão longe, e por todo acolhimento.

Às companheiras de apartamento **Maristela Peckler** e **Thalita Xavier** por terem sido minha família enquanto eu estive tão longe de casa e tornado meus momentos de saudade em alegrias.

Ao **Arthur Santiago**, secretário da UFRRJ, por toda sua boa vontade em ajudar sempre que necessário.

Aos **professores** do Programa de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal da UFJF, pelos ensinamentos.

Aos **professores** do Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, por todo conhecimento e experiências compartilhadas.

À **UFRRJ** pela oportunidade em fazer parte do programa.

À **UFJF** pela oportunidade de desenvolvimento do projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À todos os **amigos e familiares** que de alguma forma contribuíram para tornar essa jornada mais leve e satisfatória.

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

BIOGRAFIA

Rafaela Venançoni Matoso de Freitas, filha de Vanise Venançoni Matoso e Robson Matoso, nasceu em 30 de agosto de 1987, na cidade de Juiz de Fora, na zona da mata de Minas Gerais. É casada com Edgard Bruno de Freitas Silva, com quem possui duas filhas: Laura e Luísa.

Cursou o ensino fundamental na escola estadual Antônio Carlos em Juiz de Fora no qual foi concluído em 2002. Cursou o 1º ano do ensino médio no IFET Rio Pomba, o 2º ano no IFET Juiz de Fora e o 3º ano no colégio Apogeu, concluído em 2005 o ensino médio.

Em agosto de 2008, ingressou no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora se formando em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas (2008-2012). Durante sua vida acadêmica foi bolsista PIBIC da FAPEMIG na Embrapa Gado de Leite atuando na área de genética vegetal, onde concluiu seu estágio e faculdade com o trabalho “Viabilidade do pólen em *Brachiaria* sp.” sob a orientação do Dr. Fausto de Souza Sobrinho.

Em 2015 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Biológicas- Comportamento e Biologia Animal, nível mestrado, da Universidade Federal de Juiz de Fora sob orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto, sendo bolsista pela UFJF.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica- RJ, sob orientação do Professor Doutor Carlos Luiz Massard e co-orientação da Professora Doutora Marta D'Agosto e Professor Doutor Roberto Junio Pedroso Dias, sendo bolsista pela Capes.

Atuou como professora em diversas escolas do município de Juiz de Fora- MG, bem como em várias escolas estaduais no mesmo município nos anos de ensino fundamental II e EJA. Atuou também no Centro de Educação Interativa de Juiz de Fora e na Escola Integra- rede Apogeu, nas turmas de 6º, 7º, 8º e 9º anos do ensino fundamental II.

Atuou como flebotomista, na coleta e recebimento de material biológico bem como em análises na área técnica do laboratório Carlos Chagas em Juiz de Fora- MG.

Hoje em dia, exerce a função de laboratorista na GTA Alimentos atuando na área de microbiologia de alimentos em Juiz de Fora- MG. Exerce também a função de professora particular para alunos do ensino fundamental e médio.

RESUMO

FREITAS, Rafaela V. M., **Diversidade de *Haemoproteus* spp. em aves *Thamnophilus caerulescens* e *Penelope obscura* da Mata Atlântica em Minas Gerais, Brasil: morfologia, taxonomia e filogenia de espécies.** 2020. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são microeucariotos (Alveolata, Apicomplexa) parasitos intracelulares obrigatórios de anfíbios, aves, mamíferos e répteis, com ampla distribuição geográfica. A família Haemoproteidae inclui o gênero *Haemoproteus* Kruse, 1890, possui ampla distribuição geográfica, assim como seus vetores, insetos dipteros hematófagos. São parasitos que vêm sendo observados em aves em diferentes regiões do mundo e causam diversas alterações biológicas nos seus hospedeiros. Em se tratando de diversidade, hoje temos aproximadamente 150 espécies de *Haemoproteus* descritas utilizando diferentes ferramentas de estudos. No presente estudo foram examinadas 21 aves da espécie *Thamnophilus caerulescens* (Thamnophilidae) presentes em fragmentos da Floresta Atlântica. Nossos resultados descrevem uma nova espécie de *Haemoproteus* utilizando diferentes abordagens para tal. Essa é a primeira vez que uma espécie de *Haemoproteus* é descrita nessa espécie de ave. Além disso, foram analisadas quatro aves da espécie *Penelope obscura bronzina* (Cracidade) que apresentou prevalência de 100% de *Haemoproteus* sp. Como resultado, nosso estudo apresenta duas novas linhagens de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. e novos dados moleculares e morfológicos de *Haemoproteus* sp. em Cracidade da Mata Floresta Atlântica. Este estudo ressalta também a importância da taxonomia integrativa para a caracterização do grupo visto a complexidade do ciclo de vida desses parasitos e o aumento do número de linhagens, sem caracterização ao nível específico, nos bancos de dados o que pode resultar em uma subestimação no número de espécies ou superestimação das mesmas. O que é fundamental para trabalharmos questões como preservação de espécies aviárias, visto a influência que esses organismos têm sobre a ecologia das aves.

Palavras-chave: malária aviária, Hemosporídeos, aves silvestres, Mata Atlântica, *cyt b*.

ABSTRACT

FREITAS, Rafaela V. M., **Diversity of *Haemoproteus* spp. in birds *Thamnophilus caerulescens* and *Penelope obscura* from the Atlantic Forest of Minas Gerais, Brazil: morphology, taxonomy and species phylogeny.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Haemosporids of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* are microeukaryotes (Alveolata, Apicomplexa) obligate intracellular parasites of amphibians, birds, mammals and reptiles, with wide geographic distribution. The Haemoproteidae family includes the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890, which have a wide geographic distribution and are transmitted by blood-sucking dipterous insects. They are observed parasitizing birds in different regions of the world and cause several biological changes in their hosts. In terms of diversity, today we have approximately 150 described species of *Haemoproteus*. In the present study, 21 birds of the species *Thamnophilus caerulescens* captured in fragments of the Atlantic Forest were examined. Our results describe a new species of *Haemoproteus* using different approaches. This is the first time that a species of *Haemoproteus* is described in this bird species. In addition, four birds of the species *Penelope obscura bronzina* were analyzed, which showed a prevalence of 100% of *Haemoproteus* sp. As a result, our study presents two new strains of *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. and new molecular and morphological data of *Haemoproteus* sp. in Cracids of the Atlantic Forest. This study also highlights the importance of integrative taxonomy for the characterization of the group, given the complexity of the life cycle of these parasites and the increase in the number of lineages, without characterization at the specific level, in the databases, which can result in an underestimation of the number of species or their overestimation. These approaches are also essential to work on issues such as the preservation of avian species, given the influence of these organisms in bird ecology.

Kew-words. Avian malaria, Atlantic Forest, *cyt b*, haemosporidians, wild birds

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Localidade (municípios), espécies de aves da ordem Passeriformes e número de hospedeiros coletados em fragmentos da Mata Atlântica na Zona da Mata mineira	12
---	----

Tabela 2. Morfometria dos gametócitos maduros de <i>Haemoproteus dagostoa</i> n. sp. em eritrócitos de <i>T. caerulescens</i>	19
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Morfometria de células hospedeiras e gametócitos maduros de espécies de <i>Haemoproteus</i> de aves Cracidae	27
---	----

Tabela 2. Comparaçao morfométricas das espécies de <i>Haemoproteus</i> dentro de Cracidae	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação do ciclo biológico de *Haemoproteus mansoni*, parte superior vetor (14–21), parte inferior ave (1–13). (VALKIŪNAS, 2005) 4

CAPÍTULO I

Figura 1. Formas evolutivas de *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. encontradas em esfregaço sanguíneo de aves *T. caerulescens* em fragmentos de Mata atlântica. a-d gametócitos jovens; e-j Macrogametócitos; k-l Microgametócitos. Cabeças de setas pretas indicam núcleo do parasito, cabeças de setas brancas indicam grânulos de hemozoína, setas pretas longas indicam vacúolo, setas pretas curtas indicam nucléolo. Barra= 10 µm 17

Figura 2. Divergência genética encontrada entre as linhagens pertencentes ao clado de *H. d'agostoeae* n.sp e entre as espécies com morfologia semelhante a espécie estudada, em porcentagem 17

Figura 3. Árvore de delimitação da unidade evolutiva taxonômica, com base no gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*). Espécies de *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Haemosporida) foram escolhidas como grupo-externo 19

CAPÍTULO II

Figura 1. Estágios sanguíneos de *Haemoproteus* sp. (linhagem PENOBS01) registrada em Cracidae 29

Figura 2. Estágios sanguíneos de *Haemoproteus* sp. (linhagem PENOBS03) registrada em Cracidae (*Peneloe obscura bronzina*) brasileiro 30

Figura 3. Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências de *Haemoproteus* sp. e *Plasmodium* sp. *cyt b* 37

Figura S1. Estimativas de divergência genética pareada para *Haemoproteus* spp. utilizando as linhagens mais próximas encontradas neste estudo. 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A Ordem Haemosporida	2
2.2 Ciclo Biológico de <i>Haemoproteus</i>	3
2.3 Haemosporida em aves silvestres no Brasil	5
2.4 Conceito de Espécie em Haemosporida: identificação e delimitação	6
3 CAPÍTULO 1	8
DESCRIBÇÃO DE <i>HAEMOPROTEUS (PARAHAEMOPROTEUS) D'AGOSTOAE N. SP.</i> , EM <i>THAMNOPHILUS CAERULESCENS (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE)</i> DO BRASIL	8
3.1 RESUMO	9
3.2 ABSTRACT	9
3.3 INTRODUÇÃO	10
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.4.1 Locais de Estudo e Coleta das Amostras de Sangue	11
3.4.2 Análises Morfológicas	12
3.4.3 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento	13
3.4.4 Análises Filogenéticas	14
3.5 RESULTADOS	15
3.5.1 Prevalência e Parasitemia	15
3.5.1.1 Caracterização morfológica de <i>Haemoproteus (Parahaemoproteus) d'agostaoe n. sp.</i> (linhagem XXXX) de aves Passeriformes do Brasil (Figura 2 A–L)	15
3.5.2 Análises Filogenéticas	18
3.7 AGRADECIMENTOS	22
4 CAPÍTULO 2	22
NOVOS DADOS SOBRE PARASITOS <i>HAEMOPROTEUS</i> SP. EM AVES DA FAMÍLIA CRACIDAE	22
4.1 RESUMO	23
4.2 ABSTRACT	23
4.3 INTRODUÇÃO	24
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.4.1 Locais de Estudo e Amostras de Sangue	25
4.4.2 Análises Morfológicas	25
4.4.3 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento	26
4.4.4 Análises Filogenéticas	26
4.5 RESULTADOS	27
4.5.1 Prevalência e Parasitemia	27
4.5.1.1 <i>Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp. cyt b</i> linhagem PENOBS02 (Figura 1; Tabela 1)	31
4.5.1.2 <i>Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp. cyt b</i> linhagem PENOBS03 (Figura	

2; Tabela 1)	31
4.5.2 Reconstruções Filogenéticas	36
4.6 DISCUSSÃO	37
4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Haemosporida se define por ser um clado de protistas (Alveolata, Apicomplexa) parasitos intracelulares obrigatórios de anfíbios, aves, répteis e mamíferos (VALKIŪNAS, 2005). Haemosporida possui uma grande importância médica por abrigar parasitos causadores da malária, *Plasmodium* spp. (GARNHAM, 1966). Além de *Plasmodium*, a ordem inclui organismos pertencentes aos gêneros *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia* (VALKIŪNAS, 2005) que podem causar grandes prejuízos econômicos e ambientais (TALISUNA et al., 2004) visto que possuem importância ecológica, principalmente para a conservação de espécies hospedeiras suscetíveis (ATKINSON et al., 2000). O ciclo de vida desses organismos é heteroxeno com a fase sexuada ocorrendo nos hospedeiros invertebrados e a fase assexuada ocorrendo nos hospedeiros vertebrados (REMPLE, 2004).

Os estudos sobre esses organismos nos trópicos datam do início do século XX e cresceram acentuadamente nos últimos anos, principalmente em hospedeiros aviários (ARAGÃO, 1908; VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2018). No entanto, as pesquisas são focadas em dois grupos específicos de hemosporídeos, *Plasmodium* e *Haemoproteus* possuindo o maior número de espécies descritas, 55 e 140 respectivamente (FECCHIO et al., 2020; VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2018). A maior parte desses estudos ocorreu na região da Ásia, seguido por África e em seguida América (SANTIAGO- ALARCON & MARZAL, 2020). A maioria dos estudos foi focado em relatar infecções em aves, assim como descrever novas espécies de parasitos hemosporídeos (SANTIAGO-ALARCON & MARZAL, 2020). Por terem ampla distribuição geográfica esses organismos afetam aves no mundo todo, acarretando em prejuízos ecológicos já que podem levar seus hospedeiros à morte (VALKIŪNAS 2005; FECCHIO et al., 2020). Apesar da ampla distribuição, a riqueza de espécies hemosporídeos é maior nos trópicos (PRICE, 1980; COMBES, 2001; VALKIŪNAS, 2005).

A taxonomia desses parasitos era feita inicialmente por meio da observação das formas evolutivas no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados através de microscopia óptica (GARNHAM, 1966). Além da observação das formas evolutivas nos eritrócitos, caracteres como o táxon do hospedeiro e história de vida do parasito também passaram a ser considerados para a classificação (MARTINSEN et al. 2007). Mas essas técnicas têm limitações visto que muitos estudos são feitos com aves silvestres que possuem baixa parasitemia, dificultando a caracterização (VALKIŪNAS, 2005). Com o advento da biologia molecular, estudos com sequências de DNA tornaram-se de fundamental importância para aprimorar a classificação taxonómica de hemosporídeos (CLARK et al., 2015). O banco de dados moleculares Malavi, foi criado para depósito de sequências do gene mitocondrial *cyt b* de hemosporídeos de hospedeiros aviários (BENSCH et al., 2009). Hoje são mais de 1600 linhagens do gênero *Haemoproteus* depositadas no banco de dados Malavi. Fato que ilustra uma imensa diversidade genética entre os parasitos e possivelmente muitas espécies que ainda não foram descritas (VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2018). A maior parte dessas linhagens não foi identificada ao nível específico (Malavi database). A identificação desses organismos contribui com outros estudos sobre diversidade, especiação parasitária e ecologia. Alguns autores discutem sobre conceito de espécie em Haemosporida como no trabalho de Outlaw &

Ricklefs (2014) onde mostraram que a delimitação de espécies se tornou complicada à medida que novas linhagens foram surgindo. Um dos problemas do uso de técnicas restritas (apenas morfologia ou biologia molecular, por exemplo) é que podem esconder espécies crípticas e subestimar o número de espécies para estes hemoparasitos. Apesar disso, cada autor adota uma métrica para descrição de espécies de Haemosporida.

A presente tese foi desenvolvida com o objetivo de conhecer e identificar a diversidade de parasitos Haemosporida em aves da espécie *Thamnophilus caerulescens* e *Penelope obscura* da região neotropical utilizando uma metodologia integrativa que aborda morfologia, filogenia e biologia molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Ordem Haemosporida

A ordem Haemosporida (DANILEWSKY, 1885) é um clado de microeucariotos (Alveolata, Apicomplexa) parasitos intracelulares obrigatórios de anfíbios, aves, mamíferos e répteis, com ampla distribuição geográfica (VALKIŪNAS, 2005). São unicelulares, eucarióticos, sem organelas locomotoras, e com um complexo apical cuja função é a penetração na célula hospedeira. O ciclo de vida é heteroxeno alternando entre hospedeiro vertebrado e invertebrado (díptero hematófago) e consiste em esquizogonia, gamogonia e esporogonia (REMPLE, 2004). A presença de macrogametócitos e microgametócitos que se desenvolvem independentemente, zigoto móvel (ou oocineto), esporozoítos e esquizontes são as principais características encontradas no desenvolvimento destes parasitos (Garnham, 1966; REMPLE, 2004). Estudos em hospedeiros aviários passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade destes hemosporídeos com os agentes da malária humana, pertencentes ao gênero *Plasmodium* (SÁ, 2011). A ordem Haemosporida teve suas principais características descritas por Danilewsky (1885), porém, por não ser taxonomista, este não participou da elaboração da classificação da ordem. Em seguida, vários outros estudos contribuíram para o conhecimento do grupo, como o de MacCallum (1897) que descreveu o estágio de exflagelação em corvos no Canadá. Logo após, vários outros se sucederam como os de Aragão (1907), Celli (1933), Stephens (1937), Scott (1939), Russell (1965), Foster (1965), Garnham (1966, 1971), Harrison (1978), Bruce-Chwatt (1988), Desowitz (1991), McGregor (1996), e Poser & Bruyn (1999). A Ordem Haemosporida inclui representantes das famílias Haemoproteidae, Leucocytozoidae, Plasmodiidae e Garniidae, que possuem ampla distribuição geográfica e já foram descritos parasitando diversos grupos de aves em todos os continentes com exceção à Antártida (VALKIŪNAS, 2005; SEHGAL, 2011). Classificação taxonômica dos gêneros de hemosporídeos, segundo Valkiūnas (2005):

Domínio: Eukariota

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

Superfilo: Alveolata

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)
 Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)
 Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)
 Família: Haemoproteidae
 Gênero: *Haemoproteus* Kruse, 1890
 Subgênero: *Haemoproteus*
 Subgênero: *Parahaemoproteus*
 Família: Plasmodiidae
 Gênero: *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 188
 Subgênero: *Haemamoeba*
 Subgênero: *Giovannolaia*
 Subgênero: *Novyella*
 Subgênero: *Bennettinia*
 Subgênero: *Huffia*
 Família: Leucocytozoidae
 Gênero: *Leucocytozoon* Berestneff, 1904
 Subgênero: *Leucocytozoon*
 Subgênero: *Akiba*
 Família: Garniidae
 Gênero: *Fallisia*
 Subgênero: *Plasmodioides*

2.2 Ciclo Biológico de *Haemoproteus*

Haemoproteus spp. possuem ciclo de vida heteroxeno, com fases eritrocíticas e exoeritrocíticas. A fase sexuada acontece no hospedeiro invertebrado, dípteros da família Ceratopogonidae e moscas hipobócideas (Hippoboscidae), a fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado (VALKIŪNAS, 2005; REMPLE, 2004). O desenvolvimento do parasito nos hospedeiros invertebrados é semelhante, diferindo no tamanho do oocisto, número de esporozoítos e duração da esporogonia (SANTIAGO- ALARCON et al., 2012). Em hipoboscídeos, tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de sangue e são susceptíveis à infecção. O ciclo de vida de *Haemoproteus* é apresentado a seguir (Figura 1) e suas características foram baseadas no desenvolvimento da espécie *Haemoproteus mansoni* (VALKIŪNAS, 2005). Os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do vetor são inoculados e penetram as células endoteliais viscerais (1) desenvolvendo em merontes exoeritrocíticos da primeira geração (2,3) que afetam diferentes órgãos como: fígado, baço, rins, musculatura esquelética e pulmões, a esse processo denominaram merogonia (FROMONT, 1993; DONOVAN et al., 2008). Os merontes dão origem aos merozoítos de primeira geração, que possuem forma e tamanhos variáveis infectando novas células (4). Em algumas espécies eles crescem e desenvolvem-se em megalomerentes no tecido muscular ou cardíaco e nas células endoteliais dos capilares (5,6). Sendo as células endoteliais mais comumente parasitadas baço, rins, pulmões, fígado e musculatura esquelética. Além disso, os merozoítos formados nesse processo podem infectar células sanguíneas e se desenvolver em gametócitos (VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2018). Por meio de esquizogonias, dão origem a novos merozoítos e que penetram nos eritrócitos (7) e se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos os quais poderão ser ingeridos pelos vetores dípteros hematófagos (8). Os merozoítos da primeira geração infectam células do baço (9). Nesse momento, se desenvolvem em merontes maduros (10,11) que irão infectar células

sanguíneas (12) e se desenvolverão em gametócitos (13). É importante ressaltar que apenas gametócitos se desenvolvem em eritrócitos e que pelo menos duas gerações teciduais ocorrem antes do surgimento dos gametócitos no sangue. A fase entre a infecção e o surgimento das primeiras formas detectáveis pode durar entre 11 e 21 dias (VALKIŪNAS, 2005).

A gametogênese se inicia após o repasto sanguíneo do inseto (14,15). Os gametócitos assumem o formato arredondado e saem do eritrócito no intestino do inseto. Os microgametócitos liberam, por exflagelação, microgametas que se unem a macrogametas (singamia), produzidos a partir dos macrogametócitos (15). O zigoto é formado no ambiente extracelular, o qual se diferencia em uma forma móvel, denominada oocineto (16). O oocineto migra do intestino para debaixo da lâmina basal dando origem ao oocisto (18) iniciando a fase esporogônica. A esporogonia produz grande número de esporocistos (19,20) e quando maduro se rompe liberando-os na hemocele que por meio da hemolinfa chegam à glândula salivar do vetor (21). As formas infectantes para as aves são os esporozoítos que são injetados no momento da alimentação do díptero.

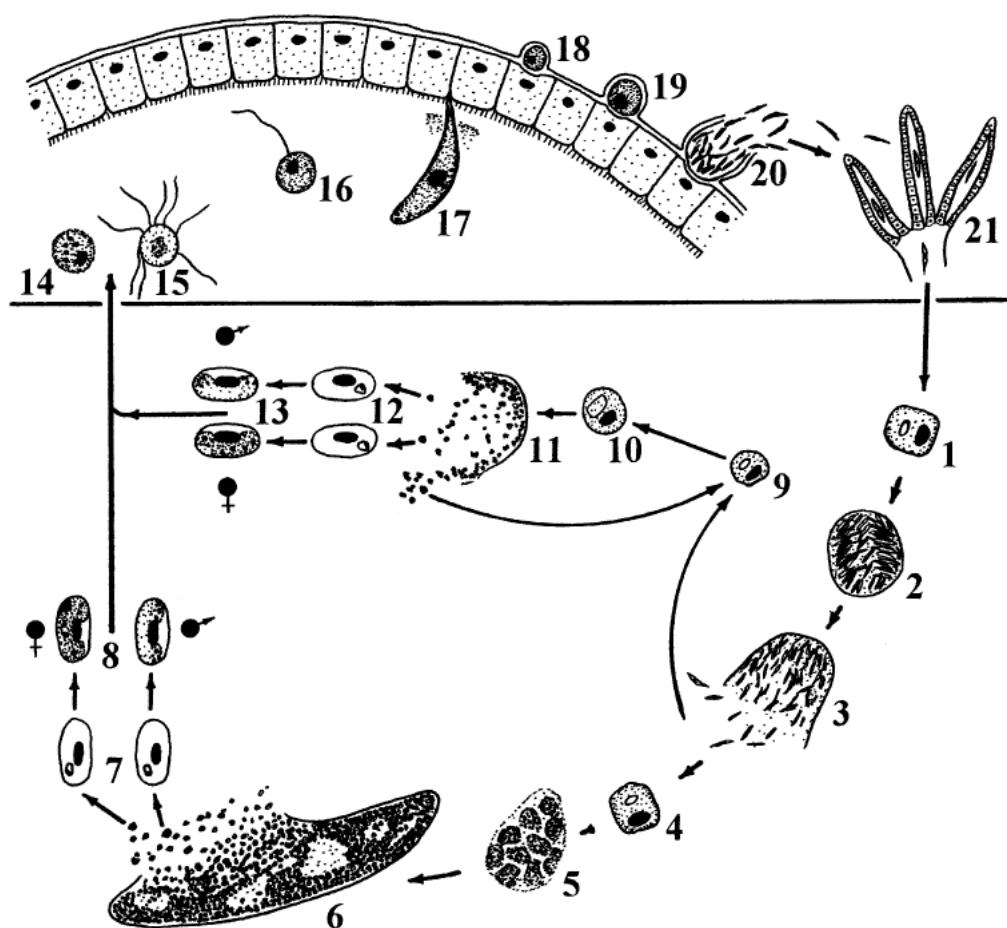


Figura 1. Representação do ciclo biológico de *Haemoproteus mansoni*, parte superior vetor (14–21), parte inferior ave (1–13). 1 – esporozoito em células endoteliais; 2,3 – merontes exoeritrocíticos primários; 4 – merozoítos em células endoteliais; 5,6 – crescimento e megalomerentes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítos na célula retículo endotelial 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 (VALKIŪNAS, 2005). Fonte: Adaptado de Valkiūnas (2005).

2.3 Haemosporida em aves silvestres no Brasil

Adolpho Lutz era médico, parasitologista e primeiro pesquisador brasileiro a se interessar por protozoários hemoparasitos, tendo como base os trabalhos de Danilewsky (SÁ, 2011). Seguindo os passos de Lutz, Aragão trabalhou com *Haemoproteus* no Brasil e por volta de 1908 descreveu, pela primeira vez, o ciclo biológico completo em pombos e em dípteros da família Hippoboscidae. A partir de então vários outros estudos se sucederam, como o de Lucena (1941) que publicou uma revisão a respeito de aves infectadas com várias espécies de hemoparasitos. Lainson et al. (1970), analisaram hemosporídeos em aves Passeriformes. Em 1980, Bennett & Lopes analisaram a prevalência e parasitemia em 3449 aves no Estado de São Paulo. Também no estado de São Paulo, Woodworth-Lynas et al. (1989) agregaram novos dados aos estudos de Bennett & Lopes (1980) e analisaram a prevalência de *Plasmodium* e *Haemoproteus* em 15574 aves por meio de microscopia óptica não havendo identificação ao nível específico dos parasitos. As primeiras espécies de *Haemoproteus* registradas no Brasil foram *H. columbae* e *H. danilewskyi*, o restante dos estudos não identificaram os parasitos ao nível específico (VALKIŪNAS, 2005). Mais recentemente podemos citar os trabalhos feitos por Adriano & Cordeiro (2001), na região sudeste, os quais analisaram a prevalência e parasitemia de hemosporídeos em três espécies de aves Columbiformes, por meio de análises morfológicas. Marques et al. (2007) estudaram a prevalência e parasitemia de hemoparasitos e ectoparasitos em aves no sul do Brasil, por meio de análises morfológicas e de fezes. Do mesmo modo, Fecchio et al. (2007) registraram a prevalência de *Plasmodium* spp. e de *Haemoproteus* spp. em aves do Cerrado brasileiro, utilizando apenas microscopia. Seguindo a mesma metodologia, Sebaio et al. (2010) também registraram a prevalência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. no sudeste brasileiro. Além desses, podemos citar os estudos de Fecchio et al. (2011) e Leite et al. (2013) os quais analisaram a prevalência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. utilizando ferramentas morfológicas. Com o avanço da tecnologia, novas técnicas de análises foram surgindo como aquelas baseadas em biologia molecular e estudos dessa natureza aumentaram rapidamente. Inicialmente, os métodos de diagnósticos por meio da Polymerase Chain Reaction (PCR) aconteciam sem o acompanhamento de caracterização morfológica. Porém, com o passar do tempo fez-se necessária abordagens conjuntas, tornando-se essenciais para o diagnóstico de parasitos, auxiliando na caracterização e taxonomia do grupo de hemosporídeos. No Brasil, Ribeiro et al. (2005), Belo et al. (2011), Fecchio et al. (2013), Chagas et al. (2017), Tostes et al. (2017), Oliveira et al. (2019, 2020), Barino et al. (2020) foram alguns dos estudos que associaram as técnicas morfológicas e moleculares para análises dos parasitos, tendo como foco o registro e diagnóstico dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* em aves silvestres. Há também estudos que visaram registrar a diversidade genética desses organismos e para tal utilizaram apenas uma abordagem molecular, como foi nos trabalhos de Ferreira-Júnior et al. (2017), Villar et al. (2013), Lacorte et al. (2013), Roos et al. (2015), Bosholt et al. (2016) e Fecchio et al. (2017a). Todas essas abordagens mostram que ainda há uma grande quantidade de hemosporídeos a serem descritos em aves nos mais diferentes biomas brasileiros.

2.4 Conceito de Espécie em Haemosporida: identificação e delimitação

A unidade espécie é fundamental na biologia, tendo um grau de importância comparado a genes e células (QUEIROZ, 2007), sendo imprescindível definir espécies para o estudo da biodiversidade e especiação parasitária (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). O problema do conceito de espécie está em como determinar os limites e os números de espécies a partir de dados de observação de cada pesquisador (QUEIROZ, 2007). Mayden (1997) listou 24 conceitos de espécies diferentes e afirmou que esse número pode ser ainda maior havendo várias outras definições alternativas. Apesar do que apontado por Mayden (1997), Queiroz, 2007 listou 13 conceitos de espécie, os quais levam em consideração diferentes áreas. Dentre os diferentes conceitos podemos destacar: morfológico, que se baseia nos caracteres físicos de cada espécie; biológico que reflete na capacidade de gerar descendentes férteis; ecológico, que seriam organismos que possuem o mesmo nicho; e filogenético, que se baseia em linhagens, destacando a história evolutiva das populações (PERKINS, 2000).

Devido à complexidade do ciclo de vida dos organismos e da falta de conhecimento a respeito do isolamento reprodutivo entre as espécies, cada autor utiliza uma métrica para descrever uma nova espécie (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). A necessidade de buscar outras ferramentas surgiu a partir do momento em que pesquisadores observaram que as características morfológicas e a história de vida dos parasitos não eram mais suficientes para determinar espécies, já que essas características podem alterar de acordo com o hospedeiro (PERKINS, 2000). Alguns estudos sugerem critérios para identificação de espécies, como por exemplo, a concordância entre sequências multigênicas e níveis absolutos de divergência genética, diferenças fixas de nucleotídeos, 5% de divergência no *cyt b* aliados com análises morfológicas ou a utilização de múltiplos marcadores moleculares para concordância filogenética (FALK et al., 2011; BENSCH et al., 2007; OUTLAW & RICKLEFS, 2014). O conceito filogenético de espécie tornou-se uma alternativa objetiva e rápida à descrição de espécies de hemosporídeos (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). Antes da era molecular, o conceito de espécie em Haemosporida era baseado apenas em similaridade morfológica. Características como: forma do gametócito, presença ou ausência de pigmentos, quantidade de pigmentos, presença ou ausência de vacúolos, danos à célula hospedeira, danos à espécie de hospedeiro são alguns dos critérios utilizados até os dias de hoje (GARNHAM, 1966; PERKINS, 2000; VALKIŪNAS, 2005). No entanto essa metodologia vem sendo questionada visto que a história de vida do parasito altera de acordo com a espécie hospedeira, além disso, dependendo da técnica utilizada as características morfológicas podem ser alteradas drasticamente (PERKINS, 2000). A necessidade de buscar outras ferramentas surgiu a partir do momento em que pesquisadores observaram que as características morfológicas e a história de vida dos parasitos não eram mais suficientes para determinar espécies, já que essas características podem alterar de acordo com o hospedeiro (PERKINS, 2000).

A partir do século XXI, com a chegada da biologia molecular, as informações obtidas a partir do sequenciamento genético mostraram diferenças entre parasitos que foram antes classificadas como sendo da mesma espécie, segundo a morfologia, agora classificadas como espécies crípticas, devido às diferenças encontradas no DNA (BENSCH et al., 2004). Um exemplo foi relatado em Clark et al. (2015) que discutiram sobre especiação críptica de *Haemoproteus ptilotis* em aves na Austrália. As análises morfológicas confirmaram a presença de infecção única, porém as análises moleculares mostraram distinção entre as espécies de parasitos encontradas. Outro exemplo foi o trabalho de Barino et al. (2020) que

sugerem potenciais espécies crípticas quando analisaram as linhagens de *H. syrnii* encontradas em corujas na mata atlântica brasileira.

Apesar do grande avanço e contribuição científica que as técnicas moleculares trouxeram à taxonomia da ordem Haemosporida, trouxeram também um acúmulo de dados moleculares com linhagens de parasitos não identificadas ao nível específico (BENSCH et al., 2009). Delimitar espécies em Haemosporida tornou-se cada vez mais difícil à medida que novas linhagens foram surgindo apenas com identificação molecular. Além disso, o ciclo biológico do parasito é complexo e faltam muitas informações sobre a reprodução das espécies definidas (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). As técnicas moleculares baseadas em PCR sugerem que a diversidade dos organismos pode estar subestimada (DIMITROV et al., 2016). Somente no gênero *Haemoproteus* há mais de 4000 linhagens do gene *cyt b* depositadas no banco de dados Malavi sendo a grande maioria não identificada ao nível específico (Malavi database, BENSCH et al., 2009). O uso da taxonomia integrativa, que envolve diferentes técnicas para descrição de espécies de Haemosporida, tem sido a metodologia mais aceita nos últimos tempos (PALINAUSKAS et al., 2007; MANTILLA et al., 2016; TOSTES et al., 2017; VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2018; OLIVEIRA et al., 2019). Apesar de ser o modelo de estudo mais aceito nos tempos atuais, taxonomia integrativa se depara com alguns obstáculos. Um deles é a baixa parasitemia de Haemosporida em aves silvestres (OLIVEIRA et al., 2019). Isso dificulta a caracterização morfológica dos parasitos tendo em vista a ausência de estágios eritrocíticos ou gametócitos que possam fazer a diferenciação de espécies (DIMITROV et al., 2016). Outro fator que dificulta a caracterização da espécie, porém agora utilizando uma abordagem molecular, é a co-infecção já que as aves estão sujeitas a serem infectadas por mais de uma espécie de hemosporídeos (OLIVEIRA et al., 2019). O que significa que os protocolos de PCR utilizados para amplificação dos genes tendem ao favorecimento da amplificação da sequência do parasito com maior parasitemia (CHAGAS et al., 2013) ou até mesmo os “primers” utilizados podem corresponder melhor a uma determinada espécie do que a outras (ZEHTINDJIEV et al., 2012).

3 CAPÍTULO 1

**DESCRIÇÃO DE *HAEMOPROTEUS (PARAHAEMOPROTEUS) DAGOSTOAE* N. SP.,
EM *THAMNOPHILUS CAERULESCENS* (PASSERIFORMES: THAMNOPHILIDAE)
DO BRASIL**

3.1 RESUMO

No Brasil, apesar da riqueza de espécies de aves, os trabalhos com hemosporídeos na mata Atlântica são escassos, principalmente em *Thamnophilus caerulescens*. A mata atlântica abriga mais de 890 espécies de aves e é considerada um dos cinco biomas mundiais de importância prioritária para conservação de espécies. Parasitos do gênero *Haemoproteus* já foram encontrados em todos os grupos de aves e regiões zoogeográficas, exceto na Antártica. O presente estudo objetivou descrever e caracterizar aspectos filogenéticos, moleculares e morfológicos da nova espécie *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. encontrada em *Thamnophilus caerulescens*, assemelha-se a *H. majoris*, distinguindo-se por não ter gametócitos na forma de halteres e pelos pigmentos que são mais arredondados em *H. majoris*. Além disso, o presente estudo relata a presença de espécies de *Plasmodium* da Mata Atlântica brasileira. Esse é o primeiro estudo a descrever espécie de *Haemoproteus* em *Thamnophilus caerulescens*, até o momento somente espécies de *Plasmodium* foram descritas nesse grupo de hospedeiros. Esse estudo enfatiza também a importância dos métodos moleculares e morfológicos na identificação de novas espécies de hemosporídeos.

Palavras-chave: Mata Atlântica; hemosporídeos aviáries; citocromo b; Haemosporida;

3.2 ABSTRACT

In Brazil, despite the richness of bird species, work with hemosporids in the Atlantic forest is scarce, especially in *Thamnophilus caerulescens*. The Atlantic Forest host more than 890 species of birds and is considered one of the five world biomes of priority importance for species conservation. Parasites of the genus *Haemoproteus* have already been found in all groups of birds and zoogeographic regions, except in Antarctica. The present study aimed to describe and characterize by phylogenetic, molecular and morphological approaches a new species of haemosporidian, *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. found in *Thamnophilus caerulescens* in which it is similar to the *H. majoris*, distinguished by not having dumbbell-shaped gametocytes and pigments, which are more substances in *H. majoris*. In addition, the present study report *Plasmodium* species from the Brazilian Atlantic Forest. This is the first study to describe a *Haemoproteus* species in *Thamnophilus caerulescens*, since, so far, only *Plasmodium* species have been described in this group of hosts. This study also emphasizes the importance of molecular and morphological methods in the identification of new species of hemosporids.

Key-words. Cytochrome b, Atlantic Forest, Avian haemosporidians, Haemosporida

3.3 INTRODUÇÃO

Hemosporídeos aviários (Apicomplexa: Haemosporida) são um grupo diverso de parasitos com ciclo de vida heteroxeno (PERKINS, 2014; VALKIŪNAS, 2005). Na ordem Haemosporida incluem-se quatro famílias Haemoproteidae Doflein, 1916; Plasmodiidae Mesnil, 1903; Garniidae Lainson, Landau & Shaw, 1971 e Leucocytozoidae Fallis & Bennett, 1961. A família Plasmodiidae é o grupo mais estudado em relação às outras famílias em diversas regiões do mundo, isso se deve ao fato do agente da malária pertencer a esse grupo (VALKIŪNAS, 2005) sendo *Plasmodium* o primeiro gênero descrito da ordem Haemosporida (MARCHIAFAVA & CELLI, 1885). A família Haemoproteidae inclui o gênero *Haemoproteus* Kruse, 1890 que foi proposto por KRUSE (1890), quando descreveu as três primeiras espécies desse gênero, *H. columbae* (espécie tipo), *H. danilewskii* e *H. passeris*, sendo as duas primeiras em Columbiformes e a última em Passeriformes. O gênero *Haemoproteus* é dividido em dois subgêneros (*Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*): *Haemoproteus* infectando aves da ordem Columbiformes e *Parahaemoproteus* infectando outras ordens de aves (BELO, 2011).

Infecções causadas por hemosporídeos em aves são conhecidas e podem variar de assintomáticas a fatais (FERRELL et al., 2007). Além de afetar o sucesso reprodutivo do hospedeiro, reduzir o fitness, causar apatia e morte (MERINO et al., 2000; VALKIŪNAS et al., 2013). Segundo FERRELL (2007) *Haemoproteus* spp. tem baixa patogenicidade e quase nunca são causa de mortalidade, exceto para Columbiformes, codornizes e perus. Apesar disso, há registro na literatura de mortes de aves não Columbiformes em um zoológico nos Estados Unidos causadas por infecção por *Haemoproteus* spp. (FERRELL et al., 2007). HERNÁNDEZ-LARA et al. (2017) analisaram como os parasitos respondem aos parâmetros ambientais tais como degradação ambiental, seca, chuva e como o ambiente pode influenciar na carga parasitária do hospedeiro. Segundo este estudo, se o ambiente possui boas condições de sobrevivência com alimento abundante, o hospedeiro teria melhor condição corporal sendo menos suscetível ao desenvolvimento de alta patogenicidade por parte do parasito. Assim, fica clara a necessidade de se ampliar estudos sobre diversidade, especificidade e patogenicidade/dano de hemosporídeos em aves (VALKIŪNAS et al., 2013; ATKINSON et al., 1988).

Apesar do grande número de estudos ao redor do mundo, esses organismos foram pouco analisados na região Neotropical (CLARK et al., 2014). Trabalhos com hemosporídeos em aves silvestres ainda são escassos, principalmente na Floresta Atlântica (LACORTE et al., 2013). Esse bioma é considerado um dos cinco biomas mundiais de importância prioritária para conservação (Hay et al., 2000) e está entre as quatro regiões mais importantes dos neotrópicos em termos de diversidade de aves ameaçadas (Stotz et al., 1996), demonstrando que estudos ecológicos, genéticos e evolutivos relacionados à parasitos da avifauna desta região são muito importantes e podem ajudar na conservação de muitas espécies de aves. A maioria dos trabalhos nessa região não identificou os parasitos no nível específico (RIBEIRO et al., 2005; SANTIAGO-ALARCON et al., 2010; LACORTE et al., 2013; FECCHIO et al., 2015) apesar da identificação específica contribuir para os programas de conservação de espécies hospedeiras, especificidade parasitária, diversidade e distribuição dos parasitos (OUTLAW E RICKLEFS, 2014). Segundo Santiago- Alarcon & Marzal (2020) poucos ou nenhum trabalho sobre hemosporídeos aviários foram produzidos em alguns países tropicais até o ano 2000 relacionados aos aspectos moleculares. Ainda segundo os autores esse padrão vem mudando, porém muitos estudos ainda são necessários para um melhor entendimento

sobre esses organismos e como esse conhecimento ajudaria na conservação de espécies hospedeiras. A quantidade de dados moleculares acumulados mostra que ainda é necessário muito trabalho no que diz respeito à taxonomia desses organismos (PERKINS et al., 2011). Tradicionalmente, a identificação e taxonomia desses parasitos dependiam das características da história de vida baseada na morfologia e as espécies hospedeiras as quais infectam. Entretanto, abordagens moleculares para resolver a filogenia interna do grupo têm desafiado muitas dessas hipóteses tradicionais (PERKINS, 2014).

Thamnophilidae é uma das famílias com maior número de espécies entre os Passeriformes (SIBLEY & AHLQUIST, 1990; IRESTEDT et al. 2002) e são aves geralmente adaptadas a áreas de floresta, dificilmente se locomovendo por grandes distâncias ou atravessando áreas abertas (ZIMMER & ISLER, 2003). A espécie *Thamnophilus caerulescens* Vieillot, 1816 pode ser encontrada na maior parte da América do Sul, com distribuição desde a região dos Andes no Peru até a Argentina e, contrariando a característica sedentária da família, realiza movimentos sazonais até o extremo sul de sua distribuição, no norte da Argentina, sendo aparentemente residente em outras localidades (ZIMMER & ISLER, 2003), podendo ter papel importante na transmissão e carreamento de hemoparasitos para outras áreas e aves da América do Sul. Apesar da grande distribuição e ocorrência, apenas *Plasmodium* spp. foram registrados nessa espécie de ave (LACORTE et al., 2013), sendo esse o primeiro trabalho a registrar uma espécie de *Haemoproteus* em *T. caerulescens*.

Estudos como os de Valkiūnas et al. (2008), Merino et al. (2012) e Valkiūnas et al. (2013) abordaram o uso de técnicas morfológica, molecular e filogenética para a descrição de novas espécies de *Haemoproteus* e *Plasmodium*. Por isso, cada vez mais, o uso da taxonomia integrativa vem sendo aplicada, objetivando o melhoramento dos parâmetros utilizados para descrição das espécies (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). Nesse estudo nós descrevemos a nova espécie *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. infectando aves *Thamnophilus caerulescens* da Floresta Atlântica brasileira com o auxílio de ferramentas morfológicas, moleculares e filogenéticas. Também detectamos a presença de *Plasmodium* sp. nessas aves. Esse é o primeiro registro de *Haemoproteus* sp. em aves da espécie *T. caerulescens*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Locais de Estudo e Coleta das Amostras de Sangue

O estudo foi realizado com 21 aves da espécie *Thamnophilus caerulescens* (Vieillot, 1816), amostradas em três fragmentos da Mata Atlântica na Zona da Mata de Minas Gerais (Tabela 1) no período de março de 2013 a dezembro de 2015. As aves foram capturadas com auxílio de redes de neblina (12x3 m com malha de 38 mm) colocadas em transectos lineares de 10 redes em quatro pontos no interior de três fragmentos de Mata Atlântica em Minas Gerais. As redes permaneceram abertas por aproximadamente 10 horas a partir das 06:00 e eram vistoriadas a cada 20 minutos, aproximadamente. As aves capturadas eram imediatamente analisadas, anilhadas e soltas. Amostras de sangue (~ 30µl) foram coletadas por punção na veia braquial e processadas para detectar e identificar hemosporídeos por meio

de análises microscópicas e moleculares. Os esfregaços sanguíneos foram preparados e imediatamente secos em temperatura ambiente. As amostras de sangue para análises moleculares foram colocadas em microtubos de 1,5 ml e armazenadas a -20°C para análises posteriores. A identificação das aves foi feita por comparação com as pranchas disponíveis em Ridgely *et al.* (2009), Sigrist (2014) e Evangelista-Vargas e Silveira (2018) anilhadas após a captura, pesadas e em seguida liberadas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo protocolo nº 042/2012 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268-3.

Tabela 1. Localidade (municípios) e número de hospedeiros coletados em fragmentos da Mata Atlântica na Zona da Mata mineira.

Localidade (Zona da Mata Mineira)	Número de aves coletadas
Juiz de Fora, Distrito de Caeté (21°48'23"S, 43°15'45.7"W)	1
Juiz de Fora, Jardim Botânico UFJF (21° 43' 52.5" S, 43° 22' 16.2" W)	19
Juiz de Fora, Jardim Botânico UFJF (21° 43' 52.5" S, 43° 22' 16.2" W)	1

3.4.2 Análises Morfológicas

Foram feitos três esfregaços sanguíneos de cada ave, sendo o de melhor qualidade utilizado para cálculo da prevalência de infecção, parasitemia, identificação e caracterização morfológica das espécies de hemoparasitos encontradas. Quando nenhum parasito era encontrado no esfregaço sanguíneo mais uma lâmina era examinada para confirmação do resultado. As lâminas foram secadas ao ar, fixadas em metanol por 3 minutos e coradas com Giemsa na diluição de 1:9 em água destilada, por 40 minutos conforme Valkiūnas *et al.*, (2008). Os esfregaços foram analisados sob lente de imersão em microscópio fotônico (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) em aumento de 1000x para a observação de 100 campos microscópicos objetivando estimar a prevalência da infecção de acordo com Bush *et al.* (1997). Para a estimativa da parasitemia de cada indivíduo e a quantificação do número de formas eritrocitárias dos parasitos foram seguidos os parâmetros de Godfrey *et al.*, 1987. A morfometria dos parasitos foi realizada utilizando o software Image Pro Plus 6.0, medindo cerca de 50 macrogametócitos e 50 microgametócitos adultos, de acordo com Valkiūnas (2005). Para cálculo do deslocamento do núcleo (NDR) foi utilizada a fórmula $2X/(X + Y)$, onde Y representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo da célula hospedeira, no lado ocupado pelo parasito; e X representa a distância entre a periferia da

célula e a periferia do núcleo da célula hospedeira, no lado não ocupado pelo parasito, de acordo com Bennett et al. (1972).

3.4.3 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento

Somente as amostras positivas nas análises morfológicas foram amplificadas. O sangue foi preservado até o momento da extração. Foram extraídos 20 μ L do DNA total de cada amostra utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega MA, EUA) seguindo instruções descritas pelo fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000 ®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e padronizado para uma concentração de 100ng/ μ L. Foi utilizado um protocolo de *nested*-PCR para amplificação do gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*). Para a primeira reação foram utilizados os iniciadores HaemFNI (5'-CATATATTAAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTG-3'), descritos por Hellgren et al. (2004). Esses iniciadores amplificaram 618 pb do gene *cyt b* de espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Para a segunda reação foram utilizados os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTCGATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') propostos por Bensch et al. (2000), que amplificam aproximadamente 525 bp dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. A primeira reação consistiu em um volume final de 25 μ L, onde foram utilizados 12,5 μ L de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, MA, EUA), 2,5 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10 μ M (HaemFNI e HaemR2), 5 μ L de DNA genômico e água deionizada para completar o volume até 25 μ L. As reações foram feitas usando Hot Start, onde as amostras de DNA são aquecidas à 65° C e só então é adicionado o mix de amplificação. Essa metodologia pode reduzir amplificações não específicas e aumentar a sensibilidade da reação (Kaboev et al., 2000). O ciclo de PCR seguiu o proposto por Hellgren et al. (2004). As mesmas condições foram também usadas na segunda reação, exceto que 1 μ L do produto da primeira reação foi utilizado substituindo o DNA genômico e 1 μ L dos iniciadores HaemF e HaemR2 a uma concentração de 10 μ M usados. Os produtos de amplificação foram confirmados por eletroforese em gel, utilizando-se 5 μ L do produto da segunda reação juntamente com 2 μ L de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®, São Paulo, Brasil) em gel de agarose 2% (Invitrogen®, Califórnia, EUA), visualizados sob luz ultravioleta.

Como controle negativo, utilizou-se nuclease-free water e como controle positivo usamos o DNA total extraído de uma amostra de *Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* Brumpt, 1935. Os produtos amplificados foram purificados usando o kit de purificação ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems®, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados em ambas as direções com o conjunto de primers HaemF e HaemR2 (Bensch et al., 2000) no sequenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems®, CA, EUA).

3.4.4 Análises Filogenéticas

No presente estudo foi gerada uma sequência referente ao gene *cyt b*, a qual foi designada ao gênero *Haemoproteus* utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Essa sequência foi incorporada a dois datasets distintos, no primeiro dataset

objetivamos delimitar a unidade evolutiva taxonômica a qual a nova linhagem de *Haemoproteus* pertence, utilizando um método computacional de delimitação de espécie. No segundo dataset, objetivamos o posicionamento filogenético da nova linhagem de *Haemoproteus* em relação aos demais hemosporídeos.

Para a delimitação das unidades taxonômicas evolutivas (ESUs) foi utilizado um dataset com 982 sequências do gênero *Haemoproteus*, sendo todas as sequências acima de 430 pb do gene *cyt b* depositadas no MalAvi, no período de setembro/2019, além da sequência obtida no presente estudo e mais três sequências para o grupo externo, totalizando 986 sequências. Como grupo externo foram utilizadas as espécies *Leucocytozoon buteonis*, *Leucocytozoon fringillinarum* e *Leucocytozoon quynzae*. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa MAFFT v. 7.0 (Katoh et al., 2019), editado no programa Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) a fim de eliminar sítios pobramente alinhados, resultando em uma matriz de 479 pb. Para a seleção do modelo ótimo de sequências evolutivas, o conjunto de dados foi analisado pelo modelo JModel-Test v. 2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) na plataforma MEGA X (KUMAR et al., 2018), obtendo-se o modelo de evolução de sequência GTR + G + I. A inferência filogenética das linhagens de *Haemoproteus* foi conduzida sob análise de Máxima Verossimilhança (ML) implementada no software RaxML (STAMATAKIS, 2014). A estimativa de delimitação específica foi conduzida no servidor online do programa MPTP (disponível em: <http://mptp.h-its.org>), utilizando a filogenia obtida no RaxML como input, remoção do grupo externo e opções padrão do programa.

Para as reconstruções filogenéticas, um dataset foi compilado apresentando a sequência do presente estudo, juntamente com 109 sequências identificadas à nível específico (denominadas morfoespécies), oriundas do banco de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009), além de 14 sequências de linhagens não identificadas à nível específico. Estas linhagens não identificadas eram geneticamente similares à linhagem do presente estudo com base na análise prévia de delimitação computacional de espécies. Como grupo externo foram utilizadas as espécies *Leucocytozoon buteonis* e *Leucocytozoon* sp. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa MAFFT v. 7.0 (KATOH et al., 2019), editado no programa Gblocks (TALAVERA & CASTRESANA, 2007), a fim de eliminar sítios pobramente alinhados, resultando em uma matriz de 479 pb. Para a seleção do modelo ótimo de sequências evolutivas, o conjunto de dados foi analisado pelo modelo JModel-Test v. 2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) na plataforma MEGA X (KUMAR et al., 2018), obtendo-se o modelo de evolução de sequência GTR + G + I. Também na plataforma MEGA X (KUMAR et al., 2018), foi calculada a divergência genética entre as espécies (Figura 1). A inferência filogenética das linhagens de *Haemoproteus* foi conduzida sob análise de Máxima Verossimilhança (ML) implementada no software RaxML (STAMATAKIS, 2014). Os valores de suporte dos clados foram avaliados com o critério de auto-convergência de bootstrap do RaxML (STAMATAKIS, 2014) com 500 pseudo-replicatas. A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada usando o programa MrBayes in XSEDE v. 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012), disponível no Portal CIPRES (MILLER et al., 2010), com exclusão de 25% das árvores geradas (“Burn-in”). A árvore final compreendeu 100 sequências.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Prevalência e Parasitemia

Foram analisadas 21 aves da ordem Passeriformes, pertencentes à espécie *Thamnophilus caerulescens*. Dentre as aves analisadas, uma estava infectada por uma nova espécie de *Haemoproteus* com prevalência de 5.5% (n° de infectados / n° de examinados x 100) e a parasitemia de 0.42%. E outra ave da mesma espécie, estava infectada com *Plasmodium* sp., com prevalência de 5.5% e apresentando parasitemia de 0.18%. Co-infecção no material tipo da nova espécie de *Haemoproteus* não foi detectada, por exame microscópico ou por PCR, assim a descrição da nova espécie é baseada em infecção única.

3.5.1.1 Caracterização morfológica de *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. (linhagem XXXX) de aves Passeriformes do Brasil (Figura 2 A–L)

Hospedeiro-tipo: Choca da mata, *Thamnophilus caerulescens* Vieillot, 1816 (Passeriformes, Thamnophilidae).

Sequência de DNA: linhagem mitocondrial citocromo b XXXXXX (478 bp, GenBank acesso XXXXXX);

Localidade-tipo: Fragmento Floresta de Mata Atlântica, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (21° 48' 23.0" S, 43° 15' 45.7" W).

Local da infecção: eritrócitos maduros; sem outros dados.

Prevalência: 1 de 21 aves (5.5%).

Espécime- tipo: Hapantótipo (número de acesso: XXXXXX, *Thamnophilus caerulensis*, DATA DO DEPÓSITO, LOCAL, coletado por NOME) foi depositado em LOCAL, ESTADO E PAÍS. Parapantótipo (número de acesso: XXXXXX outros dados as for the hapantotype) foi depositado em LOCAL, ESTADO E PAÍS.

Material adicional: Lâminas de sangue para comprovação (accession number XXXXXX) foram depositadas em LOCAL, ESTADO E PAÍS.

Distribuição: A linhagem número XXXXX foi encontrada somente no Brasil. Não existem dados suficientes que possam afirmar que a espécie é restrita da região da Mata Atlântica.

Etimologia: O nome da espécie é em homenagem à professora Doutora Marta Tavares D'Agosto, que dedicou a vida ao estudo da parasitologia.

Descrição de *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. (linhagem XXX) de aves Passeriformes da Mata Atlântica brasileira (Figura 1, Tabela 2).

Gametócitos jovens (Figura 1 a- d): Os gametócitos em início de formação podem ser vistos em diferentes posições dos eritrócitos infectados, porém mais frequentemente na posição polar ou subpolar. Se desenvolvem em eritrócitos maduros. Possuem formato arredondado ou oval, contorno irregular e não estão aderidas ao núcleo do eritrócito (Figura 1 a-b). Apresenta

uma das extremidades afiladas, assemelhando uma cauda (Figura 1 a-d). O citoplasma é corado claro, com aparência lisa, pouco granular e com núcleo bem definido. Com o desenvolvimento, os gametócitos se estendem ao longo do núcleo do eritrócito podendo ou não tocá-lo. Possuem formato alongado, contorno irregular e prolongamentos “finger like” com uma das extremidades mais finas. Um acúmulo de pigmentos de hemozoína pode ser visto na extremidade do parasito, assim como presença de grânulos de volutina (Figura 1 c-d). Núcleo do parasito pequeno e com formato irregular.

Macrogametócitos (Figura 1 e-j): Presentes em eritrócitos maduros, estendendo-se ao longo de seus núcleos (Figura 1 e). Circulam parcialmente o núcleo do eritrócito, envolvendo-os levemente com suas extremidades, porém não o circulam completamente (Figura 1 f). Apresenta contorno uniforme ou levemente irregular nas extremidades com citoplasma azul claro e homogêneo. Possui vários vacúolos de diferentes tamanhos e posições (Figura 1 f-g). Em mais de 20% dos indivíduos foram observadas a rotação no eixo do núcleo do eritrócito (Figura 1 g). As formas maduras tocam tanto o núcleo quanto a membrana do eritrócito, o que é um caráter morfológico visto que nem todas as espécies possuem essa característica (Figura 1 h). Podem ser observados acúmulos de cromatina no núcleo do parasito, com formas variáveis (Figura 1 e, f & h). Presença de grânulos de volutina (Figura 1 g-h). Um nucléolo bem evidente pode ser visto na maioria das formas (Figura 1 f-h). Preenchem os espaços até os polos, deslocando acentuadamente o núcleo do eritrócito lateralmente, podendo deslocá-lo até a outra margem da membrana da célula, com NDR=0-0.86 (0.51 ± 0.17) (Figura 1 i-j). Formas em eritrócitos anucleados não foram encontradas. O núcleo do parasito é médio no tamanho, bem corado e evidente, de forma variável frequentemente oval de posição subterminal e podem tocar a membrana do parasito, em alguns casos tocam os dois lados. Grânulos de pigmentos ovais ou alongados, geralmente médios ($0.5\text{-}1.0\mu\text{m}$) no tamanho, usualmente concentrados na extremidade do parasito ou espalhados aleatoriamente pelo citoplasma, variando de 9 a 15 (Tabela 2). Hipertrofia em área e comprimento observadas nos eritrócitos parasitados (Tabela 2). Indivíduos com formato de halter não foram observados.

Microgametócitos (Figura 1 k-l): Presentes em eritrócitos maduros, estendendo-se ao longo de seus núcleos envolvendo-os levemente mas não totalmente (Figura 1 k-l). Tocam a membrana e o núcleo do eritrócito. Contorno regular, citoplasma homogêneo com presença de vacúolos. Possuem grânulos de pigmentos de volutina que se concentram na extremidade do parasito. O número de pigmentos é um pouco menor do que nos macrogametócitos, variando de 7 a 14. Os pigmentos são espalhados no citoplasma, porém à medida que o parasito cresce se acumulam nas extremidades. O núcleo do parasito é grande no tamanho (área do núcleo 19.49 ± 2.71), difusos, alongados, geralmente de posição central e tocam a membrana do parasito. Com a medida que o parasito cresce, o núcleo do eritrócito vai sendo deslocado lateralmente até tocar a membrana. Nucléolo não foi observado. Uma leve rotação do eixo (Figura 1 g) do eritrócito foi observada em mais de 30% dos indivíduos.

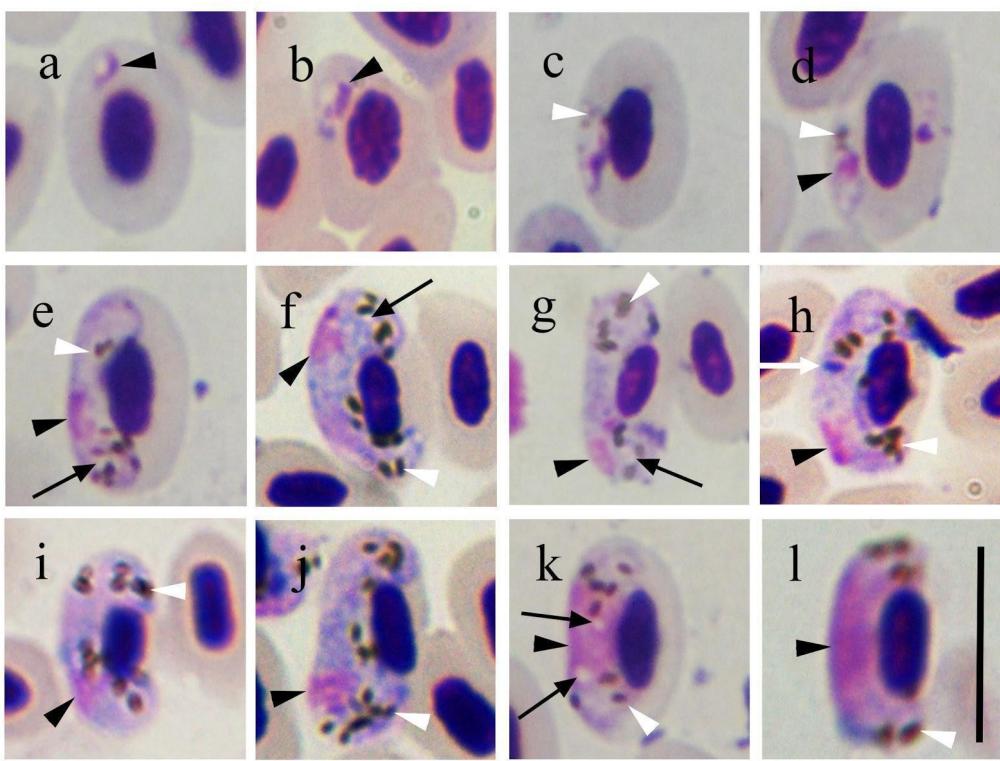


Figura 1. Formas evolutivas de *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoeae* n. sp. encontradas em esfregaço sanguíneo de aves *T. caerulescens* em fragmentos de Mata atlântica. a-d gametócitos jovens; e-j Macrogametócitos; k-l Microgametócitos. Cabeças de setas pretas indicam núcleo do parasito, cabeças de setas brancas indicam grânulos de hemozoína, setas pretas longas indicam vacúolo, setas pretas curtas indicam nucléolo. Barra= 10 µm.



Figura 2. Divergência genética encontrada entre as linhagens pertencentes ao clado de *H. dagostoeae* n. sp e entre as espécies com morfologia semelhante a espécie estudada, em porcentagem.

Observações Taxonômicas

Entre os parasitos de aves pertencentes à ordem Passeriformes, os gametócitos de *H. dagostoa*n. sp. são particularmente similares a *Haemoproteus majoris* (Laveran, 1902) devido a padrões de crescimento, onde os gametócitos deslocam o núcleo do eritrócito infectado e as características morfológicas parecidas, como tamanho e posição do núcleo dos gametócitos. *Haemoproteus dagostoa*n. sp. pode ser distinguido de *H. majoris* por não ter gametócitos na forma de halteres e por apresentar a extremidade afilada assemelhando uma cauda. Essa é a primeira espécie de *Haemoproteus* identificada em *T. caerulescens*.

3.5.2 Análises Filogenéticas

Uma nova linhagem de *Haemoproteus* baseada no gene *cyt b* foi encontrada e identificada ao nível de morfoespécie (Figura 3). A análise filogenética mostrou que *Haemoproteus dagostoa*n. sp. agrupou-se a outras linhagens do subgênero *Parahaemoproteus* não identificadas morfologicamente ao nível de espécies (Figura 4). Portanto, não formou clado com nenhuma espécie já descrita, sugerindo a presença de uma linhagem geneticamente diferente.

No gênero *Thamnophilus* já foram encontradas diversas linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, porém em *Thamnophilus caerulescens* foram encontradas somente quatro linhagens de *Plasmodium* e nenhuma de *Haemoproteus* relatadas no banco de dados Malavi (BENSCH et al. 2009). Sendo assim, nosso trabalho registra e descreve pela primeira vez uma espécie de *Haemoproteus* em *Thamnophilus caerulescens* baseada em ferramentas moleculares, morfológicas e filogenéticas. É importante notar que esse patógeno é facilmente distinguível de outras espécies de acordo com a morfologia dos seus gametócitos (Figura 2) e divergem geneticamente 2,79% de *H. pallidus*, 2,57% de *H. minutus*, 2,35% de *H. pallidulus* e 3,21% de *H. palloris* (Figura 1) que são as linhagens encontradas mais próximas a do presente estudo identificadas ao nível de espécie.

As análises de delimitação foram feitas para determinar as linhagens mais próximas ao do presente estudo e em seguida serviram como base para a execução da árvore filogenética final que confirmaram que a sequência da nova espécie está localizada em um clado monofilético bem suportado (Figura 3). A linhagem agrupou-se juntamente com outras linhagens de *Haemoproteus* spp. pertencentes ao subgênero *Parahaemoproteus* não identificadas ao nível específico.

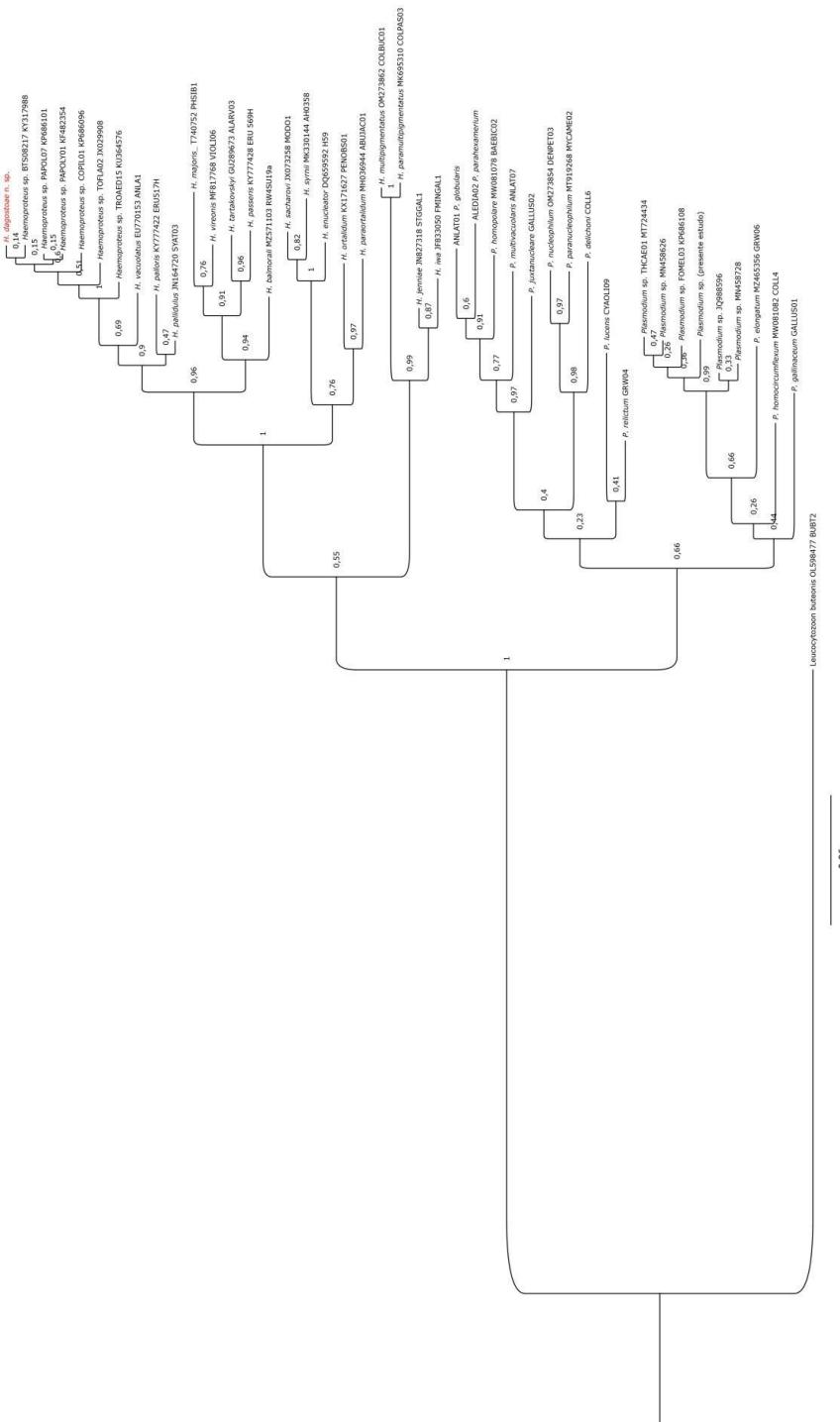


Figura 3. Árvore de delimitação da unidade evolutiva taxonômica, com base no gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*). Espécies de *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Haemosporida) foram escolhidas como grupo-externo.

Tabela 2. Morfometria dos gametócitos maduros de *Haemoproteus dagostoeae* n. sp. em eritrócitos de *T. caerulescens*.

Características			
Macrogametócito (n=30)		Microgametócitos (n=30)	
Comprimento	12.62–20.36 (17.41 ± 1.76)	Comprimento	13.83–20.02 (16.81 ± 1.48)
Largura	2.22–4.16 (3.10 ± 0.44)	Largura	2.65–5.09 (3.53 ± 0.67)
Área	36.34–55.92 (47.23 ± 4.78)	Área	39.29–53.21 (47.24 ± 3.7)
Núcleos dos Macrogametócitos		Núcleo dos Microgametócitos	
Comprimento	2.36–4.49 (3.55 ± 0.52)	Comprimento	4.66–10.45 (7.44 ± 1.19)
Largura	1.71–3.03 (2.24 ± 0.41)	Largura	1.68–4.52 (2.92 ± 0.66)
Área	4.46–6.91 (5.76 ± 0.7)	Área	14.79–25.12 (19.49 ± 2.71)
Grânulos de pigmentos	9–15 (11.7 ± 1.76)	Grânulos de pigmentos	7–14 (10.76 ± 1.73)

em dados morfológicos, moleculares e filogenéticos encontrado pela primeira vez em *T. caerulescens* na Mata Atlântica, no sudeste brasileiro. Esse estudo enfatiza também a importância dos métodos moleculares e morfológicos na identificação de novas espécies de hemosporídeos. A caracterização morfológica da espécie em questão apresentou gametócitos de *Haemoproteus* sp. com padrões de crescimento e características similares principalmente à descrição de *H. majoris* apresentadas em aves da ordem Passeriformes. Características como o núcleo do eritrócito que é deslocado pelos gametócitos maduros, tamanho e posição dos gametócitos e do núcleo dos mesmos podem ser encontradas na espécie citada e também na espécie descrita no presente estudo. Entretanto, *H. dagostoeae* n. sp. pode ser diferenciada pelo número de vacúolos, rotação do núcleo do eritrócito, por não ter gametócitos na forma de halteres e pelo formato e número dos pigmentos. Sabe-se que variações no formato e número de gametócitos podem ocorrer em consequência da preparação dos esfregaços em tempos diferentes de infecção (VALKIŪNAS, 2005). No entanto, a preparação das lâminas foi executada de maneira correta e os esfregaços eram de boa qualidade. Logo, podemos atribuir essas variações do parasito ao desenvolvimento do mesmo (BURRY-CAINES & BENNETT, 1992).

Apesar da proximidade morfológica entre a espécie do presente estudo e *H. majoris*, a espécie encontrada não forma clado com nenhuma outra espécie descrita morfologicamente. A linhagem mais próxima a *H. dagostoeae* n. sp. é PAPOLY01 encontrada no Peru em *Pachyramphus polychopterus*. Todas as demais linhagens próximas à espécie do presente estudo não foram identificadas ao nível específico, apresentando apenas dados moleculares.

A importância dos estudos de hemosporídeos aviários está vinculada aos aspectos ecológicos e de conservação das espécies hospedeiras, tendo em vista que estas afetam diretamente os processos ecológicos, evolutivos e comportamentais de seus hospedeiros (FECCHIO et al., 2020). A filogenia baseada em sequências do gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*) pode revelar os possíveis vetores e informações para planejar estudos futuros (VALKIŪNAS et al., 2013). No entanto, deve-se estar atento ao fato de que os protocolos de PCR são métodos indiretos de detecção de haemosporida, ou seja, não apenas o DNA alvo será amplificado (VALKIŪNAS, 2008). Por isso, o uso da taxonomia integrativa vem sendo aplicada buscando o melhor parâmetro a ser utilizado para definição das espécies, constituindo um modelo para estudo taxonômico do grupo (OUTLAW & RICKLEFS, 2014).

A infecção foi confirmada por PCR e microscopia. Mesmo sendo uma ave comum e de grande distribuição na América do Sul (ZIMMER & ISLER, 2003), só foram registrados até o momento quatro linhagens de *Plasmodium* sp. nesse hospedeiro (Malavi). E, até o presente estudo, nenhuma linhagem de *Haemoproteus* de acordo com o banco de dados Malavi. Sendo assim, espécies de *Haemoproteus* spp. não são comumente encontradas nessa espécie de ave.

A análise filogenética também confirmou que *H. dagostoae* n. sp. é uma espécie nova, não sendo próxima das espécies já descritas pois não formou clado com nenhuma delas como mostra a análise de delimitação (Figura 4). Mostrou ainda que essa espécie pertence ao subgênero *Parahaemoproteus* e que se agrupou juntamente com as linhagens do mesmo clado: KF482354, KP686101, KY317988, KP686096 e JX029908 (Figura 3). As linhagens citadas foram encontradas em aves da Ordem Passeriformes na região da América do Sul, sendo que apenas uma linhagem, KF482354, foi encontrada na família Thamnophilidae. A divergência genética entre a espécie mais parecida morfológicamente (*H. majoris*) com a nova espécie descrita foi de 4,67% (Figura 2). Apesar da proximidade morfológica nota-se grande divergência genética entre as espécies citadas acima, principalmente em relação à última. Hellgren et al. (2007) sugerem que linhagens de *Haemoproteus* spp. baseadas no gene *cyt b* com uma divergência genética superior a 5% seja morfológicamente diferenciada na maioria dos casos. Outros estudos também encontraram espécies morfológicamente distintas com divergência genética de 1% ou menos (VALKIŪNAS et al. 2008 a; KRIZANAUSKIENE et al. 2010; LEVIN et al. 2012). *Plasmodium* spp. foram registradas em *Thamnophilus caerulescens* por White et al. (1978), Dias et al. (1984), Ribeiro et al. (2005) e Lacorte et al. (2013), entretanto os autores não identificaram morfológicamente as espécies. No presente estudo as espécies de *Plasmodium* encontradas tiveram prevalência (apenas uma ave infectada) e parasitemia de infecção baixas e não puderam ser identificadas ao nível específico, já que não foram encontradas todas as formas das fases eritrocíticas.

Em conclusão, o presente estudo identifica e descreve em detalhes *Haemoproteus (Parahaemoproteus) dagostoae* n. sp. utilizando técnicas morfológicas, moleculares e filogenéticas. Enfatiza a importância de ferramentas combinadas para o estudo taxonômico do grupo Haemosporida, principalmente na presença de coinfecções.

3.7 AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Parasitologia Básica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade concedida à Marta D'Agosto, a CAPES pela bolsa de doutorado concedida a Rafaela Venançoni Matoso e CNPq pela bolsa de doutorado concedida à Raquel Tostes.

4 CAPÍTULO 2

NOVOS DADOS SOBRE PARASITOS *HAEMOPROTEUS* SP. EM AVES DA FAMÍLIA CRACIDAE

4.1 RESUMO

A ordem Haemosporida é um clado bem suportado de parasitos de parasitos heteroxenos transmitidos por insetos dipteros e frequentemente encontrados parasitando aves silvestres. Esses parasitos já foram relatados em todas as regiões zoogeográficas do mundo, exceto na Antártida. Um dos potenciais hospedeiros de hemosporídeos é a família Cracidae, que inclui aproximadamente 50 espécies, das quais 22 estão presentes no Brasil, classificadas em nove gêneros. Dados sobre organismos da família Cracidae que são parasitados por hemosporídeos são escassos, com apenas três espécies de *Haemoproteus* sendo registradas nesse grupo de aves. Encontramos *Haemoproteus* spp. em todas as aves analisadas da espécie *Penelope obscura bronzina*. Dentre os parasitos encontrados, observamos duas linhagens de *Haemoproteus* (PENOBS02 e PENOBS03), que foram caracterizadas por meio de abordagens morfológicas, moleculares e filogenéticas. Os dados morfológicos dos parasitos hemosporídeos de Cracidae, juntamente com nossos resultados filogenéticos, permitem discussões sobre a taxonomia dos parasitos *Haemoproteus* que infectam aves da família Cracidae.

Palavras-chave: Hemosporídeos aviários, *Penelope obscura bronzina*, mata Atlântica, *Haemoproteus ortalidum*, *Haemoproteus paraortalidum*.

4.2 ABSTRACT

The Haemosporida order is a well-supported clade of heteroxenous parasites transmitted by dipteran insects and frequently found parasitizing wild birds. These parasites have already been reported in all zoogeographic regions of the world, except for Antarctica. One of the potential hosts of haemosporidians is the Cracidae family, which includes approximately 50 species, 22 of which are present in Brazil, classified within nine genera. Data on haemosporidian infecting individuals of the Cracidae family is scarce, with only three *Haemoproteus* species being recorded in this group of birds. We found *Haemoproteus* spp. infection in all *Penelope obscura bronzina* analyzed. Among the parasites found, we observed two lineages of *Haemoproteus* (PENOBS02 and PENOBS03), which were characterized by morphological, molecular and phylogenetic approaches. The morphological data on cracid haemosporidian parasites, together with our phylogenetic results, allows discussions on the taxonomy of the *Haemoproteus* parasites that infect birds of the Cracidae family.

Keywords: Avian Haemosporidia, *Penelope obscura bronzina*, Atlantic Forest, *Haemoproteus ortalidum*, *Haemoproteus paraortalidum*.

4.3 INTRODUÇÃO

A ordem Haemosporida Danilewsky, 1885 (Alveolata, Apicomplexa) constitui um clado diversificado e bem suportado de parasitos heteroxenos obrigatórios, transmitidos por insetos dípteros hematófagos (Diptera) e atualmente distribuídos em quatro famílias e 15 gêneros (PERKINS, 2014).

Um importante subconjunto deste clado, os hemosporídeos aviários são representados por quatro gêneros: *Fallisia*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium*, e são reconhecidos como amplamente disseminados, infectando aves em quase todos os clados filogenéticos e regiões zoogeográficas (FECCHIO et al. 2020). Podem causar doenças graves e até mesmo letais, danificando vários órgãos (VALKIŪNAS & IEZHOVA, 2017) e, assim, estudos sobre hemosporídeos aviários são importantes para avaliar possíveis impactos dessas infecções na vida selvagem.

A família Cracidae (Galliformes) inclui cerca de 50 espécies atualmente classificadas em duas subfamílias e nove gêneros (*Aburria*, *Chamaepetes*, *Crax*, *Nothocrax*, *Oreophasis*, *Ortalis*, *Pauxi*, *Penelopina* e *Penelope*). Ocorrem desde o Neártico (sul do Texas, EUA) até a região Neotropical, estendendo-se das Guianas e Venezuela até a parte central da Bolívia, Brasil, Uruguai e norte da Argentina (CBRO, 2015). Todas as aves cracídeos apresentam padrões morfológicos homogêneos e são caracterizadas principalmente por seus grandes tamanhos corporais, atingindo até ~90 cm de comprimento e ~5 kg de peso (DEL HOYO et al. 1994). Por causa disso, eles são vítimas de caça ilegal e 19 das 50 espécies de cracídeos estão listadas como vulneráveis, ameaçadas ou criticamente ameaçadas (BROOKS & STRAHL, 2000).

No Brasil, os cracídeos são representados por 22 espécies, distribuídas nos gêneros *Aburria*, *Crax*, *Nothocrax*, *Ortalis*, *Pauxi* e *Penelope*. Dentre eles, o jacu-de-patas-pretas, *Penelope obscura bronzina*, é uma subespécie endêmica da Mata Atlântica brasileira com ampla distribuição, ocorrendo desde o leste de Minas Gerais até Santa Catarina, passando pelo Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (EVANGELISTA-VARGAS & SILVEIRA, 2018). Por se alimentarem de frutas e insetos, são considerados importantes dispersantes de sementes, contribuindo significativamente para o funcionamento do ecossistema (WIKIAVES, 2022).

Os dados da literatura sobre hemosporídeos de cracídeos são escassos. Galbadón e Ulloa (1978), em amplo levantamento na Venezuela, analisaram 360 espécimes de *Ortalis ruficauda*, descrevendo uma nova subespécie de *Haemoproteus*, *H. rotundum ortalidum*. Mais tarde, Bennet et al. (BENNET et al. 1982), re-analisando os materiais de comprovante de Galbadón e Ulloa (1978), redescreveram *H. rotundum ortalidum* como uma nova espécie, *H. ortalidum*, e propuseram uma nova, *H. cracidarum*. Anos depois, Motta et al. (2013), em estudo sobre hemosporídeos associados à espécie *Aburria jacutinga*, relatou infecções por *Plasmodium* e *Haemoproteus* nesta espécie hospedeira por meio de análises moleculares. Chagas et al. (2017) relataram, usando dados morfológicos e moleculares, a espécie *H. ortalidum* (linhagem *cyt b* PENOBS01) parasitando *Penelope obscura* em um estudo no sudeste do Brasil. Por fim, Ferreira-Júnior et al. (2017), também por caracterizações morfológicas e moleculares, descreveram uma nova espécie de *Aburria jacutinga*, *H. paraortalidum*.

O uso de abordagens integrativas como métodos moleculares e morfológicos é muito importante em estudos taxonômicos de hemosporídeos, pois é difícil delimitar as espécies pertencentes à ordem Haemosporida. Aqui, realizamos a caracterização morfológica e molecular de duas espécies de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. linhagens (PENOBS02 e PENOBS03) registradas em *Penelope obscura bronzina* da Mata Atlântica brasileira, e discutem aspectos da taxonomia de parasitos *Haemoproteus* associados a aves cracídeos.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Locais de Estudo e Amostras de Sangue

Foram utilizadas quatro aves da espécie *Penelope obscura*. Dois deles foram capturados em dezembro de 2013 e em abril de 2015, utilizando redes de neblina (12 x 3 m, com malha de 38 mm) colocadas em transectos lineares de 10 redes em três fragmentos de Mata Atlântica em área urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil ($21^{\circ}48'23"S$; $43^{\circ}15'45,7"W$). A Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais é um ambiente heterogêneo e atualmente reduzido a apenas 7% de sua cobertura original. Assim, a maior parte do que resta da vegetação da Mata Atlântica encontra-se em pequenos remanescentes, abrigando uma alta diversidade de espécies de flora e fauna, incluindo vários táxons endêmicos e ameaçados (REVISÃO PERIÓDICA, 2018). As outras duas amostras foram obtidas do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em agosto de 2017 ($21^{\circ}47'40,2"S$; $43^{\circ}22'53,6"W$). As redes permaneceram abertas por aproximadamente 10 horas, a partir das 6h. Amostras de sangue (~ 30µl) foram coletadas por punção da veia braquial e processadas para detectar e identificar hemosporídeos por meio de análises microscópicas e moleculares. Os esfregaços de sangue foram preparados e imediatamente secos à temperatura ambiente. As amostras de sangue para análises moleculares foram colocadas em microtubos de 1,5 ml e armazenadas a -20° C para análises posteriores. As aves foram identificadas de acordo com Ridgely et al. (2009), Sigrist (2014) e Evangelista-Vargas e Silveira (2018), anilhados, pesados e liberados. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram realizados e seguidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo n. 042/2012), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (n. 29.268-3), Instituto Estadual de Florestas (IEF) (Protocolo n. 033/2017), e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Protocolo n. 0255.100178/2016-65).

4.4.2 Análises Morfológicas

Para realizar as análises morfológicas, coletamos amostras de sangue da veia braquial e preparamos três esfregaços de sangue para cada ave. Os esfregaços foram fixados, ainda em campo, durante 3 minutos em metanol e posteriormente corados com corante Giemsa por 45 minutos, diluído em água destilada na proporção de 1:9. Os esfregaços de melhor qualidade foram usados para calcular a parasitemia e a prevalência de infecção. Quando não foram encontrados parasitas no esfregaço de sangue, outra lâmina foi examinada. Os esfregaços foram analisados em microscopia de luz (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) com aumento de 1000X.

As análises morfométricas foram realizadas no Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics), medindo 10 macrogametócitos maduros e 6 microgametócitos da linhagem 1 (PENOBS03); e 10 macrogametócitos maduros e 9 microgametócitos maduros da linhagem 2 (PENOBS02), seguindo Valkiūnas (2005). Para calcular a razão de deslocamento do núcleo (NDR), apenas eritrócitos infectados com gametócitos maduros e totalmente crescidos foram selecionados. O NDR foi calculado de acordo com Bennett et al. (1972), utilizando a fórmula $NDR = 2X / (X + Y)$, que representa a largura do lado do eritrócito dentro do qual o parasita se encontra.

4.4.3 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento

O DNA total de quatro amostras de sangue foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante para extração de sangue. O gene mitocondrial do citocromo b (cyt b) dos parasitas foi amplificado usando um protocolo nested-PCR (HELLGREN et al. 2004), na primeira rodada da qual usamos primers gerais para detecção de parasitas dos gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*, HaemNFI e HaemNR3, enquanto na segunda rodada, os primers foram HaemF e HaemR2, que são específicos para os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

As PCRs foram realizadas em um volume final de 25 μ l consistindo de 12,5 μ l de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2,5 μ l de água livre de nuclease, 2,5 μ l de cada primer (10 μ M) e 5 μ l de molde de DNA para reações de primeira rodada; e 12,5 μ l de Taq Green Master Mix (Promega), 7,5 μ l de água sem nuclease, 1 μ l de cada primer (10 μ M) e 3 μ l do produto da primeira rodada foram usados na segunda rodada de amplificação.

Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel executando 5 μ l do segundo produto da rodada de PCR juntamente com 2 μ l de Blue Green Loading Dye I (LCG Biotecnologia) em um gel de agarose a 2% (Invitrogen).

Utilizamos água livre de nuclease como controle negativo e DNA total de *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *gallinaceum* como controle positivo. Os produtos amplificados foram purificados usando o reagente de limpeza do produto ExoSAP-IT PCR (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciados em ambas as direções com o conjunto de primers HaemF e HaemR2.

4.4.4 Análises Filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram realizadas usando um conjunto de dados *cyt b* de parasitas hemosporídeos de aves, com sequências recuperadas dos bancos de dados MalAvi (2009) e GenBank (2015) acessados em junho de 2022, e as sequências do presente estudo. Para elaborar o conjunto de dados, selecionamos todas as sequências de *H. ortalidium* e *H. paraortalidium* disponíveis no banco de dados GenBank; sequências que apresentaram maior identidade genética com as sequências obtidas neste trabalho verificadas com as linhagens disponíveis em bancos de dados (Blast/Portal NCBI); e sequências de outros morfotipos dos três principais gêneros de Haemosporida (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*). Assim, o conjunto de dados foi composto por 40 sequências, sendo 34 pertencentes ao gênero *Haemoproteus*, cinco sequências pertencentes ao gênero *Plasmodium* e uma sequência de *Leucocytozoon buteonis*, utilizada como grupo externo.

O alinhamento foi realizado no MAFFT (KATOH, 2019) e posteriormente inspecionado visualmente para remover sítios mal alinhados, utilizando o software GBLOCKS v. 0.91b (TALAVERA & CASTRESANA, 2007) nas configurações padrão do programa, resultando em uma matriz com 479 bp. O software MEGA v. 11.0.11 (KUMAR et al. 2018) foi usado para selecionar o modelo ideal para evolução da sequência, seguindo as configurações padrão do programa (método estatístico: máxima verossimilhança; lacunas/tratamento de dados ausentes: exclusão parcial e corte de cobertura do site: 50 %), obtendo-se o modelo de evolução da sequência GTR + G + I. A análise de inferência bayesiana (BI) foi realizada no software MrBayes v. 3.2.7a no XSEDE v. 0.1.5 (RONQUIST et al. 2012), implementado na plataforma CIPRESS. Após duas simulações simultâneas e

independentes de Markov Chain Monte Carlo realizadas em mais de 1.000.000 gerações e um burn-in de 25%, um total de 1625000 árvores foram compiladas em uma única melhor árvore que foi amostrada para os resultados. A árvore resultante foi visualizada e editada no FigTree 1.4.4 (RAMBAUT, 2010). O conjunto de dados obtido após ser refinado no GBLOCKS também foi utilizado para calcular a divergência entre as linhagens. Para isso, realizamos uma análise no software MEGA X, utilizando eliminação parcial no tratamento de gaps e corte de 50% de cobertura do site contorno levemente amebóide. Eles não tocam o núcleo. No entanto, eles tocam a membrana da célula hospedeira. Os grânulos de pigmentos são agregados em massa compacta na periferia do parasito. Eles estão sempre em menor número de macrogametócitos (Figura 2H, I). A influência dos microgametócitos na forma dos eritrócitos infectados não é pronunciada (Figura 2H, I). Após análises moleculares, obtivemos duas sequências de *Haemoproteus*, que foram nomeadas PENOBS02 e PENOBS03, correspondendo a cada linhagem morfológica caracterizada por abordagens microscópicas. Os chromatogramas do sequenciamento foram desativados, além dos outros padrões de configuração do software após estimativas de árvores.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Prevalência e Parasitemia

Todas as quatro amostras de aves analisadas estavam infectadas com *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp. A caracterização morfológica de duas linhagens de *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp. (PENOBS02 e PENOBS03) registradas em *Penelope obscura bronzina* são mostradas nas Figuras 1 e 2; Tabela 1.

Tabela 1. Morfometria de células hospedeiras e gametócitos maduros de espécies de *Haemoproteus* de aves Cracidae

Características	<i>Haemoproteus</i> sp. (linhagem PENOBS02)*	<i>Haemoproteus</i> sp. (linhagem PENOBS03)*
Eritrócitos não infectados	15	30
Comprimento	11.4 – 14.3 (12.7 μm ± 0.63)	9.4- 17.69 (13.19 μm ± 1.81)
Largura	6.9 – 8.5 (7.7 μm ± 0.46)	6.73± 9.97 (8.0 μm ± 0.94)
Núcleo do eritrócito não infectado		
Comprimento	5.4 – 7.4 (6.2 μm ± 0.6)	5.0- 8.0 (6.21 μm ± 0.88)
Largura	2.4 – 3.1 (2.7 μm ± 0.2)	2.32- 4.13 (3.09 μm ± 0.49)
Macrogametócito	N = 10	N = 10

Comprimento	9.04- 13.49 (11.19 μm ± 1.82)	13.31- 15.98 (14.62 μm ± 0.73)
Largura	4.68- 8.02 (5.3 μm ± 1.36)	5.74- 8.09 (6.81 μm ± 1.09)
Área	22.98- 40.81 (35.72 μm^2 ± 1.82)	23.51- 45.73 (35.38 μm^2 ± 1.09)
<i>Núcleo</i>		
Comprimento	4.52- 6.41 (5.55 μm ± 0.49)	4.17- 4.77 (4.81 μm ± 0.31)
Largura	1.95- 2.94 (2.41 μm ± 0.33)	2.21- 3.75 (2.59 μm ± 0.57)
Área	1.42- 3.40 (2.44 μm^2 ± 0.68)	6- 8.98 (7.37 μm^2 ± 0.57)
Grânulos de pigmentos	5- 10 (7.1± 1.52)	0- 14 (14± 4.42)
NDR	0.31- 0.75 (0.57 μm ± 0.14)	0.39-0.96 (0.69 μm ± 0.15)
Área do vacúolo	1.2- 2.2 (0.9 μm ± 0.20)	0.31- 4.2 (1.14 μm ± 1.06)
 Microgametóцитos		
	N= 9	N= 6
Comprimento	12.23- 14.1 (12.86 μm ± 1.21)	12.03- 15.37 (13.72± 1.03)
Largura	2.00- 3.45(2.49 μm ± 0.46)	5.71- 9.59 (7.36± 0.83)
Área	36.39- 49.8 (42.86 μm^2 ± 5.24)	35.39- 45.8 (40.86 μm^2 ± 4.24)
<i>Núcleo</i>		
Comprimento	1.30- 4.95 (3.65 μm ± 1.62)	1.74- 4.3 (3.26 μm ± 1.58)
Largura	1.08- 1.71 (1.39 μm ± 0.22)	1.61- 3.21 (2.37 μm ± 0.51)
Área	2.30- 7.89 (5.85 μm^2 ± 2.56)	2.3- 11.11 (8.4 μm^2 ± 3.96)
Grânulos de pigmentos	7 (5.22± 1.09)	2-5 (3.16 ± 1.16)
NDR	0- 0.97 (0.63 μm ± 0.26)	0.54- 0.74 (0.60 μm ±0.07)

* Valores mínimos e máximos obtidos seguidos da média aritmética e desvio padrão (entre parênteses). N = número de parasitas medidos. Todas as medidas foram fornecidas em micrômetros (μm), exceto o número de grânulos de pigmento, que são representados por números reais.

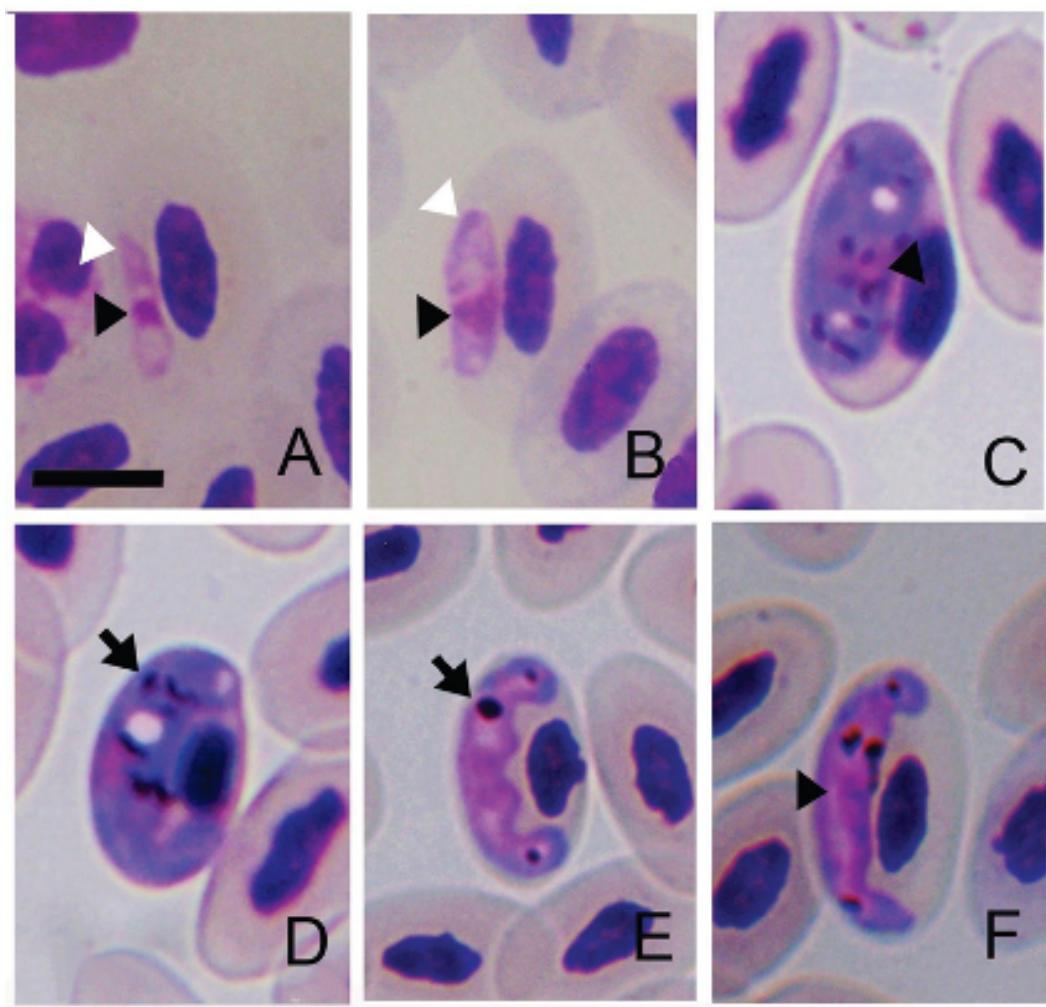


Figura 1. Estágios sanguíneos de *Haemoproteus* sp. (linhagem PENOBS02) registrada em Cracidae (*Penelope obscura bronzina*) brasileiro. A-B: Estágios jovens; C-F: macrogametócitos; G: eritrócitos duplamente infectados; H-I: microgametócitos. Cabeças de setas brancas indicam aglomerados de grânulos de volutina; cabeças de setas pretas indicam núcleos de parasitos; setas regulares indicam grânulos de hemozoína. Barras de escala = 5 μ m.

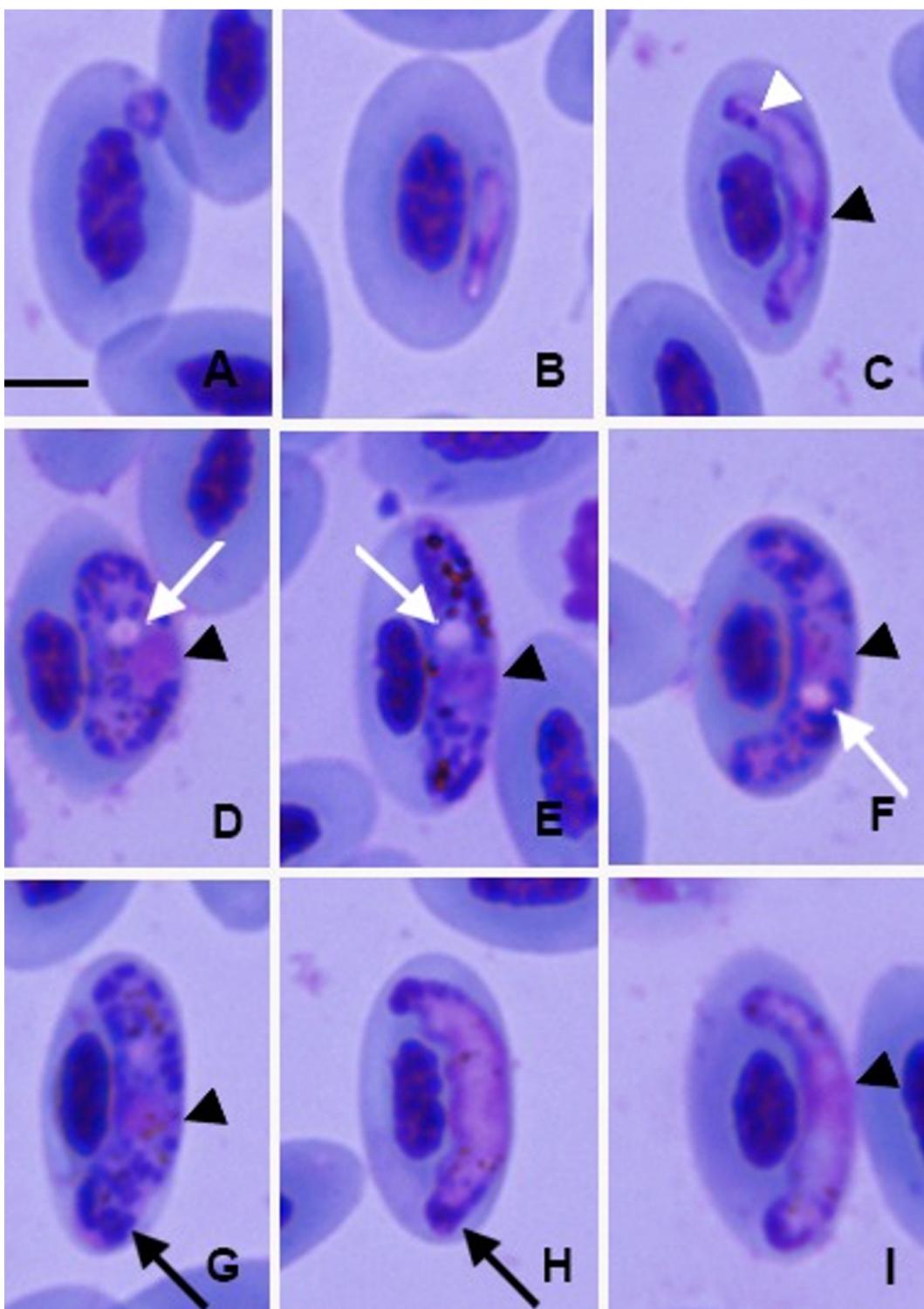


Figura 2. Estágios sanguíneos de *Haemoproteus* sp. (linhagem PENOBS03) registrada em Cracidae (*Penelope obscura bronzina*) brasileiro. A-B: Estágios jovens; C-G: macrogametócitos; H-I: microgametócitos. Cabeça de setas brancas indicam aglomerados de grânulos de volutina; setas pretas indicam núcleos de parasitos; setas brancas regulares indicam vacúolos; setas pretas regulares indicam grânulos de hemozoína. Barras de escala = 5 μ m.

4.5.1.1 *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. cyt b linhagem PENOBS02 (Figura 1; Tabela 1)

Gametócitos jovens (Figura 1 a-b). Desenvolvem-se apenas em eritrócitos maduros e têm corpos delgados em forma de bastão. Quando o parasito se desenvolve, assumem um corpo em forma de bastonete, com um núcleo proeminente, e geralmente ocupam uma posição lateral ao núcleo das células hospedeiras (Figura 1A, B). Eles são encontrados livres no citoplasma (Figura 1A, B) e geralmente tocam a membrana da célula hospedeira (Figura 1B). Os núcleos são escuros, proeminentes, geralmente uniformes em contorno, com limites bem distintos (Figura 1A, B) e ocupam apenas a posição central ou subcentral no citoplasma do parasita (Figura 1B). À medida que o parasita cresce, os gametócitos se estendem ao longo do núcleo eritrócito (Figura 1B), assumindo uma forma alongada. Nesta fase de desenvolvimento, os gametócitos encontram-se livres no citoplasma e geralmente tocam a membrana dos eritrócitos. Os grânulos de volutina aparecem como minúsculas manchas em gametócitos precoces (Figura 1A, B). A volutina tende a se aglomerar ao longo da periferia dos gametócitos sendo particularmente densa nos pólos, e assim, as partes centrais dos estágios jovens são mais claras do que suas partes periféricas (Figura 1A, B). A influência dos gametócitos jovens na forma dos eritrócitos infectados não é pronunciada.

Macrogametócitos (Figura 1 C-D). O citoplasma é granular na aparência, contendo numerosos grânulos de hemozoína, que são espalhados aleatoriamente por todo o citoplasma (Figura 1C, D). Os gametócitos crescem ao longo do núcleo dos eritrócitos infectados (Figura 1C, D). Parasitos maduros aderem tanto à membrana como ao núcleo dos eritrócitos (Figura 1C, D), possuem formato largo e alongado (Figura 1D); eles deslocam o núcleo da célula hospedeira lateralmente, às vezes acentuadamente (Figura 1D). Os núcleos do parasita são compactos, relativamente pequenos e de forma variável, e geralmente ocupam uma posição mediana (Figura 1C, D). Na maioria das fases observadas, os parasitos apresentam um grande vacúolo ($>1 \mu\text{m}$), facilmente visível (Figura 1C, D). Esses vacúolos são geralmente localizados em uma posição central ou subcentral no citoplasma do parasita (Figura 1C, D). Os grânulos de pigmento são arredondados ou ovais, de tamanho médio (entre 0,5 e 1 μm de comprimento), espalhados por todo o citoplasma.

Microgametócitos (Figura 1 E-F): são sempre alongados e com o contorno amebóide (Figura 1 E-F). Eles não tocam o núcleo, mas frequentemente tocam a membrana da célula hospedeira. Os grânulos de pigmento são encontrados frequentemente agrupados na extremidade do parasito (Figura 1 E-F). Os microgametócitos totalmente crescidos deslocaram acentuadamente o núcleo da célula hospedeira lateralmente (Figura 1 E-F).

4.5.1.2 *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. cyt b linhagem PENOBS03 (Figura 2; Tabela 1)

Gametócitos jovens (Figura 2A-C). Os estágios iniciais são arredondados em forma e estão localizados em uma posição polar ou subpolar no citoplasma das células hospedeiras. Gametócitos jovens se desenvolvem apenas em eritrócitos maduros; eles têm corpos delgados em forma de haste, com um núcleo proeminente, geralmente ocupando uma posição lateral ao núcleo das células hospedeiras (Figura 2 B, C). Encontram-se livres no citoplasma e não tocam o núcleo ou a membrana dos eritrócitos (Figura 2 A-C). Os núcleos são manchados de escuro, proeminente, mesmo no contorno, com limites bem definidos (Figura 2 A-C) e ocupam apenas uma posição mediana ou subterminal no citoplasma do parasita (Figura 2

A-C). À medida que o parasito se desenvolve, os gametócitos se estendem ao longo do núcleo do eritrócito (Figura 2 B, C), assumindo um corpo alongado irregular (Figura 2 B, C). Nesta fase do desenvolvimento, os gametócitos encontram-se livres no citoplasma e não tocam o núcleo ou invólucro dos eritrócitos. Grânulos de pigmento são difíceis de ver, mas eles são marrom-escuros, pequenos ($< 0,5 \mu\text{m}$) e agrupados. Os grânulos de volutina aparecem como pequenas manchas nos gametócitos iniciais (Figura 1 B, C). A volutina tende a se agrupar na periferia dos gametócitos e, assim, as partes centrais dos gametócitos jovens são mais pálidas do que suas partes periféricas (Figura 2 B, C). Frequentemente observamos dupla infecção de parasitos jovens, e eles sempre ocupam uma posição lateral ao núcleo do hospedeiro (Figura 2 B, C). A influência dos gametócitos jovens na forma de eritrócitos infectados não é pronunciada.

Macrogametócitos (Figura 2 D-G): O citoplasma é homogêneo, e os grânulos de volutina, tipicamente encontrados em gametócitos jovens, são difíceis de ver em macrogametócitos (Figura 2 D-G). Os gametócitos crescem ao longo do núcleo de eritrócitos infectados. Parasitos em crescimento avançado eventualmente aderem tanto à membrana quanto ao núcleo dos eritrócitos (Figura 2 D-G). Os gametócitos em maturação são corpos largos e alongados, com um contorno uniforme (Figura 2D, E) e deslocam o núcleo da célula hospedeira lateralmente. Os núcleos do parasito são compactos, de formato variável, geralmente medianos ou subterminais em posição (Figura 2 D-G). Um grande e facilmente visível vacúolo ($>1 \mu\text{m}$) está presente em cada macrogametócito (Figura 2 D-G). Tais vacúolos frequentemente ocupam uma posição central ou subcentral no citoplasma do parasito. Os grânulos de pigmento são arredondados ou ovais, de tamanho médio (entre 0,5 e 1 μm de comprimento) e espalhados por todo o citoplasma (Figura 2 E-G). Frequentemente observamos dupla infecção de gametócitos, e eles sempre ocupam uma posição lateral à célula hospedeira núcleo. Gametócitos totalmente desenvolvidos deslocam acentuadamente o núcleo da célula hospedeira lateralmente (Figura 2 E-G).

Microgametócitos (Figura 2 H-I): São sempre alongados com contorno amebóide (Figura 2 H, I). Eles não tocam o núcleo do eritrócito, mas toca a membrana da célula hospedeira. Os grânulos de volutina são encontrados espalhados pelo citoplasma do parasito (Figura 2 H, I) e grânulos de pigmento de hemozoína foram encontrados nas extremidades. Totalmente crescidos, os microgametócitos deslocaram acentuadamente o núcleo da célula hospedeira lateralmente (Figura 2 H, I).

Observações. Observamos duas linhagens distintas de *Haemoproteus* sp. associada a *Penelope obscura bronzina*. Ambas as linhagens descritas no presente estudo (PENOBS02 e PENOBS03) são morfologicamente semelhantes às espécies de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *paraortalidum* descritas por Ferreira-Júnior et al. (2018). No entanto, eles diferem em alguns aspectos. A linhagem PENOBS03 difere de *Haemoproteus* (*P.*) *paraortalidum* no formato do corpo do gametócito jovem, que é arredondado na linhagem do presente estudo, enquanto oval com extremidades pontiagudas em *H. paraortalidum*; quantidade e distribuição dos grânulos de volutina e hemozoína no citoplasma; no tamanho dos grânulos de hemozoína; na ausência de um vacúolo próximo ao núcleo do parasita e nos dados da morfometria (Tabela 2) uma vez que nossos parasitos são ligeiramente maiores do que *Haemoproteus* (*P.*) *paraortalidum* na descrição original, porém as diferenças não são estatisticamente significantes. Quando comparado com *H. Ortalidum*, vemos diferenças como a forma arredondada de gametócitos jovens encontrados no presente estudo; Os macrogametócitos tocam tanto o núcleo quanto a membrana eritrocitária; PENOBS03 exibe

pigmentos ovais ou arredondados, enquanto *H. ortalidum* exibe pigmentos alongados; *H. ortalidum* tem dois tipos de gametócitos, um alongado e outro arredondado. A respeito de *H. cracidarum*, a linhagem do presente estudo possui um grande vacúolo central, enquanto *H. cracidarum* possui muitos deles, espalhados pelo citoplasma; os pigmentos são mais difíceis de ver em *H. cracidarum* e evidentes no parasitas caracterizados neste estudo. Por outro lado, PENOBS02 difere de *Haemoproteus (P.) paraortalidum* no contorno, uma vez que os parasitos no presente estudo são amebóides em comparação com *Haemoproteus (P.) paraortalidum*, que apresenta contorno uniforme; nos dados morfométricos, uma vez que os parasitos caracterizados neste estudo são um pouco maiores; as extremidades são arredondadas, diferindo de *H. paraortalidum* que tem extremidades pontiagudas; e na capacidade de deformar as células eritrocitárias, uma vez que nas linhagens obtidas no presente estudo, a influência dos gametócitos na célula hospedeira é muito pronunciada.

Tabela 2. Comparação morfométricas das espécies de *Haemoproteus* dentro de Cracidae.

	<i>H. paraortalidum</i>	<i>H. ortalidum</i>	<i>H. ortalidum</i>	<i>H. cracidarum</i>
Eritrócitos não infectados	15	100	-	100
Comprimento	11.4–14.3 (12.7 ± 0.63)	13,8 (± 0,8)	-	13,0 (± 0,8)
Largura	6.9–8.5 (7.7± 0.46)	7,3 (± 0,4)	-	7,3 (± 0,4)
Núcleo do eritrócito não infectado	15	100	-	100
Comprimento	5.4 – 7.4 (6.2 ± 0.6)	5,9 (± 0,6)	-	5,9 (± 0,6)
Largura	2.4 – 3.1 (2.7 ± 0.2)	2,3 (± 0,3)	-	2,3 (0,3)
Macrogametócito	6	55	50	50
Eritrócito infectado		Gametócitos arredondados	Gametócitos alongados	
Comprimento	10.7–13.4 (12 ± 0.81)	11,7 (± 0,8)	13,0 (± 1,0)	13,6 (±0,5)
Largura	6.6–9.1 (8.1 ± 0.95)	8,5 (± 0,8)	7,9 (± 0,7)	7,8 (± 0,4)
Núcleo do eritrócito infectado				
Comprimento	5.1–6.6 (5.76 ± 0.53)	5,4 (± 0,5)	5,6 (± 0,8)	5,1 (0,4)
Largura	2.3–3.0 (2.61 ± 0.25)	2,2 (± 0,3)	2,2 (± 0,4)	2,3 (0,3)
Gametócito				

Comprimento	9.4–12.1 (10.97 ± 1.12)	6,8 ($\pm 0,8$)	10,8 ($\pm 1,0$)	19,9 ($\pm 1,9$)
Largura	3.7–5.9 (4.23 ± 0.75)	5,7 ($\pm 0,5$)	3,7 ($\pm 0,4$)	4,2 ($\pm 0,4$)
Núcleo do gametócito				
Comprimento	2.3–2.9 (2.54 ± 0.18)	2,5 ($\pm 0,5$)	2,8 ($\pm 0,6$)	3,1 ($\pm 0,5$)
Largura	1.4–2.3 (1.81 ± 0.32)	1,8 ($\pm 0,4$)	1,9 ($\pm 0,3$)	2,5 ($\pm 0,4$)
Número de grânulos de pigmento	10.0–19.0 (14.33 ± 2.98)	11,3 ($\pm 1,0$)	12,0 ($\pm 1,5$)	22,5 ($\pm 2,0$)
Diâmetro dos grânulos de pigmento	0.5–1.2 (0.68 ± 0.13)	-	-	-
Vacúolo	1.6–2.0 (1.76 ± 0.13)	-	-	-
NDR	0 – 0.52 (0.33 ± 0.19)	-	0.5	0.5
Microgametócito	4	40	40	20
Eritrócito infectado				
Comprimento	11.7 – 13.4 (12.68 ± 0.77)	11,9 ($\pm 0,9$)	13,0 ($\pm 0,9$)	13,4 ($\pm 0,7$)
Largura	6.5 – 8.4 (7.63 ± 0.88)	9,2 ($\pm 1,1$)	8,0 ($\pm 0,5$)	7,5 ($\pm 0,4$)
Núcleo do eritrócito Infectado				
Comprimento	4.6 – 6.2 (5.29 ± 0.65)	5,4 ($\pm 0,6$)	5,0 ($\pm 0,5$)	5,4 ($\pm 0,6$)
Largura	2.2 – 2.7 (2.5 ± 0.28)	2,2 ($\pm 0,3$)	2,2 ($\pm 0,3$)	2,1 ($\pm 0,1$)
Gametócito				
Comprimento	10.7 – 12.6 (11.98 ± 0.85)	7,4 ($\pm 0,6$)	11,2 ($\pm 1,2$)	18,3 ($\pm 1,7$)
Largura	2.9 – 3.5 (3.24 ± 0.24)	6,3 ($\pm 0,5$)	3,4 ($\pm 0,4$)	4,3 ($\pm 0,3$)
Núcleo do gametócito				
Comprimento	4.1 – 10.2 (7.16 ± 2.6)	5,0 ($\pm 1,0$)	6,0 ($\pm 0,6$)	5,1 ($\pm 0,8$)

Largura	2.2 – 3.1 (2.59 ± 0.36)	3,3 ($\pm 0,7$)	3,1 ($\pm 1,0$)	2,8 ($\pm 0,4$)
Número de grânulos de pigmentos	9 – 16 (12.7 ± 2.87)	11,1 ($\pm 1,5$)	11,4 (1,4)	19,4 ($\pm 0,9$)
Diâmetro dos grânulos de pigmentos	0.5 – 1.0 (0.65 ± 0.13)	-	-	-
NDR	0.3 – 0.8 (0.61 ± 0.2)	-	0,6 (-)	0.4

Quando comparado com *H. Ortalidum* diferem pela presença de dois tipos de macrogametócitos, pois encontraram apenas um tipo para a linhagem no presente estudo; na distribuição dos grânulos de pigmentos, que se agrupam na periferia do citoplasma em PENOBS02 e dispersos aleatoriamente em *H. ortalidum*. Por último, nós comparamos PENOBS02 com o *H. cracidarum* e encontramos diferenças no número de vacúolos, PENOBS02 com um ou dois grandes centrais, e muitos pequenos vacúolos posicionados polarmente em *H. cracidarum*. De acordo com as disparidades morfológicas, essas linhagens são também diferentes filogeneticamente. A linhagem PENOBS03 surgiu como um grupo irmão de uma linhagem *Haemoproteus*, DELCAS01, uma linhagem encontrada em *Delothraupis castaneoventris* (ordem Passeriformes, família Thraupidae). Este clado composto pelas duas linhagens acima surgiu como um clado grupo irmão formado por linhagens encontradas em cracídeos, como *Haemoproteus* sp. (ABJAC01), *Haemoproteus paraortalidum* (ABUJAC01) e *Haemoproteus* sp. (PENELOPE01), as duas primeiras encontradas em *Aburria jacutinga* e a terceira em *Penelope jacquacu*. A árvore filogenética também mostrou que a linhagem PENOBS02 foi posicionada externamente, formando um clado irmão das linhagens descritas acima mais uma linhagem *Haemoproteus* não identificada (ANIIGN01), encontrada em *Anisognathus igniventris* (ordem Passeriformes, família Thraupidae) (Figura 3). Assim, fica implícito que as linhagens das espécies correlacionadas acima pode não ser exclusivas de hospedeiros cracídeos. É importante ressaltar que as linhagens encontradas no presente trabalho são únicas, pois, utilizando o Algoritmo BLAST (Portal NCBI), verificou que nenhuma delas correspondia 100% em identidade com qualquer outro em o banco de dados Genbank e/ou Malavi.

4.5.2 Reconstruções Filogenéticas

As duas sequências obtidas no presente estudo foram depositadas no banco de dados MalAvi sob os nomes PENOBS02 e PENOBS03. Na reconstrução filogenética (Inferência Bayesiana), sequências obtidas no presente estudo surgiu em um clado bem suportado (93,48% probabilidade posterior) contendo representantes da espécie *Haemoproteus* isoladas de cracídeos, incluindo *Haemoproteus paraortalidum*, que foram relatados infectando jacutinga (*Aburria jacutinga*, linhagem ABUJAC01) (MOTTA et al. 2013)e *H. ortalidum*, isolado em *Penelope obscura* por Chagas et al. 2017 (linhagem PENOBS01) (Figura 3). A linhagem PENOBS03 surgiu como um grupo irmão de uma linhagem de *Haemoproteus* sp. (DELCAS01) encontrada em *Delothraupis castaneoventris* (ordem Passeriformes, família

Thraupidae). E este clado composto por estas duas linhagens emergiram como um clado irmão de *Haemoproteus* sp. (ABJAC01), *Haemoproteus paraortalidum* (ABUJAC01) e *Haemoproteus* sp. (PENELOPE01), as duas primeiras encontradas em *Aburria jacutinga* e a terceira em *Penelope jacquacu*, ambas pertencentes à ordem Galliformes, família Cracídeos. Por outro lado, a linhagem PENOBS02 foi posicionada externamente, formando um clado irmão com as linhagens acima descritas mais uma linhagem *Haemoproteus* não identificada (ANIIGN01) pertencente à espécie *Anisognathus igniventris* (ordem Passeriformes, família Thraupidae). A divergência genética média dentro deste clado foi de 2,33% (Figura 3, S1).

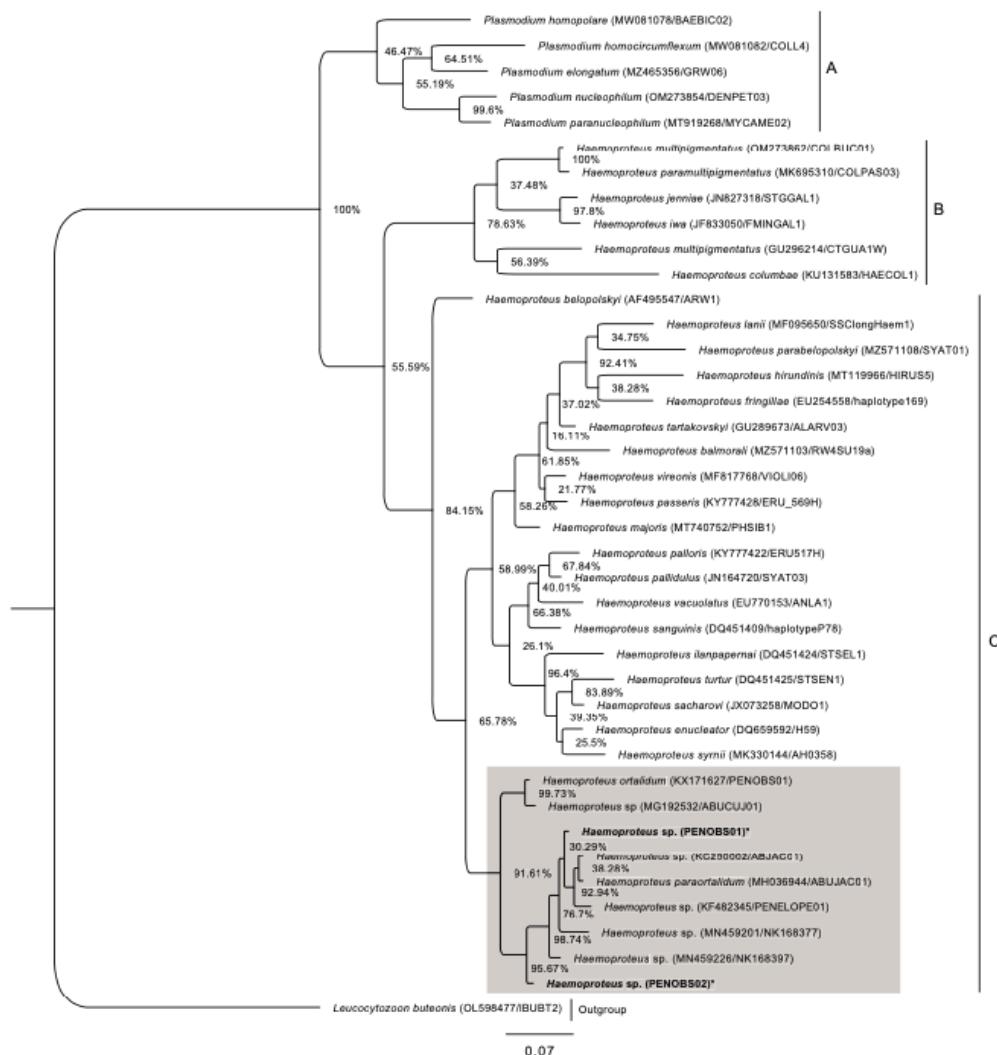


Figura 3. Inferência Bayesiana (BI) baseada nas sequências de *Haemoproteus* e *Plasmodium* cyt b. A sequência de *Leucocytozoon buteonis* foi escolhida como grupo externo. (A) Gênero *Plasmodium*; (B) gênero *Haemoproteus* (*Haemoproteus*); (C) gênero *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*). As porcentagens nos nós indicam as probabilidades posteriores do BI. As novas sequências obtidas neste estudo estão marcadas em negrito e asteriscos. A caixa destacada indica o clado em que nossas sequências se agruparam onde outras sequências de cracídeos são encontradas. Na frente de cada sequência está o código seguido pelo nome obtido do GenBank ou MalAvi. A barra de escala indica sete substituições por 100 nucleotídeos.

4.6 DISCUSSÃO

No que diz respeito à taxonomia de parasitos hemosporídeos que infectam cracídeos, dados morfológicos e moleculares consistentes disponíveis referem-se apenas a infecções por *Haemoproteus* (GALBADON & ULLOA, 1978; FERREIRA-JUNIOR et al., 2018; RIDGELY & TUDOR, 2009). Aqui, expandimos os dados existentes com a identificação de dois *Haemoproteus* sp. distintos, linhagens associadas a *Penelope obscura bronzina* no sudeste do Brasil. Esse é o primeiro relato de parasitos hemosporídeos infectando esta subespécie de cracídeo, estendendo a distribuição geográfica das infecções por *Haemoproteus* em cracídeo na Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, Brasil, um hotspot importante para a biologia da conservação.

Os dados morfológicos obtidos no presente estudo (Figuras 1 e 2), juntamente com a reconstrução filogenética molecular (Figura 3), levantou discussões sobre a taxonomia dos parasitos *Haemoproteus* que infectam pássaros cracídeos. O conceito de espécie em Haemosporida é complexo e ainda muito discutido. Existem estudos que definem novos táxons usando apenas uma abordagem morfológica (ZEHTINDJIEV et al., 2012), mas aquelas que combinam morfologia e os dados moleculares são atualmente os mais utilizados (MERINO et al., 2012; TOSTES et al., 2017). Hellgren et al. (2007) propuseram que seqüências com divergência genética em cit b acima de 5% seriam consideradas espécies novas, pois espécies com este nível de divergência genética seria morfologicamente distinta. No entanto, existem exemplos em que duas espécies de *Haemoproteus* diferem geneticamente em uma porcentagem muito menor, como *Haemoproteus pallidus* e *Haemoproteus minutus* (HELLGREN et al., 2007); e *Haemoproteus jenniae* e *Haemoproteus iwa* (LEVIN et al., 2012), cujas divergências genéticas são <1%. As seqüências deste trabalho, como mencionado anteriormente, apareceram em um clado com outras linhagens de *Haemoproteus* registradas em Cracidae, entre elas as seqüências correspondentes a *H. paraortalidum* (FERREIRA JUNIOR et al., 2018) e *H. ortalidum* (CHAGAS et al., 2017) (Figura 3), e a média da divergência genética dentro deste clado foi baixa (2,33%, Figura S1).

De acordo com as descrições originais e corroborando os achados moleculares, *H. ortalidum* e *H. paraortalidum* apresentaram como característica morfológica importante um vacúolo proeminente no citoplasma (GALBADON & ULLOA, 1978; BENNET, 1982; FERREIRA-JUNIOR et al., 2018), que, conforme sugerido por Valkiunas, 2005, não é uma característica comum entre os hemosporídeos aviários e é observada apenas em algumas espécies parasitos do gênero. No presente estudo, apesar da pequena disparidade morfológica observada entre os hemosporídeos de cracídeos, observamos este vacúolo em todos os parasitos caracterizados morfologicamente (*H. (P.) ortalidum*; *H. (P.) paraoratalidum*, PENOBS02 e PENOBS03). Considerando a baixa divergência genética dentro do clado de *Haemoproteus* de cracídeo (2,33%) (Figuras 3, S1) e a presença do vacúolo característico, é possível que esses parasitos tenham um ancestral comum com este vacúolo proeminente, que teria originado a total diversidade dentro deste clado; ou todas as linhagens dentro deste clado pertencem a da mesma espécie e são um novo exemplo de polimorfismo em Haemosporida, como foi observado em *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* por Oliveira et al. (2019), em *Plasmodium (Novyella) unali* por Tostes et al. (2017), e em *Haemoproteus (Haemoproteus) paramultipigmentatus* por Venançoni et al. (2021). O recente e rápido padrão de diversificação observado em aves Cracídeos concorda com essas hipóteses Hosner et al. (2016), sugerindo uma rápida diversificação dentro do clado *Haemoproteus ortalidum* e *H.*

paraortalidum. No entanto, para abordar esta questão, mais dados morfológicos e moleculares de *Haemoproteus* em Cracidae são necessários.

4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR

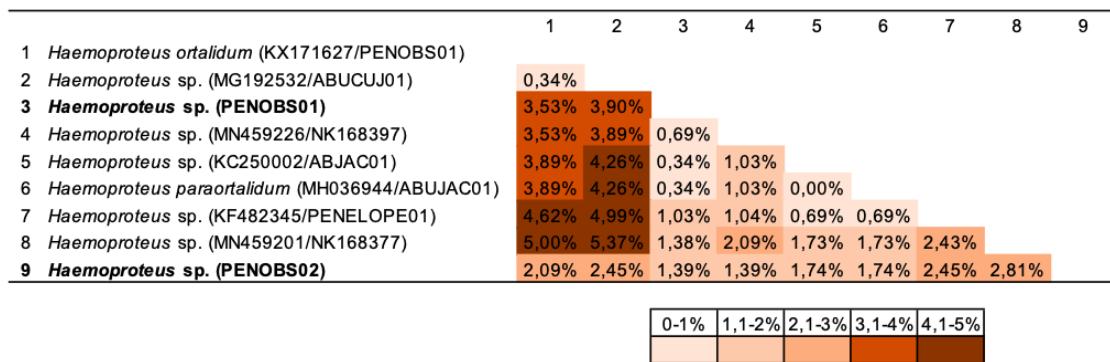


Figura S1. Estimativas de divergência genética pareada para *Haemoproteus* spp. As análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA X utilizando as linhagens mais próximas encontradas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, A. E. & CORDEIRO, N. S. Prevalence and intensity of *Haemoproteus columbae* in three species of wild doves from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 175–178, 2001.
- ARAGÃO, H.B. Sobre o ciclo evolutivo do halterídeo do pombo: nota preliminar. **Brazil-Medico**, Rio de Janeiro, v. 21(15), p.141–142, 1907.
- ATKINSON, C.T.; Forrester D.J., Greiner E.C. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. **Journal Parasitol.** PMID: 3128652, v. 74(2), p. 228-239 1988.
- ATKINSON, C.T.; DUSEK, R.J.; WOODS, K.L.; IKO, W.M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally infected Hawaii Amakihi. **Journal Wildlife Diseases**, p. 36:197, 2000.
- BARINO, G.T.M.; ROSSI, M.F.; OLIVEIRA, L.; JÚNIOR, J.L.R.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R.J.P. *Haemoproteus syrnii* (Haemosporida: Haemoproteidae) in owls from Brazil: morphological and molecular characterization, potential cryptic species, and exo-erythrocytic stages. **Parasitology Research**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06958-z>
- BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T.; REIS, S.E.; RICKLEFS, R.O.; BRAGA, E.M. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct Cerrado habitats in Brazil. **PLoS ONE**, v. 6(4), p. 10, 2011.
- BENNETT, G.F. & CAMPBELL, A.G. Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. **Canadian Journal of Zoology**, v. 50, p. 1269–1275, 1972.
- BENNETT, G.; LOPES, O.S. Blood parasites of some birds from São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 117-134, 1980.
- BENNETT G. F., GABALDON A., ULLOA G. Avian Haemoproteidae. 17. The haemoproteids of the avian family Cracidae (Galliformes) the guans, curassows, and chachalacas. **Can. J. Zool.** 60 v. 3, p. 105-3 1 12, 1982.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R.T. Host specificity in avian blood parasites: A study of Plasmodium and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B, Biological Sciences, v. 267, p. 1583–1589, 2000.
- BENSCH, S.; PÉAREZ-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, n. 7, p. 1617-1621, 2004.
- BENSCH, S.; WALDENSTRÖM, J.; JONZÉN, N.; WESTERDAHL, H.; HANSSON, B.; SEJBERG, D.; HASSELQUIST, D. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. **The Journal of Animal Ecology**, v. 76(1), p.112–122, 2007.

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.

BOSHOLN, M.; FECCHIO, A.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E.M.; ANCIÃES, M. Effects of avian malaria on male behaviour and female visitation in lekking blue-crowned manakins. **Journal of Avian Biology**, v. 47, 457–465, 2016.

BRUCE-CHWATT, L.J. Three hundred and fifty years of the Peruvian fever bark. Br **Med J (Clin Res Ed)**. May 28;296(6635):1486-7. PMID: 3134079; PMCID: PMC2546010. 1988. <https://doi.org/10.1136/bmj.296.6635.1486>

BROOKS, D. M. AND STRAHL, S. D. (compilers). Curassows, Guans and Chachalacas. Status Survey and Conservation Action Plan for Cracids 2000–2004. IUCN/SSC **Cracid Specialist Group**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. viii + 182 pp, 2000.

BURRY-CAINES, J. R.; BENNETT, G. F. The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporida) of the avian families Fringillidae and Emberizidae s.l.. **Canadian Journal of Zoology**. v. 70(6); p. 1149-1160, 1992. <https://doi.org/10.1139/z92-161>

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

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. 2015. Listas das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/wp-content/uploads/2020/06/Piacentini-et-al-2015-RBO.pdf>

CELLI, A. A History of Malaria in the Italian Campagna from Ancient Times. London 1933.

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

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

CLARK, N.J.; CLEGG, S.M.; LIMA, M.R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.004>, 2014.

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

CLARK K., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D.J., OSTELL J., SAYERS E.W. GenBank. Nucleic Acids Res. v. 44; p. 67-72, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>

COMBES, C. Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions. University Chicago Press, Chicago. 2001.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9 (8), p. 772, 2012.

DEL HOYO J., ELLIOTT A., SARGATAL J. Handbook of the Birds of the World. Vol. 2: New World Vultures to Guineafowl. Lynx Edicions, Barcelona, 1994.

DESOWITZ, R. The Malaria Capers New York: **WW Norton** 1991.

DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TOLEZANO, J.E.; LUPETTI, N. Hemoparasitas de aves capturadas em duas regiões do estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 44(1), p. 41-46, 1984.

DIMITROV, D.; IEZHOOVA, T.A.; ZEHTINDJIEV, P.; BOBEVA, A.; ILIEVA, M.; KIRILOVA, M.; BEDEV, K.; SJÖHOLM, C. Molecular characterisation of three avian haemoproteids (Haemosporida, Haemoproteidae), with the description of *Haemoproteus (Parahaemoproteus) palloris* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 93(5), p. 431–449, 2016.

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

EVANGELISTA-VARGAS, O. D.; SILVEIRA, L. F. Morphological evidence for the taxonomic status of the Bridge's Guan, *Penelope bridgesi*, with comments on the validity of *P. obscura bronzina* (Aves: Cracidae). **Zoologia**, v.. 35, p. e12993 ISSN 1984-4689, 2018.

FALK, B.G.; MAHLER, D.L.; PERKINS, S.L. Tree-based delimitation of morphologically ambiguous taxa: a study of the lizard malaria parasites on the Caribbean island of Hispaniola. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 967–980, 2011.

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

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

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

FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; RIBAS, A. C. A.; SILVEIRA, P.; CAPARROZ, R.; MARINI, M. Â. Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporidia prevalence in White-banded

Tanager (*Neothraupis fasciata*) in Central Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v. 93, p. 71–77, 2015.

FECCHIO, A.; PINHEIRO, R.; FELIX, G.; FARIA, I. P.; PINHO, J.B.; LACORTE, G. A.; BRAGA, E.M.; FARIAS, I.P.; ALEIXO, A.; TKACH, V.V.; COLLINS, M.D.; BELL, J.A.; WECKSTEIN, J.D. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. **Ecography**, p. 1–10, 2017a.

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, 105364, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105364>

FERREIRA-JUNIOR, F.C.; RODRIGUES, R. A.; ELLIS, V.A.; LEITE, L.O.; BORGES, M. A. Z.; BRAGA, É. M. Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. **PLoS One**. 2;12(6):e0178791. doi: 10.1371/journal.pone.0178791. PMID: 28575046; PMCID: PMC5456369, 2017.

FERREIRA-JUNIOR F. C., DUTRA D. A., MARTINS N. R. S., VALKIŪNAS G., BRAGA E. M. *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. 118, p. 93-100, 2018.

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

FOSTER, W.D.; A History of Parasitology Edinburgh and London: Livingstone, pp. VII, 202, 15 plates, 35s 1965.

FREMONT, Emmanuelle. **Hematologie et parasites sanguins des rapaces: étude chez des oiseaux en réhabilitation**. Lyon: École Nationale Vétérinaire de Lyon. 1993.

GALBADON A., ULLOA G. Subspecie de *Haemoproteus rotundus* Olinger, 1956 (Haemosporina: Haemoproteidae) presente en Venezuela. **Bol. Dir. Malariol. Saneamiento Ambiental**, v.18, p.165-173, 1978.

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

GARNHAM, P.C.C. Progress in Parasitology London: **Athlone Press** 1971.

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.

HARRISON G: Mosquitoes and Malaria: A History of the Hostilities since 1880 London: **John Murray**, 1978.

HAY, S.I.; MYERS, M.F.; BURKE, D.S.; VAUGHN, D.W.; ENDY, T.; ANANDA, N.; ROGERS, D.J. Etiology of interepidemic periods of mosquito-borne disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97 (16), p. 9335–9339, 2000.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BEN SCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 797–802, 2004.

HELLGREN, O.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; VALKIŪNAS, G.; BEN SCH, S. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **The Journal of Parasitology**, v. 93, p. 889-896, 2007.

HERNÁNDEZ-LARA, C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, F.; SANTIAGO-ALARCON, D. Spatial and seasonal variation of avian malaria infections in five different land use types within a Neotropical montane forest matrix. **Landscape and Urban Planning**, v. 157, p. 151-160, ISSN 0169-2046, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2016.05.025>

HOSNER, P.A.; BRAUN, E.L.; KIMBALL, R.T.; Rapid and recent diversification of curassows, guans, and chachalacas (Galliformes: Cracidae) out of Mesoamerica: phylogeny inferred from mitochondrial, intron, and ultraconserved element sequences, **Mol. Phylogenet. Evol.** 102 (2016) 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.06.006>

IRESTEDT, M.; FJELDSA, J.; JOHANSSON, U.S.; ERICSON, P.G.P. Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 23, 499–512, 2002.

KABOEV, O.K.; LUCHKINA, L.A.; TRET'IAKOV, A.N.; BAHRMAND, A.R. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). **Nucleic Acids Research**, v. 28, nº 21 e94, 2000.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, p. 1–7, 2019.

KRIŽANAUSKIENĖ, A.; PÉREZ-TRIS, J.; PALINAUSKAS, V.; HELLGREN, O.; BEN SCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. **Parasitology**, v. 137, p. 217-227, 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35(6), p. 1547–1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

LACORTE, G.A.; FÉLIX, G.M.F.; PINHIEIR, R.R.B.; CHAVES, A.V.; NETO, G.A.; 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.

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.

LAVERAN, A. Sur une Haemamoeba d'une mésange (*Parus major*). **C. R. Séances Soc. Biol. Fil.**, 54, 1121–1124, 1902.

LEITE, Y.F.C.; PINHEIRO, R.T.; BRAGA, E.M. Prevalência de Hemosporideos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. **Ornithologia**, v. 6(1), p. 1-13, 2013.

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

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.

MACCALLUM, W.G. On the flagellated form of the malarial parasite. **Lancet**, v. 11, p. 1240–1241, 1897.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ A.D.; LOTTA, I.A.; MOENS, M.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; VALKIŪNAS, G.; MONCADA, L.I.; PÉREZ-TRIS, J.; MATTA, N.E. *Haemoproteus erythrogravidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): Description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. **Acta Tropica**, v. 159, p. 83–94, 2016.

MARQUES, S.M.T., QUADROS, R.M., SILVA, C.J. & BALDO, M. Parasites of pigeons (*Columba livia*) in urban areas of lages, Southern Brazil. **Parasitología Latinoamericano**. v. 62, p. 183–187, 2007.

MARTINSEN, E.S.; WAITE, J.L.; SCHALL, J.J. Morphologically defined subgenera of *Plasmodium* from avian hosts: test of monophyly by phylogenetic analysis of two mitochondrial genes. **Parasitology** 134:483–490, 2007.

MAYDEN, R.L. A hierarchy of species concepts: the denouement of the species problem In: The Units of Biodiversity - Species in Practice Special (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds.). **Systematics Association**, v. 54, 1997.

McGREGOR I: Malaria. The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases London: **The Wellcome TrustCox FEG**, p. 230-247, 1996

MERINO, S.; MORENO, J.; JOSÉ-SANZ, J.; ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1461, p. 2507-2510, 2000.

MERINO, S.; HENNICKE, J.; MARTÍNEZ, J.; LUDYNIA, K.; TORRES, R.; WORK, T.M.; STROUD, S.; MASELLO, J.F.; QUILLFELDT, P. Infection by *Haemoproteus* parasites in four species of frigatebirds and the description of a new species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v. 98(2), p. 388–397, 2012.

MILLER, M.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing**

Environments Workshop (GCE), New Orleans, pp 1–8, 2010.
<https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

MOTTA R. O. C.; ROMERO MARQUES M. V.; FERREIRA JUNIOR F. C.; ANDERY D. DE A.; HORTA R. S.; PEIXOTO R. B.; LACORTE G.A.; MOREIRA P. DE A.; PAES LEME F. DE O.; MELO M. M.; MARTINS N. R. DA S.; BRAGA É. M. Does haemosporidian infection affect hematological and biochemical profiles of the endangered Black-fronted piping-guan (*Aburria jacutinga*)? **PeerJ** 1 e45, 2013. <https://doi.org/10.7717/peerj.45>

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, 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 Veterinary Parasitology**, v. 29(4): e011520, 2020.

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

PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BEN SCH, S.; VALKIŪNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera Haemamoeba and Giovannolaia (Haemosporida: Plasmodiidae). **Zootaxa**, v. 1626, p. 39–50, 2007.

PERKINS, S. L. Species concepts and malaria parasites: Detecting a cryptic species of *Plasmodium*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 267, p. 2345–2350, 2000.

PERKINS, S. L.; MARTINSEN, E.S.; FALK, B.G. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. **Parasitology**, v. 138, p. 1664–1674, 2011.

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

POSER, C. M.; BRUYN, G.W. An Illustrated History of Malaria New York: **Parthenon** 1999.

PRICE, P. W. Evolutionary biology of parasites. Monographs in Population Biology, Princeton University Press, Princeton v. 15, p. 1-237. PMID: 6993919. 1980

QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematic Biology** 56(6):879–886, 2007.

RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, **University of Edinburgh**, Edinburgh, 2010.

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

REVISÃO PERIÓDICA (2008-2018) e atualização dos limites e zoneamento da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Available at: <https://reservasdabiosfera.org.br/wp-content/uploads/2021/11/fase-7-POR-compactado.pdf>. Accessed Jul 1, 2022.

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.

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

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. V. D.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61 (3), p. 539-542, 2012.

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

RUSSELL, P.F: Man's Mastery of Malaria London: **Oxford University Press** 1965.

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.

SANTIAGO-ALARCON, D. & MARZAL, A. Avian malaria and related parasites in the tropics: ecology, evolution and systematics. Research on Avian Haemosporidian Parasites in the Tropics Before the Year 2000 Ed. Springer, p. 1- 44, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-51633-8>

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, Issue 4, p. 463-470, ISSN 0020-7519, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.003>

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H. M.; Diptera vectors of avian Hemospordidian parasites life cycles and their taxonomy. **Biological Reviews**, v. 87, p. 928-964, 2012.

SIGRIST T. Avifauna Brasileira. Avis Brasilis, p.602; 2014.

SCOTT, H.H. A History of Tropical Medicine London: **Edward Arnold** 1939, 1.

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, p. 432–439, 2010.

SEHGAL, R.N.M.; BUERMANN, W.; HARRIGAN, R.J.; BONNEAUD, C.; LOISEAU, C.; CHASAR, A.; SEPIL, I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.; SAATCHI, S.; SMITH, T.B. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest Bird. **Proceedings of the Royal Society**, v. 278, p. 1025–1033, 2011.

SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution. **Yale University Press**, New Haven, Connecticut, 1990.

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

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

STEPHENS, J.W.W. Blackwater Fever, A Historical Survey and Summary made over a Century, London: **Hodder and Stoughton**, 1937.

STOTZ, D.F.; FITZPATRICK, J.W.; PARKER, T.A.; MOSKOVITZ, D.K. Neotropical birds: ecology and conservation. **University of Chicago Press**, Chicago, 1996.

TALAVERA, G. & CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56(4), p. 564–577, 2007.

TALISUNA, A.O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical microbiology review**, v. 17, p. 235–254, 2004.

TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; OLIVEIRA, L.; SENRA, M.V.; MASSARD, C.L.; D'AGOSTO, M. Molecular and morphological characterization of a brazilian lineage of *Plasmodium* (*Novyella*) *unalis* in *Turdus* spp. (Passeriformes) of the Atlantic Forest, with remarks on new hosts and high genetic variation. **The Journal of Parasitology**, v. 104(1), p. 70–78, 2017.

VALKIŪNAS, G. (2005) **Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. CRC Press. Boca Raton, Florida, 947p., 2005.

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

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, G., IEZHOVA, T. A. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. **Malaria Journal** 16 101, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1746-7>

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A. Keys to the avian malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 17(1), p. 212, 2018.

VENANÇONI R.M., CEDROLA F., BARINO G.T.M., DIAS R.J.P., ROSSI M.F., D'AGOSTO M. New morphological and molecular data for *Haemoproteus* (*H.*) *paramultipigmentatus* in the Atlantic Forest of Brazil. **Parasitol. Int.** Oct; 84, 102375. doi: 10.1016/j.parint.2021.102375. Epub 2021 May 4. PMID: 33957295, 2021.

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

WHITE, E.M.; GREINER, E.C.; BENNET, G.F.; HERMAN, C.M. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. **Revista de Biología Tropical**, v. 26, p. 43–102, 1978.

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

ZHANG, Y.; WU, Y.; ZHANG, Q.; SU, D.; ZOU, F. Prevalence Patterns of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* Parasites and the Influence of Host Relative Abundance in Southern China. **PlosOne**, v. 9(6), p. e99501, 2014.

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

ZIMMER, K.J. & ISLER, M.L. Family Thamnophilidae (Typical Antbirds). In: del Hoyo, J.; Elliot, A. & Christie, D. (Eds.), *Handbook of the birds of the World: broadbills to tapaculos*. **Lynx Edicions**, Barcelona, Espanha, v. 8, p 448-681, 2003.